

Utjecaj upale i hipoksije na koncentraciju hepcidina u bolesnika s COVID-19

Gugo, Katarina

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:467541>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Katarina Gugo

**UTJECAJ UPALE I HIPOKSIJE NA
KONCENTRACIJU HEPCIDINA U
BOLESNIKA S COVID-19**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Katarina Gugo

**UTJECAJ UPALE I HIPOKSIJE NA
KONCENTRACIJU HEPCIDINA U
BOLESNIKA S COVID-19**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

doc. dr. sc. Leida Tandara

prof. dr. sc. Lada Rumora

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Katarina Gugo

**INFLUENCE OF INFLAMMATION AND
HYPOXIA ON HEPcidIN
CONCENTRATION IN PATIENTS WITH
COVID-19**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Assistant Professor Leida Tandara, Ph. D.

Full Professor with tenure Lada Rumora, Ph. D.

Zagreb, 2024

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti u znanstvenom području biomedicina i zdravstvo, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Split u suradnji sa Zavodom za medicinsku biokemiju i hematologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod mentorstvom doc. dr. sc. Leide Tandara i prof. dr. sc. Lade Rumora.

Posebno hvala mojim mentoricama doc. dr. sc. Leidi Tandara i prof. dr. sc. Ladi Rumora na svakom uloženom trenutku tijekom izrade ovog rada, na nesebičnim znanstvenim i stručnim savjetima, poticanju, podršci i pomoći.

Veliko hvala djelatnicima Zavod za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split na suradnji i podršci tijekom izrade ovog rada.

Hvala svim kolegicama na savjetima i prenesenom iskustvu te podršci.

Hvala mojoj obitelji.

SAŽETAK

Kod bolesnika s COVID-19 istovremeno su prisutni upala i hipoksija kao signali sa suprotnim učinkom na ekspresiju hepcidina. Istraživanje se temeljilo na hipotezi da je u skupini hipoksičnih bolesnika s COVID-19 koncentracija hepcidina u krvi snižena i da je razina parametara statusa željeza promijenjena u odnosu na skupinu normoksičnih bolesnika. Glavni cilj istraživanja bio je ispitati postoji li razlika u koncentraciji hepcidina i čimbenika koji reguliraju koncentraciju hepcidina kod normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19 te u skupini zdravih ispitanika. Također, željelo se ispitati postoji li povezanost koncentracije hepcidina i parametara statusa željeza, eritropoeze, hipoksije i sustavne upale u ispitivanim skupinama. Primijenjeni su omjeri koji su uključivali hepcidin i molekule koje su povezane s hepcidinom (hepcidin/željezo, feritin/hepcidin, hepcidin/interleukin-6 (IL-6), hepcidin/C-reaktivni protein (CRP), hepcidin/eritropoetin (EPO)) kako bi se istodobno pratio njihov suodnos i međusoban utjecaj, ali i omjeri kojima se povezuju i stavljaju u suodnos različiti upalni parametri (CRP/IL-6, omjeri CRP-a i IL-6 s leukocitnim podskupinama, omjeri neutrofila i limfocita (NLR), neutrofila i monocita (NMR) te monocita i limfocita (MLR)) kako bi se pokušalo što bolje razlikovati skupine bolesnika s COVID-19 koje imaju različit obrazac kliničke prezentacije i ishode bolesti.

U istraživanje je uključeno 96 bolesnika s COVID-19 i 47 zdravih ispitanika podudarnih po dobi i spolu. Uzorkovanje je provedeno po primitku na Hitni infektološki prijem te su bolesnici s COVID-19 podijeljeni u skupinu normoksičnih i hipoksičnih bolesnika na temelju zasićenje hemoglobina kisikom (SpO_2), a daljnjim praćenjem tijeka bolesti podijeljeni su u skupine prema težini bolesti.

Najvažniji rezultati ovog istraživanja ukazuju da su plazmatske koncentracije hepcidina, feritina, EPO-a, CRP-a i IL-6 te omjeri hepcidin/željezo i feritin/hepcidin bili značajno viši, dok su omjeri hepcidin/IL-6 i hepcidin/CRP bili značajno niži u hipoksičnih u odnosu na normoksične bolesnike te u bolesnika s teškim ili kritičnim oblikom COVID-19 u odnosu na one s blagim i umjerenim oblikom bolesti. Nađena je dobra povezanost hepcidina s CRP-om i IL-6 kod normoksičnih bolesnika, dok je u skupini hipoksičnih bolesnika povezanost s CRP-om bila slaba, a s IL-6 odsutna. Vrijednosti omjera CRP/neutrofilni granulociti, CRP/limfociti, CRP/monociti, NLR i NMR na prijemu bile su najviše kod bolesnika koji su imali teški i kritični tijek bolesti. Omjeri IL-6/neutrofilni granulociti, IL-6/limfociti, IL-6/monociti bili su statistički značajno viši u skupini ispitanika koja je imala kritični tijek bolesti u odnosu na ostale skupne

bolesnika. Multiparametarski model za predviđanje razvoja kritičnog oblika COVID-19 koji je uključivao EPO i feritin/hepcidin ispravno je klasificirao 88 % slučajeva.

Prisutnost izraženije sustavne upale u skupini hipoksičnih bolesnika vjerojatno je uzrok više koncentracije hepcidina u odnosu na normoksične bolesnike s COVID-19. Uz to, razlike u vrijednostima pojedinih omjera upalnih biljega među skupinama bolesnika s COVID-19 ukazuju da bi ovi omjeri mogli biti korisni u predviđanju težine bolesti.

Ključne riječi: COVID-19, hepcidin, željezo, feritin, eritropoetin, interleukin 6, hipoksija, upala

EXTENDED SUMMARY

Background: The liver hormone hepcidin is the master regulator of iron metabolism. Hepcidin controls intestinal iron absorption and release of iron from storage compartments. Hepcidin production is regulated on a transcriptional level. Inflammation, high iron stores, and transferrin saturation stimulate hepcidin expression, while anaemia/hypoxia, low iron stores and erythropoietic activity downregulate hepcidin expression. In Coronavirus disease-19 (COVID-19), different factors can affect iron homeostasis. Disturbances of iron metabolism are reported in these patients and are found to be predictors of disease severity and outcome. Iron homeostasis during infection is very important since both pathogens and host organisms need iron. During inflammation, inflammatory cytokines, namely interleukin 6 (IL-6), stimulate hepcidin expression. Hepcidin binds iron exporter ferroportin, causing its internalisation. This leads to iron retention in storage compartments and iron deprivation from pathogenic microorganisms. On the other hand, tissue hypoxia stimulates the expression of erythropoietin (EPO). EPO stimulates erythropoiesis and indirectly leads to inhibition of hepcidin expression. In some COVID-19 patients, inflammation and hypoxia are present simultaneously as signals with opposing effects on hepcidin expression. Studies have shown that hypoxia can overcome the effect of inflammation on hepcidin expression.

Aim: We hypothesised that hypoxia, when present in COVID-19 patients, can overcome the stimulating effect of inflammation on hepcidin expression and can cause decreased concentration of hepcidin in the peripheral circulation of hypoxic patients compared to COVID-19 patients with normal oxygen saturation. The main goal of the present study was to explore the difference in concentration of hepcidin and parameters that regulate hepcidin levels in groups of non-anaemic normoxic and hypoxic COVID-19 patients admitted to the emergency unit before the introduction of therapeutic interventions. Also, we wanted to explore the relationship of hepcidin concentration with parameters that influence hepcidin production: parameters of systemic inflammation (C-reactive protein (CRP), IL-6), the parameter of hypoxia (oxygen saturation (SpO₂)), parameters of erythropoiesis (reticulocyte number (RTC), immature reticulocyte fraction (IRF) and EPO concentration) and parameters of iron status (iron (Fe), unsaturated iron binding capacity (UIBC), total iron binding capacity (TIBC), transferrin saturation (TSAT), ferritin, soluble transferrin receptors (sTfR) and reticulocyte haemoglobin equivalent (RET-He)). Additionally, in order to identify representative surrogates that could indicate dysregulation of iron homeostasis in different patient groups, we applied ratios of

hepcidin concentration with parameters of iron metabolism (hepcidin/iron, ferritin/hepcidin), inflammation (hepcidin/CRP, hepcidin/IL-6), and erythropoiesis (EPO). Furthermore, ratios that interconnect and correlate different inflammatory parameters (CRP/IL-6, CRP/neutrophil leukocytes, CRP/lymphocytes, CRP/monocytes, IL-6/neutrophil granulocytes, IL-6/lymphocytes, IL-6/monocytes, neutrophil to lymphocyte ratio (NLR), neutrophil to monocyte ratio (NMR) and monocyte to lymphocyte (MLR)) were also used in order to distinguish subgroups of COVID-19 patients with different clinical presentations and disease outcomes.

Materials and methods: The study included 96 COVID-19 patients admitted to the emergency unit of the Department of Infectious Diseases and 47 healthy volunteers as a control group. SARS-CoV-2 positivity was confirmed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) from a nasopharyngeal swab. The inclusion criteria for both groups was age between 20 and 75 years. Strict exclusion criteria were applied to eliminate conditions and diseases that could affect hepcidin concentration and the concentration of other studied parameters. The control group met the same inclusion and exclusion criteria as the patient group except for SARS-CoV-2 positivity. Patients were categorised based on oxygen saturation (SpO₂) measured on admission as hypoxic (SpO₂ < 94 %) and normoxic (SpO₂ ≥ 94 %). Forty-seven hypoxic COVID-19 patients and 49 normoxic patients were matched by sex and age. Also, the healthy control group was matched by sex and age to COVID-19 patients. Additionally, COVID-19 patients were categorised based on prospective follow-up into groups according to the World Health Organization guidelines as patients with mild and moderate, severe and critical forms of the disease.

Demographic, clinical, and anamnestic data were collected upon patients' admission to the Department of Infectious Diseases emergency unit. SpO₂, complete blood count, and routine biochemical tests were analysed. Information on the course of the disease was prospectively monitored by reviewing the medical documentation in the hospital information system. Blood samples for the control group were collected in the Medical Laboratory Diagnostics Division. Haematological parameters (complete blood count (CBC), RTC, IRF, and RET-He) were analysed using the haematology analyser Sysmex XN-1000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). Plasma concentration of creatinine, iron, UIBC, ferritin, CRP and IL-6 was analysed by standard laboratory methods on analyser Roche Cobas 6000 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). sTfR concentration was measured nephelometrically on a BN ProSpec analyser (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany). Commercially available ELISA tests were used for the measurement of hepcidin and EPO concentrations: Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA (DRG Diagnostics GmbH, Marburg, Germany) and Quantikine® IVD®

Human Erythropoietin ELISA (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). SpO₂ was measured by an oximetric method on an ABL90 analyser FLEX PLUS (Radiometer, Copenhagen, Denmark). eGFR was calculated according to the CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) equation. TIBC and TSAT were calculated by the following equations: TIBC = iron (μmol/L) + UIBC (μmol/L); TSAT (%) = iron (μmol/L)/TIBC (μmol/L) × 100. Ratios of hepcidin with parameters of iron metabolism (ferritin/hepcidin, hepcidin/iron), inflammation (hepcidin/CRP, hepcidin/IL-6) and erythropoiesis (hepcidin/EPO) were calculated. Also, different ratios of inflammatory parameters were calculated: CRP/IL-6, CRP/neutrophil leukocytes, CRP/lymphocytes, CRP/monocytes, IL-6/neutrophil granulocytes, IL-6/lymphocytes, IL-6/monocytes, NLR, NMR and MNR.

Data analysis was performed using MedCalc statistical software version 20.013 (MedCalc Software, Ostend, Belgium).

Results: Hepcidin concentration was significantly higher in COVID-19 patients compared to healthy controls, and a higher concentration was found in the hypoxic patient group than in the normoxic group. Significantly higher ferritin levels were also found in COVID-19 patients, with higher values in the hypoxic group. Iron, TIBC, TSAT, RET-He, RTC, and IRF were lower, and sTfR was higher in normoxic and hypoxic patient groups than in healthy controls. UIBC and TIBC were lower, and IRF was higher in hypoxic COVID-19 patients than in normoxic patients. Compared to the normoxic patients and healthy volunteers, increased EPO concentration was found only in the hypoxic patient group. Inflammatory parameters CRP and IL-6 were both elevated in COVID-19 patients compared to the control group, and the highest concentrations were found in the hypoxic patients group. Elevated values of ferritin/hepcidin and hepcidin/iron ratios were found in the hypoxic compared to the normoxic group, while hepcidin/CRP, hepcidin/IL-6 ratios were lower in hypoxic compared to the normoxic group. No difference in hepcidin/EPO value was observed between normoxic and hypoxic patient groups. Hepcidin concentration was positively correlated with CRP and IL-6 levels in the normoxic patient group. At the same time, a weak positive correlation with CRP and no correlation with IL-6 was found in the hypoxic patient group. Positive correlation with ferritin was observed in both patient groups, while no correlation of hepcidin with SpO₂ and EPO was found.

When patients were classified by disease severity based on prospective follow-up, hepcidin concentration was significantly higher in all patient groups than in healthy individuals. Higher hepcidin levels were found in severe and critical patients compared to mild and moderate patients. However, no significant difference was observed between severe and critical patients. Similarly, concentrations of ferritin, CRP, IL-6, and EPO were higher in severe and critical

patient groups compared to the mild and moderate group. No significant difference was found between disease severity groups for iron concentration, TSAT, sTfR, RET-He, and RTC. UIBC, TIBC, hepcidin/CRP and hepcidin/IL-6 were lower, and IRF, ferritin/hepcidin and hepcidin/iron values were higher in severe and critical patients compared to mild and moderate patient group. IL-6 and EPO concentration and hepcidin/EPO value significantly differed between severe and critical groups of patients.

The results of the univariate logistic regression analysis indicated an increased odds ratio for the development of a critical form of COVID-19 for hepcidin, EPO, CRP, IL-6, ferritin/hepcidin and hepcidin/iron ratios. On the other hand, a reduced odds ratio for developing a critical form of COVID-19 was found for UIBC and TIBC. In multiparametric logistic regression analysis, a model was obtained that included the combination of EPO and the ferritin/hepcidin ratio as parameters that proved to be the best predictors of disease severity in univariate regression analysis. The resulting model had an AUC of 0.838 (0.749 – 0.906) with 88 % correctly classified cases.

A lower total leukocyte number was found in hypoxic patients compared to normoxic COVID-19 patients and healthy controls. Also, a lower total leukocyte number was found in the mild and moderate patient groups compared with patients with severe and critical course of the disease and healthy controls. This finding is a result of the presence of neutrophilia and more pronounced lymphopenia in patients with a more severe form of the disease. In addition, a lower absolute number of monocytes and eosinophils was found in COVID-19 patients compared to healthy controls. The value of MLR was higher in COVID-19 patients, with no difference between the hypoxic and normoxic patient groups. NMR and CRP/IL-6 ratios were higher in hypoxic patients compared to normoxic patients and healthy controls, but no difference was observed between hypoxic and normoxic patient groups. All other ratios of inflammatory parameters were the highest in hypoxic COVID-19 patients, with higher values measured in normoxic patients compared to healthy controls. On the other hand, when patients were prospectively divided into groups according to the disease severity, values for MLR and CRP/IL-6 were the highest in the group of patients with a severe form of COVID-19, while values for NLR, NMR, CRP/neutrophil granulocytes, CRP/lymphocytes and CRP/monocytes were the highest and similar to each other in severe and critical patients with COVID-19. The highest values of the IL-6 ratio with leukocyte subgroups (IL-6/neutrophil granulocytes, IL-6/lymphocytes and IL-6/monocytes) were found in the critical patient group.

Conclusions: This is the first study that investigated the simultaneous presence of inflammation and hypoxia in non-anaemic COVID-19 patients selected based on rigorous exclusion criteria

to eliminate conditions and comorbidities that could influence hepcidin concentration and concentration of other iron metabolism parameters. Also, hepcidin/iron and hepcidin/EPO ratios were measured in COVID-19 patients for the first time. Hepcidin/IL-6 ratio was introduced to observe hepcidin concentration normalised to the level of inflammation. Similar results were also obtained with the hepcidin/CRP ratio that was already used in some studies. Additionally, different ratios of inflammatory parameters were calculated as it was shown that they are valuable in recognising the disease severity and predicting the outcomes of the disease. Inflammatory ratios IL-6/neutrophil granulocytes and IL-6/monocytes were applied in COVID-19 patients for the first time, while other inflammatory ratios were used previously in some studies on COVID-19 patients.

This research showed that in patients with COVID-19 the hypoxic signal was not strong enough to overcome the stimulating effect of inflammation on hepcidin concentration. The presence of more pronounced systemic inflammation probably overcame the influence of hypoxia on hepcidin concentration, which can explain elevated hepcidin concentration in hypoxic compared to normoxic COVID-19 patients. However, hepcidin concentration in hypoxic patients was not proportional to the level of systemic inflammation. The positive correlation of hepcidin with IL-6 observed in normoxic patients was not present in the group of hypoxic subjects. This study provides insight into the hepcidin concentration in different clinical settings where antagonistic signals that regulate hepcidin concentration are simultaneously present. The results of this doctoral thesis contribute to a better understanding of the complex relationships between hepcidin and other parameters of iron metabolism, hypoxia, inflammation, and erythropoiesis. However, the challenge for the future is to apply the obtained results for potential new diagnostic, prognostic, and/or therapeutic purposes not only in SARS-CoV-2 virus infection but also in various other infectious and inflammatory conditions and diseases.

Keywords: COVID-19, hepcidin, iron, ferritin, erythropoietin, interleukin 6, hypoxia, inflammation

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Hepcidin	1
1.1.1. Struktura i biološka uloga hepcidina	1
1.1.2. Regulacija ekspresije hepcidina	3
1.1.3. Nutricijska imunost	14
1.2. COVID-19	17
1.2.1. Definicija i epidemiologija COVID-19	17
1.2.2. Klasifikacija i dijagnostička procjena bolesti	19
1.2.3. Patogeneza bolesti	22
1.2.4. Promjene u metabolizmu željeza kod COVID-19	25
2. OBRAZLOŽENJE TEME	27
3. MATERIJALI I METODE	29
3.1. Ispitanici	29
3.2. Uzorci	30
3.3. Metode	31
3.4. Statistička analiza	32
4. REZULTATI	34
4.1. Opće karakteristike ispitanika	34
4.2. Parametri metabolizma željeza, eritropoetske aktivnosti i upale kod zdravih ispitanika, svih ispitanika s COVID-19 te normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19	40
4.2.1. Parametri metabolizma željeza i eritropoetske aktivnosti te omjeri hepcidina s parametrima metabolizma željeza i eritropoeze	40
4.2.2. Parametri upale te omjeri s upalnim parametrima	47
4.3. Parametri metabolizma željeza, eritropoetske aktivnosti i upale kod zdravih ispitanika i ispitanika s COVID-19 podijeljenih prospektivnim praćenjem u skupine prema težini bolesti	53
4.3.1. Parametri metabolizma željeza i eritropoetske aktivnosti te omjeri hepcidina s parametrima metabolizma željeza i eritropoeze	53
4.3.2. Parametri upale te omjeri s upalnim parametrima	60
4.4. Povezanost hepcidina s parametrima metabolizma željeza, eritropoeze, hipoksije i upale	66

4.5. Povezanost hepcidina s ishodima bolesti (vrijeme hospitalizacije i potreba za mehaničkom ventilacijom).....	70
4.6. Predviđanje razvoja kritičnog oblika COVID-19.....	71
5. RASPRAVA.....	76
6. ZAKLJUČCI.....	90
7. LITERATURA.....	92
8. POPIS KRATICA.....	108
9. ŽIVOTOPIS.....	113
10. PRILOG.....	115

1. UVOD

1.1. Hecpidin

1.1.1. *Struktura i biološka uloga hepcidina*

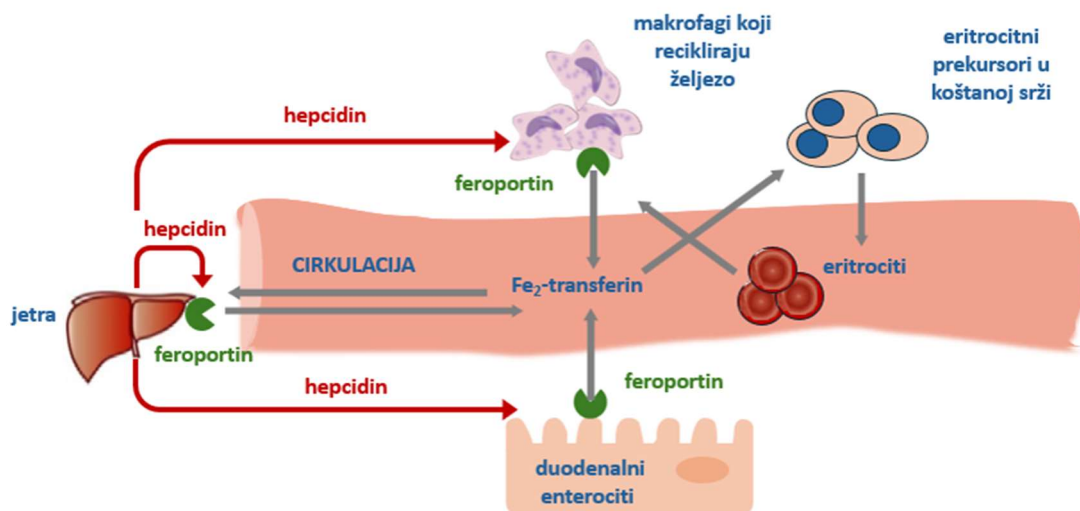
Glavni regulator sustavne homeostaze željeza je hepcidin. Hecpidin je otkriven prilikom ispitivanja antimikrobnih svojstava tjelesnih tekućina. Ovaj peptid izoliran je istovremeno iz humane mokraće te je nazvan hepcidin prema mjestu sinteze u hepatocitima (hep-) i prema antibakterijskim svojstvima (-cidin) te u ultrafiltratu humane plazme i nazvan je antimikrobni peptid 1 eksprimiran u jetri (LEAP-1, engl. *liver expressed antimicrobial peptide*) (1, 2). Hecpidin ima bakteriostatsku aktivnost prema većem broju mikroorganizama (*Echerichia coli*, *Staphilococcus aureus*, *Staphilococcus epidermidis*, *Streptococcus* spp.) te antigljivičnu aktivnost (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigates*) (1). Prilikom istraživanja jetrenog odgovora na nakupljanje željeza otkrivena je uloga hepcidina u regulaciji homeostaze željeza. Ispitivanjem ekspresije jetrenih gena kod miševa izloženih suvišku željeza nađena je povećana ekspresija mRNA za hepcidin (3).

HAMP gen koji kodira za hepcidin kod ljudi smješten je na 19. kromosomu i eksprimiran je prvenstveno u jetri, no ekspresija je zabilježena i u srcu, plućima, makrofagima, adipocitima, mozgu, leđnoj moždini, crijevima, želucu, gušterači, skeletnim mišićima i testisima. Hecpidin se sintetizira kao preprohepcidin, peptid od 84 aminokiseline, čijim kidanjem nastaje prohepcidin, peptid od 60 aminokiselina (4). Djelovanjem prohormon konvertaze furina na prohepcidin uklanja se proregija i nastaje hepcidin (5). Poznata su tri oblika hepcidina koja se razlikuju po broju aminokiselinskih ostataka: hepcidin-25, hepcidin-22 i hepcidin-20 (6). Biološki aktivan oblik hepcidina je hepcidin-25, koji sadrži osam cisteinskih ostataka povezanih disulfidnim vezama. Molekula hepcidina ima strukturu jednostavne ukosnice stabiliziranu s četiri disulfidne veze između antiparalelnih lanaca (8). Cisteinski ostatci povezani su na sljedeći način Cys1-Cys-8, Cys3-Cys6, Cys2-Cys4, Cys5-Cys7 (7).

Dio aktivnog oblika hepcidina u cirkulaciji vezan je za plazmatski protein α 2-makroglobulin (8). Međutim, točan odnos slobodnog i vezanog aktivnog oblika hepcidina još nije poznat (9). Hecpidin se izlučuje iz organizma uglavnom putem bubrega zbog male molekulske mase i malog promjera. U fiziološkim uvjetima koncentracija hepcidina izlučena mokraćom korelira sa serumskom koncentracijom (10). Međutim, pokazalo se da izlučivanje hepcidina putem mokraće iznosi samo 0 - 5 % od njegove plazmatske koncentracije (11).

Hepcidin filtriran u glomerulima vjerojatno se reapsorbira i razgrađuje u bubrežnim tubulima te se jedan mali dio u konačnici izlučuje mokraćom (10). Koncentracija hepcidina negativno korelira s procijenjenom glomerularnom filtracijom kod bubrežnih bolesnika što ukazuje na važnost eliminacije hepcidina ovim putem (12). Drugi mogući način uklanjanja hepcidina je dešava se pri vezanju hepcidina na njegovi funkcionalan receptor feroportin (10, 13).

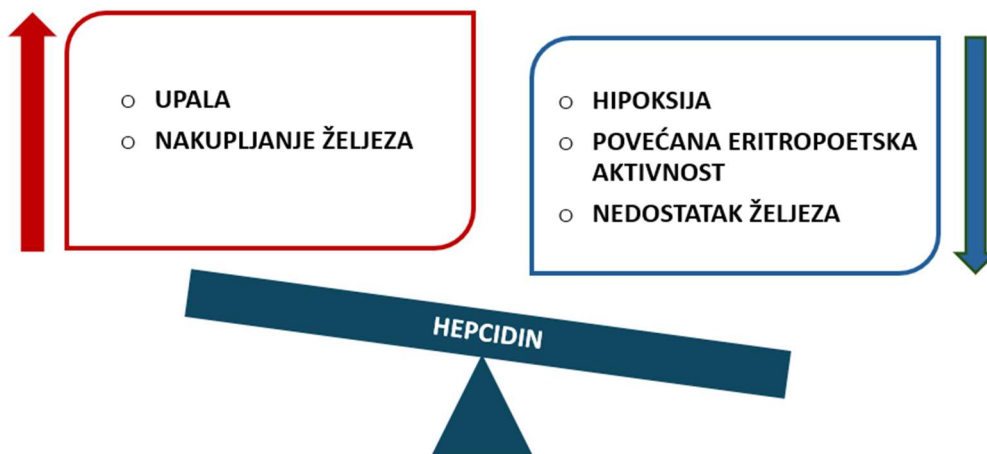
Apsorpcija i raspodjela željeza u organizmu kontrolirani su interakcijom hepcidina s feroportinom (14). Feroportin je jedini poznati protein koji iznosi željezo iz stanica. Ekspimiran je u tkivima uključenim u pohranu i transport željeza: na bazolateralnoj membrani duodenalnih enterocita koji sudjeluju u apsorpciji željeza iz probavnog sustava, citoplazmatskoj membrani makrofaga retikuloendotelnog sustava (RES) koji recikliraju željezo iz eritrocita, membrani hepatocita koji pohranjuju željezo i stanicama posteljice koje sudjeluju u prijenosu željeza fetusu. Uklanjanjem feroportina sa stanične membrane sprječava se izlazak željeza iz makrofaga RES-a, hepatocita i enterocita u cirkulaciju (15). Vezanje hepcidina za feroportin dolazi do njegove konformacijske promjene, što uzrokuje vezanje i autofosforilaciju Janus kinaze 2 (JAK2) te fosforilaciju feroportina (16). Time dolazi do uklanjanja feroportina sa stanične membrane endocitozom te do njegove razgradnje u lizosomima djelovanjem lizosomalnih hidrolaza (17).



Slika 1. Regulacija homeostaze željeza interakcijom hepcidina s feroportinom.

1.1.2. Regulacija ekspresije hepcidina

Ekspresija hepcidina regulirana je na transkripcijskoj razini. Glavni regulatori ekspresije hepcidina su status željeza (rezerve željeza i plazmatsko željezo), upala, hipoksija, anemija te eritroidni čimbenici (18, 19). Povećana količina željeza u jetrenom tkivu, povećano zasićenje transferina (TSAT) i upala potiču ekspresiju hepcidina. Ekspresiju hepcidina smanjuju nedostatak željeza u skladištima i smanjen TSAT, hipoksija i eritropoetska aktivnost. Pokazalo se da ekspresiju hepcidina u jetri mogu inhibirati i drugi čimbenici, primjerice epidermalni faktor rasta, faktor rasta hepatocita, faktor tumorske nekroze alpha (TNF- α , engl. *tumor necrosis factor alpha*), estrogen i testosteron. Međutim, uloga ovih mehanizama nije u potpunosti jasna (20).

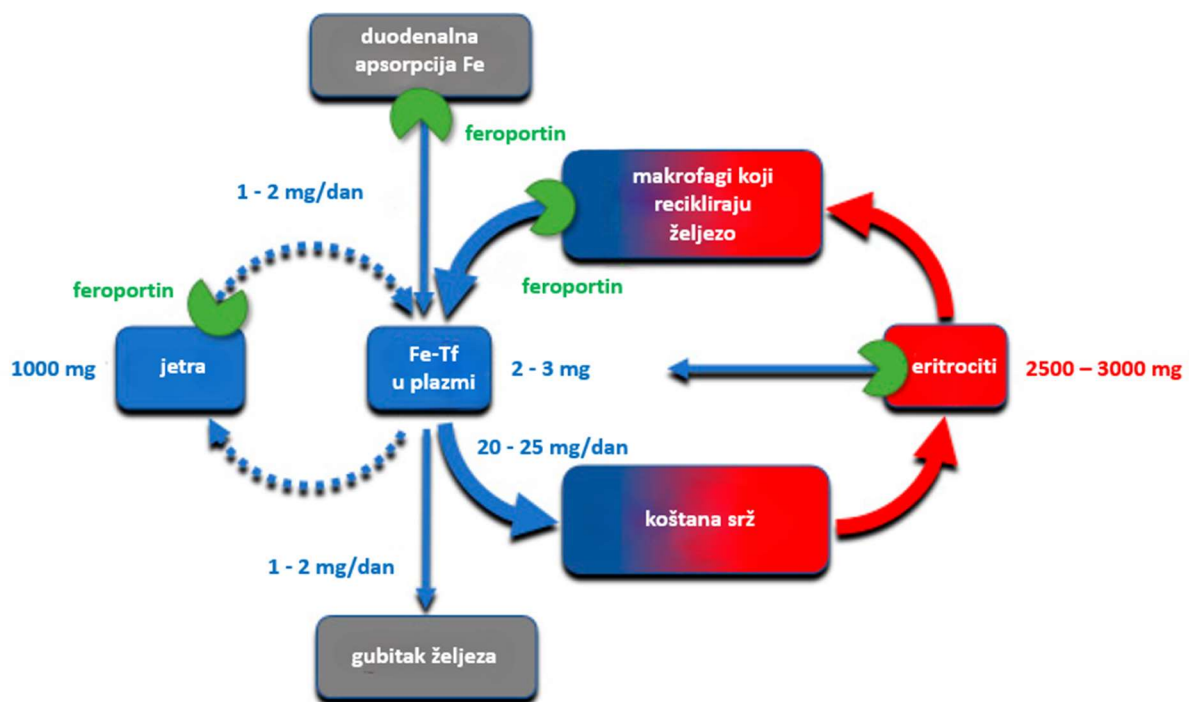


Slika 2. Čimbenici koji reguliraju ekspresiju hepcidina

1.1.2.1. Regulacija ekspresije hepcidina statusom željeza

Željezo je esencijalni element neophodan za odvijanje brojnih procesa u stanicama. Sastavni je dio hemoproteina koji transportiraju kisik (hemoglobin, mioglobin) te raznih enzima. Međutim, suvišak željeza može biti potencijalno toksičan. Nedostatak ili suvišak željeza ima ulogu u razvoju raznih patofizioloških procesa kod ljudi. Homeostaza željeza stoga je strogo kontrolirana kako bi se spriječio njegov nedostatak ili suvišak u organizmu (20).

Hepcidin je glavni regulator homeostaze željeza u organizmu i njegova ekspresija regulirana je mehanizmom povratne sprege statusom željeza. Ekspresiju hepcidina regulira količina željeza u skladištima, odnosno količina rezervnog željeza u jetri, te količina željeza u cirkulaciji, odnosno TSAT (21).



Slika 3. Raspodjela željeza u organizmu. Preuzeto i prilagođeno prema Nemeth i Ganz, 2021. (14).

Organizam odrasle osobe sadrži oko 3 – 4 g željeza. Najveće količine željeza u organizmu nalaze se u eritrocitima i eritroidnim prekursorima (oko 2 - 3 g željeza), dok se oko 1 g željeza nalazi u hepatocitima u obliku feritina. Oko 0,5 g željeza nalazi se u makrofagima slezene te se oko 0,3 g nalazi kao sastavni dio mioglobina i drugih enzima. Iako je željezo jedan od najzastupljenijih elemenata u zemljinoj kori, biološka dostupnost trovalentnog oblika željeza je mala. Stoga organizam osigurava velik dio željeza recikliranjem (14).

Dnevno se gubi od 1 do 2 mg željeza ljuštenjem epitelnih stanica kože i epitela crijeva. Željezo se u cirkulaciji prenosi vezano za prijenosni protein transferin koji predstavlja prijelazni oblik željeza. 20 – 45 % transferina u normalnim uvjetima zasićeno je željezom. Količina željeza koja se nalazi u plazmi vezana za transferin iznosi 2 – 3 mg željeza, međutim dnevne potrebe stanica za željezom su znatno veće (20 – 25 mg), što znači da se plazmatski udjeljaka željeza izmjeni oko 10 puta dnevno. Makrofagi RES-a koji recikliraju željezo iz eritrocita glavni su izvor željeza za dnevne potrebe organizma, dok se manji dio željeza (1 do 2 mg dnevno) osigurava apsorpcijom iz probavnog sustava (14).

Prilikom apsorpcije u probavnom sustavu anorgansko željezo reducira se iz trovalentnog u dvovalentan oblik djelovanjem duodenalnog citokroma B (DyctB) te se potom apsorbira na apikalnoj membrani u citoplazmu duodenalnih enterocita putem prijenosnika 1 dvovalentnih metala (engl. *divalent metal transporter 1*, DMT1). Organski oblik željeza, hemska željezo, apsorbira se na apikalnoj membrani enterocita putem proteina 1 koji prenosi hem (HCP1, engl. *heme-carrier protein 1*). Djelovanjem oksigenaze 1 hema (HO-1) u duodenalnim enterocitima željezo se oslobađa iz protoporfirinskog prstena. Željezo se potom može pohraniti u obliku feritna ili se može prenijeti putem ferroportina u cirkulaciju preko bazolateralne strane enterocita. Prilikom bazolateralnog prijenosa dolazi do oksidacije dvovalentnog u trovalentni oblik željeza djelovanjem feroksidaze hefestina u duodenumu i ceruloplazmina u drugim tkivima (22).

Željezo se prenosi u plazmi vezano za glikoprotein transferin. Transferin se sastoji od dvije globularne domene od koje svaka veže jedan ion trovalentnog željeza (23, 24). U stanjima nakupljanja željeza u plazmi se može naći i željezo vezano za druge molekule s kojima je vezano manjim afinitetom. Frakcija željeza koja nije vezana za transferin (NTBI, engl. *non-transferin binding iron*) vrlo je reaktivna i može katalizirati reakcije u kojima nastaju slobodni radikali te time pridonijeti oštećenju DNA, proteina i lipida (25). Unos željeza u stanice odvija se vezanjem transferina za tip 1 transferinskog receptora (TfR1) na membrani stanice. Regulacijom ekspresije TfR1 stanice kontroliraju unos željeza s obzirom na svoje potrebe. Poznata su dva tipa transferinskih receptora, TfR1 i tip 2 transferinskog receptora (TfR2), koja se razlikuju po svojoj funkciji i ekspresiji na različitim stanicama. Ekspresija TfR1 prisutna je na svim stanicama, no ekspresija je najizraženija na eritroidnim prekursorima, stanicama koje se brzo dijele i stanicama posteljice (26, 27). U cirkulaciji su također prisutni topljivi transferinski receptori (sTfR) koji nastaju proteolitičkom razgradnjom izvanstanične domene membranskog receptora TfR1. Koncentracija sTfR u plazmi ukazuje na eritropoetsku aktivnost budući da ovisi o broju stanica koje ekspimiraju TfR1, ali također je i odraz dostupnosti željeza

stanicama jer se kod snižene dostupnosti željeza kompenzacijski povećava ekspresija TfR1 (28). TfR2 eksprimiran je na hepatocitima, hematopoetskim stanicama, te stanicama duodenalnih kripti te se njegova ekspresija preklapa s ekspresijom proteina nasljedne hemokromatoze (HFE, engl. *hereditary hemochromatosis protein*) (29). Interakcija TfR2 s HFE-om i transferinom bitna je u regulaciji transkripcije hepcidina (30, 31).

Kada je količina željeza u stanicama povećana, suvišak se pohranjuje u obliku feritina kako bi se spriječilo toksično djelovanje željeza (32). Feritin ima molekulsku masu 450000 Da i građena je od teških ili srčanih H (engl. *heavy, heart*) te lakih ili jetrenih L (engl. *light, liver*) podjedinica. Globularnu strukturu molekule feritina čine 24 podjedinice, pri čemu se omjer H i L podjedinica razlikuje u različitim tkivima te u različitim stanjima kao što je primjerice upala. H podjedinica dominantna je u tkivu srca i bubrega, dok je L podjedinica zastupljenija u tkivu jetre i slezene. U stanjima upale raste udio H podjedinica u molekuli feritina u odnosu na udio L podjedinica (33). H podjedinica ima feroksidaznu aktivnost koja je potrebna za ugradnju željeza u stanicu, dok L podjedinica sudjeluje u mineralizaciji (34). Željezo pohranjeno u obliku feritina je biološki dostupno te se oslobađa po potrebi (35 – 37). Sinteza feritina regulirana je statusom željeza. U netranslatirajućoj regiji na 5' kraju (5'-UTR, engl. *5' untranslated region*) mRNA za feritin nalazi se element koji odgovara na željezo (IRE, engl. *iron-responsive element*). Vezanjem proteina koji odgovaraju na željezo (IRP, engl. *iron-responsive protein*), IRP1 i IRP2, za IRE regulirana je translacija mRNA raznih proteina uključenih u metabolizam željeza. U prisutnosti željeza IRP1 i IRP2 ne stupaju u interakciju s IRE-om. Međutim, kod nedostatka željeza dolazi do vezanja IRP1/2 za IRE te regulacije transkripcije mRNA i sinteze proteina. Vezanje IRP1/2 za IRE na netranslatirajućoj regiji na 3' kraju (3'-UTR, engl. *5' untranslated region*) potiču se transkripcija mRNA i sinteza proteina, dok se vezanjem IRP1/2 za IRE na 5'-UTR inhibira translacija. IRE u 3'-UTR-u nalazi se u mRNA za TfR1 i DMT1, a u 5'-UTR-u IRE sadrže mRNA za feritin, ferroportin i faktor 2 alpha induciran hipoksijom (engl. *hypoxia inducible factor 2 alpha*, HIF2 α) (38). Osim statusom željeza, sinteza feritina regulirana je djelovanjem upalnih citokina (33). Većina feritina nalazi se u citoplazmi stanica, no manje količine nađene su i u staničnoj jezgri i u mitohondrijima (39, 40). Feritin je također prisutan u cirkulaciji no njegova točna biološka uloga nije jasna. Koncentracija feritina u cirkulaciji u fiziološkim uvjetima ukazuje na količinu tkivnih rezervi željeza. Međutim, iznimka su upalna stanja u kojima je potaknuta sinteza feritina i stanja u kojima se količina željeza u makrofagima značajno razlikuje u odnosu na količinu u parenhimskom tkivu (41). Smatra se da bi feritin mogao imati aktivnu ulogu u modulaciji upalnih procesa ostvarujući svoj učinak imunosupresivnim ili upalnim djelovanjem, međutim ovi učinci tek trebaju biti razjašnjeni (42).

Dva glavna signalna puta regulacije ekspresije hepcidina u jetri statusom željeza su interakcijom HFE/TfR2 te koštani morfogenijski protein (BMP, engl. *bone morphogenic protein*)/SMAD (engl. *sons of mothers against decapentaplegic*) (43). U promotorskoj regiji *HAMP* gena nalazi se element koji odgovara na BMP (BMP-RE, engl. *BMP responsive element*) (44). BMP-ovi su dio obitelji citokina transformirajućeg faktora rasta beta (TGF- β , engl. *transforming growth factor beta*). Regulacija ekspresije hepcidina ovim putem ovisna je o BMP6 i proteinu hemojuvelinu (HJV) koji je vezan na membranu pomoću glikozil-fosfatidilinozitola. Kod povećane količine željeza u tkivu endotelne sinusoidalne stanice jetre detektiraju prisutno željezo te aktiviraju transkripcijske faktore koji potiču ekspresiju BMP6. Izlučeni BMP6 veže se za odgovarajuće receptore i koreceptor HJV na membrani hepatocita. Time dolazi do fosforilacije unutarstaničnih transkripcijskih faktora SMAD1, SMAD5 i SMAD8 koji zajedno sa SMAD4 induciraju transkripciju *HAMP* gena (43, 45). Prijenos signala BMP ligandima u fiziološkim uvjetima zahtijeva prisutnost koreceptora. Istraživanja su pokazala da HJV ima najveći afinitet za BMP6 među koreceptorskim molekulama (46). Ekspresija HJV-a dokazana je u srcu, mišićima i jetri (47). Osim HJV-a koji je povezan s membranom, dokazan je i topljivi oblik HJV-a (sHJV, eng. *soluble hemojuvelin*) za kojeg se pokazalo da može inhibirati signalni put BMP/SMAD te ekspresiju hepcidina (48, 49). Proprotein konvertaza furin i transmembranska serinska proteaza matriptaza-2 koju kodira *TMPRSS6* gen mogu kidati HJV i dovesti do nastanka sHJV-a (50 – 52). Također, pokazalo se da protein neogenin stupa u interakciju s HJV-om i matriptazom-2. Neka istraživanja ukazuju da bi neogenin mogao imati ulogu u signalnom putu BMP/SMAD, no točna funkcija neogenina u regulaciji ekspresije hepcidina još nije jasna (53 – 55). Osim regulacijom količinom željeza u jetrenom tkivu, ekspresija hepcidina regulirana je također plazmatskim željezom. Istraživanje na miševima pokazalo je da povećana koncentracija željeza u plazmi u odsutnosti povećane količine željeza u jetrenom tkivu potiče fosforilaciju SMAD1/5/8 transkripcijskih faktora u odsutnosti porasta ekspresije BMP6 (56). Točan signalni put regulacije hepcidina plazmatskim željezom, odnosno zasićenjem transferina nije u potpunosti razjašnjen, no poznato je da uključuje HFE, TfR2 i HJV (57). Na ulogu ovih molekula u regulaciji hepcidina ukazuje podatak da mutacije u genima za ove molekule uzrokuje pojedine tipove hemokromatoze kod kojih je koncentracija hepcidina u krvi bolesnika snižena unatoč nakupljanju željeza u organizmu (43). Dva tipa transferinskih receptora TfR1 i TfR2 te membranski protein HFE sudjeluju u detekciji holotransferina, molekule transferina na kojoj je na oba vezna mjesta vezano željezo. HFE ima sposobnost vezanja i TfR1 i TfR2. Međutim, vezna mjesta na molekuli HFE-a za ove TfR-ove se razlikuju (58). Vezanje holotransferina stabilizira molekulu TfR2, koja

vjerojatno funkcionira kao senzor plazmatskog željeza (41). Holotransferin se natječe s HFE za vezna mjesta na TfR1 te kod visokog TSAT-a HFE otpušta TfR1 i veže se za vezno mjesto na TfR2 domenom različitom od one uključene u vezanje s TfR1. Ova interakcija vodi ka aktivaciji transkripcije gena za hepcidin (29, 30).

1.1.2.2. Regulacija ekspresije hepcidina upalom

Prilikom upale dolazi do sinteze upalnih citokina koji potiču ekspresiju hepcidina u jetri (59). Prilikom *in vitro* stimulacije humanih hepatocita snažna indukcija mRNA za hepcidin bila je potaknuta interleukinom 6 (IL-6), ali ne s IL-1 i TNF- α , što je ukazalo da bi IL-6 mogao biti glavni medijator ekspresije hepcidina kod upale (60). IL-6 je pleiotropni citokin koji ima upalnu ulogu, ali također i imunomodulacijsko djelovanje. Reaktant je akutne faze te stimulira sintezu proteina u jetri. Potiče diferencijaciju limfocita B u plazma stanice te potiče proliferaciju i diferencijaciju T limfocita (61). Sintetiziraju ga makrofagi, endotelne stanice i limfociti T, ali i razne druge stanice. Poremećena regulacija ili pretjerana ekspresija IL-6 ima ulogu u i patogenezi raznih bolesti (62). IL-6 djeluje na ekspresiju hepcidina signalnim putem JAK2/prenositelj signala i aktivator transkripcije 3 (STAT3, engl. *signal transducer and activators of transcription 3*). Nakon fosforilacije STAT3 dolazi do njegove translokacije u jezgru i vezanja sa vezno mjesto za STAT3 u promotorskoj regiji *HAMP* gena čime se povećava ekspresija hepcidina (63).

Tretiranje hepatocita *in vitro* lipopolisaharidom dovelo je do ekspresije hepcidina, a ekspresija je inhibirana primjenom monoklonskih antitijela na IL-6, dok primjenom antitijela na TNF- α nije zabilježen ovaj učinak. To ukazuje da je za stimulaciju ekspresije hepcidna lipopolisaharidom potrebna prisutnost IL-6. Nadalje, eksperimentalna primjena IL-6 infuzijom na malom broju ispitanika dovela je do snažnog porasta serumske koncentracije IL-6 kod ispitanika koji je bio praćen brzim porastom koncentracije hepcidina u mokraći. Također, došlo je do brzog pada koncentracije željeza u serumu i TSAT-a u odnosu na vrijednosti prije primjene IL-6 (64).

Porast hepcidina tijekom upale uzrokuje zadržavanje željeza u stanicama i smanjenje izvanstanične koncentracije željeza (64, 65). Uklanjanje željeza iz izvanstaničnih prostora jako je važno radi uskraćivanja željeza patogenim mikroorganizmima (66). Budući da plazmatsko željezo čini mali dio ukupne količine željeza u organizmu, ovaj odjeljak željeza obnovi se desetak puta dnevno otpuštanjem željeza iz makrofaga RES-a. Blokiranje otpuštanja željeza iz makrofaga stoga vrlo brzo dovodi da pada plazmatske koncentracije željeza. U stanju smanjene dostupnosti željeza u izvanstaničnim prostorima smanjuje se opskrba eritroidnih prekursora kojima je željezo neophodno za sintezu hemoglobina (64). Budući da najveće dnevne količine željeza troše upravo eritroidni prekursori, smanjena dostupnost željeza, odnosno funkcionalni nedostatak željeza u ovim stanjima, vodi ka razvoju anemije upale (67).

1.1.2.3. Regulacija ekspresije hepcidina hipoksijom

Hipoksija također potiskuje ekspresiju hepcidina, no upitan je izravan doprinos hipoksije na regulaciju hepcidina. Hipoksija djeluje na ekspresiju brojnih gena uključenih u metabolizam željeza. Prilikom hipoksije dolazi do stabilizacije HIF-a. U stanju odsutnosti hipoksije HIF1 α i HIF2 α smješteni su u citoplazmi stanica gdje se proteolitički razgrađuju. Poticaj za njihovu razgradnju je hidroksilacija prolinskih ostataka djelovanjem enzima prolil-hidroksilaze. Kod hipoksije inhibirane su prolil-hidroksilaze koje posreduju u razgradnji te se HIF-ovi nakupljaju i prenose se u staničnu jezgru gdje se vežu za HIF1 β (68). Nastali kompleks veže se za element koji odgovara na stanje hipoksije (HRE, engl. *hypoxia responsive element*), a koji je prisutan u regulacijskim sljedovima ciljnih gena čiju transkripciju kontrolira. Gen za eritropoetin (EPO) sadrži HRE te je u stanju hipoksije potaknuta ekspresija gena za EPO (69).

Hipoksija na ovaj način neizravno potiskuje ekspresiju hepcidina, što su potvrdile i studije na humanim modelima. U istraživanju na zdravim dobrovoljcima koji su izloženi uvjetima hipoksije na visokoj nadmorskoj visini s i bez prethodne suplementacije željezom prisutnost hipoksije bila je praćena padom plazmatske koncentracije hepcidina dok još nisu uočene promjene u koncentraciji parametara statusa željeza. Kod skupine ispitanika kod kojih su prethodno primijenjeni intravenski preparati željeza također je došlo do pada koncentracije hepcidina, iako s odgodom nakon što je uočen pad TSAT-a, dok koncentracija feritina još nije bila promijenjena. Autori su zaključili da potiskivanje ekspresije hepcidina kod ovih ispitanika nije bilo posredovano smanjenjem razine željeza u skladištima (70). U drugoj studiji gdje su ispitanici izloženi akutnim i kroničnim uvjetima hipoksije na visokoj nadmorskoj visini učen je brzi porast koncentracije EPO-a, dok je pad razine hepcidina uočen nakon 1 - 2 dana od akutnog izlaganja uvjetima hipoksije. U studiji je također uočen brz pad koncentracije serumskog feritina koji je u svim točkama mjerenja korelirao s koncentracijom hepcidina te su autori zaključili da je koncentracija željeza ili dinamika njegovog korištenja vjerojatno pridonijela potiskivanju ekspresije hepcidina kod ovih ispitanika (71). Međutim, rezultati ovih istraživanja ne potvrđuju da li je potiskivanje ekspresije hepcidina hipoksijom izravno ili je posredovano drugim mehanizmima.

Pojedina istraživanja ukazala su da bi transkripcijski faktori HIF mogli izravno djelovati na potiskivanje ekspresije hepcidina vežući se na HRE u promotorskoj regiji *HAMP* gena (68). Također, *in vitro* studije su ukazale da bi hipoksija mogla inhibirati ekspresiju hepcidina poticanjem ekspresije *TMPRSS6* gena djelovanjem transkripcijskih faktora HIF. Transmembranska serinska proteaza 6 (TMPRSS6, engl. *transmembrane serine protease 6*)

potiče kidanje HJV-a te smanjuje odgovor promotorske regije *HAMP* gena na BMP (72). Nadalje, pojedina istraživanja ukazuju da bi trombocitni faktor rasta BB (PDGF-BB, engl. *platelet derived growth factor BB*) mogao imati ulogu u potiskivanju ekspresije hepcidina hipoksijom. Povišene vrijednosti PDGF-BB-a nađene su kod ispitanika izloženih eksperimentalnim uvjetima hipoksije gdje je porast bio proporcionalan padu koncentracije hepcidina te su rezultati potvrđeni na mišjem modelu gdje je izlaganje hipoksiji bilo praćeno padom ekspresije mRNA za hepcidin u jetrenom tkivu te porastom serumske koncentracije PDGF-BB-a (73).

1.1.2.4. Regulacija ekspresije hepcidina anemijom i eritroidnim čimbenicima

Snižena razina hepcidina nađena je kod raznih oblika anemije, primjerice anemije zbog nedostatka željeza, hemolitičke anemije te anemije zbog neučinkovite eritropoeze. Međutim, mehanizmi koji reguliraju ekspresiju hepcidina kod ovih oblika anemija su različiti. S jedne strane anemija uzrokuje tkivnu hipoksiju koja može djelovati inhibirajuće na ekspresiju hepcidina. Također, pojačana eritropoeza kao kompenzacijski odgovor na prisutnu anemiju može dovesti do lučenja raznih molekula od strane eritroidnih prekursora za koje je uočeno da djeluju na ekspresiju hepcidina. Pored toga, uslijed pojačane eritropoeze povećavaju se i potrebe za željezom budući da najveće količine željeza koriste upravo eritroidni prekursori za sintezu hemoglobina(10).

U anemiji tkivna hipoksija uzrokuje porast EPO-a (74). EPO je hormon koji stimulira eritropoezu omogućavajući preživljenje i proliferaciju eritroidnih prekursora (75). Sintetiziraju ga bubrežne peritubularne stanice na poticaj hipoksije. Gen za EPO sadrži sljedove koji su regulirani djelovanjem HIF2 α (76). Pri tome dolazi do potiskivanja ekspresije hepcidina kako bi se osiguralo željezo za eritropoetske potrebe. Pad koncentracije hepcidina omogućava izlazak željeza iz RES-a i apsorpciju željeza preko duodenalnih enterocita. Najveću potrebu za željezom imaju eritroidni prekursori koji koriste željezo za sintezu hemoglobina (77). Međutim, anemija vjerojatno ne djeluje izravno na smanjenje sinteze hepcidina, već neizravno putem povećane eritropoetske aktivnosti, što je i dokazano u studijama provedenim na miševima kod kojih je bila prisutna anemija zbog gubitka krvi ili hemolitička anemija (78).

Inhibicija eritropoeze citotoksičnim agensima ili zračenjem nije dovela do potiskivanja ekspresije hepcidina, što ukazuje da je za potiskivanje ekspresije hepcidina nužna prisutnost učinkovite eritropoeze (79). U prilog tome govori i činjenica da kod bolesnika s talasemijom gdje je prisutna neučinkovita no izrazito stimulirana eritropoeza, eritropoeza nadvladava učinak regulacije statusom željeza na ekspresiju hepcidina te dolazi do nakupljanja željeza u organizmu (80).

Istraživanja su pokazala da bi u regulaciji ekspresije hepcidina eritropoezom mogli biti uključeni eritroferon (ERFE), faktor rasta i diferencijacije 15 (GDF 15, engl. *growth differentiation factor 15*) i homolog 1 proteina izokrenute gastrulacije (TWSG1, engl. *twisted gastrulation protein homologue 1*) koje luče eritroidni prekursori (81 – 83).

ERFE je hormon koji sintetiziraju eritroblasti u svim fazama razvoja nakon stimulacije EPO-om. Ekspresija ERFE-a nakon stimulacije s EPO-om posredovana je signalnim putem STAT-a (83). Istraživanja su ukazala da ERFE vjerojatno izravno djeluje na potiskivanje

ekspresije hepcidina. U studiji na miševima podvrgnutim flebotomiji otkrivena je povećana ekspresija mRNA za ERFE koja je prethodila potiskivanju ekspresije hepcidina. Daljnjim istraživanjem zabilježilo je da nakon primjene flebotomije ili EPO-a dolazi do značajnog porasta ekspresije ERFE-a u koštanoj srži i slezeni miševa kao primarnim mjestima eritropoeze te je uočeno da ERFE nije nužan za normalno odvijanje eritropoeze kod odraslih miševa, no nužan je u stanjima povećane eritropoetske potrebe za željezom kao što su ubrzani rast ili gubitak krvi (83). Istraživanje na mišjim modelima β -talasemije te na ljudima ukazala su na ulogu ERFE-a u regulaciji hepcidina (84, 85).

GDF 15 član je skupine citokina TGF β ga stvaraju eritroidni prekursori u kasnom stadiju sazrijevanja. U istraživanjima humanom modelu nađena je značajno veća ekspresija GDF 15 u eritroblastima bolesnika s β -talasemijom, kod kojih je ekspresija hepcidina potisnuta izraženom eritropoetskom aktivnošću u odnosu na zdrave ispitanike. Također, koncentracija GDF 15 u perifernoj krvi bila je značajno viša kod bolesnika s β -talasemijom te je pozitivno korelirala s koncentracijom sTfR-a, EPO-a i feritina. Uz to, pokazalo se da serum ovih bolesnika inhibira ekspresiju mRNA za hepcidin u hepatoma stanicama (81). Međutim, u istraživanju na miševima s ablacijom gena za GDF 15 i miševima divljeg tipa nisu nađene značajne razlike u parametrima metabolizma željeza te je flebotomijom inducirana stimulacija eritropoeze dovela do jednakog eritropoetskog odgovora u obje skupine, što ukazuje da GDF 15 nije nužan za fiziološko potiskivanje ekspresije hepcidina i stimulaciju eritropoeze inducirane flebotomijom (86).

TWSG 1 stvaraju eritroidni prekursori u ranijem stadiju diferencijacije nego GDF 15. *In vitro* istraživanja ukazala su da ovaj protein potiskuje ekspresiju hepcidina vjerojatno na način da se veže na BMP. Dokazana je povišena ekspresija TWSG 1 na modelu miševa s talasemijom. Međutim, njegova uloga u regulaciji ekspresije hepcidina kod ljudi još nije jasna (82).

1.1.3. Nutricijska imunost

Nutricijska imunost mehanizam je urođene imunosti koji se temelji na uklanjanju esencijalnih elemenata potrebnih mikroorganizama. Iako se naziv nutritivna imunost primarno koristio za mehanizme uklanjanja željeza, danas se zna da je uklanjanje cinka i mangana također bitno u obrani od patogenih mikroorganizama. Uklanjanjem željeza iz izvanstaničnih u skladišne odjeljke smanjuje se dostupnost željeza patogenim mikroorganizama. Naime, željezo je nužno svim živim organizmima, pa tako i mikroorganizmima kojima je potrebno za proliferaciju i patogenost (87). Iako virusima željezo nije neophodno za preživljavanje, prisutnost željeza u stanicama nužna je za uspješnu replikaciju virusnih čestica jer je željezo sastavni dio raznih proteina i enzima uključenih u sintezu virusnih čestica. Virusne infekcije mogu biti praćene promjenom homeostaze željeza i te promjene mogu doprinijeti pogoršanju bolesti (88). Upala potiče sintezu hepcidina, što uzrokuje zadržavanje željeza u stanicama i snižavanje izvanstanične koncentracije željeza. Međutim, promjene u koncentraciji hepcidina i homeostazi željeza koje se mogu naći kod pojedinih infekcija nisu jedinstvene već su specifične za određene vrste patogenih mikroorganizama, a ovise i o odgovoru domaćina (88 – 90).

Kod infekcije virusom humane imunodeficijencije (HIV, engl. *human immunodeficiency virus*) nađena je povišena koncentracija hepcidina u akutnoj fazi bolesti koja je bila praćena hipoferemijom te je povišena koncentracija hepcidina bila prisutna i u kroničnoj fazi bolesti čak i kod bolesnika na antivirusnoj terapiji. Također je zabilježeno da veća dostupnost željeza u stanicama pogoduje replikaciji virusa HIV-a. S druge strane, akutna infekcija virusom hepatitisa B (HBV) i virusom hepatitisa C (HCV) nije bila praćena porastom hepcidina (90). Kod bolesnika s kroničnom infekcijom HCV-om zabilježeno je nakupljanje željeza u jetrenom tkivu koje se povezuje s težim oblikom bolesti. Kod ovih bolesnika nađena je viša vrijednost TSAT-a te viša koncentracija feritina u serumu. Studije na transgenskim miševima ukazale su da infekcija HCV-om može sniziti ekspresiju hepcidina te tako utjecati na metabolizam željeza. Iako točni mehanizmi regulacije homeostaze željeza kod bolesnika s HCV-om nisu razjašnjeni poznato je da nakupljanje željeza pridonosi patogenezi bolesti. U prilog tome govore i podaci da je primjena flebotomije u cilju snižavanja koncentracije željeza djelovala povoljno na tijek bolesti kod bolesnika s infekcijom HCV-a (88, 89). Studije kod bolesnika s infekcijom HBV-a pokazale su da je kod velikog broja bolesnika prisutno nakupljanje željeza u jetri te je u nekim studijama nađena povišena koncentracija željeza i u perifernoj krvi koja je vjerojatno posljedica otpuštanja željeza iz inficiranih i oštećenih hepatocita. Bolesnici s kroničnom infekcijom HBV-om imali su povišenu koncentraciju

hepcidina koja je vjerojatno uzrok nakupljanja željeza kod ovih bolesnika. Iako su neke studije ukazale da prisutnost željeza potiče replikaciju HBV-a, druge studije dale su suprotne rezultate (89).

Mnogi virusi razvili su načine kojima nadvladavaju mehanizme imunskog sustava domaćina u obrani od patogena. Različiti mikroorganizmi, uključujući i viruse, posjeduju mehanizme kojima nastoje osigurati željezo za vlastite potrebe. Primjerice, pojedini mikroorganizmi stupaju u interakciju s proteinima uključenim u metabolizam željeza, dok drugi koriste određene stanične receptore za ulazak u stanice koje su dobro opskrbljene željezom. Humani citomegalovirus (HCMV, engl. *human cytomegalovirus*) utječe na metabolizam željeza kako bi osigurao dostupnost željeza za vlastitu replikaciju (89). HCMV kodira protein US2 (engl. *unique short 2*) koji stupa u interakciju s HFE-om na stanicama domaćina, što potiče proteosomalnu razgradnju HFE-a. Membranski protein HFE interakcijom s TfR-om kontrolira ulazak željeza u stanice. Međutim, proteosomalna razgradnja HFE-a uzrokuje nakupljanje željeza u stanicama što pogoduje virusnoj replikaciji (88). Nef (engl. *negative regulatory factor*) protein HIV-a također stupa u interakciju s HFE-om te uzrokuje premještanje ovog proteina s membrane ciljnih stanica. Moduliranjem homeostaze željeza virus stimulira nakupljanje željeza u makrofagima, a to pogoduje virusnoj replikaciji (88, 89).

Kod virusne infekcije pojačane su metaboličke aktivnosti u stanici radi sinteze novih virusnih čestica, što zahtjeva dovoljnu opskrbu željezom. Ulaskom u stanice koje su dobro opskrbljene željezom virus osigurava povoljno okruženje za vlastitu replikaciju. Metabolički aktivne stanice koje se brzo dijele pojačano ekspimiraju TfR1 na staničnoj membrani kako bi se opskrebile željezom za svoje potrebe. Razni virusi koriste upravo TfR1 kao receptor za ulazak u ciljne stanice. Virus mačje panleukopenije (FNP, engl. *feline panleukopenia virus*) i pseći parvovirus (CNV, engl. *canine parvovirus*) inficiraju stanice kripti crijevnog epitela i hematopoetske stanice koje pojačano ekspimiraju TfR1 te je dokazano da je TfR1 receptor kojeg ovi virusi koriste za ulazak u stanice. Glavni receptor za ulazak patogenih sojeva arenavirusa u ciljne stanice upravo je TfR1 za kojeg se virus veže svojim glikoproteinom 1(88). Iako je homeostaza željeza kod koronavirusne bolesti (COVID-19, engl. *coronavirus disease*) promijenjena, nije poznato jesu li promjene u metabolizmu željeza samo posljedica upalnih zbivanja ili virus ima aktivnu ulogu u metabolizmu željeza. Istraživanje Ehsani i sur. provedeno na strukturnim modelima ukazalo je na sličnost strukture citoplazmatskog dijela proteina šiljka (engl. *spike, protein S*) koronavirusa 2 povezanog s teškim akutnim respiracijskim sindromom (SARS-CoV-2, engl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) s hepcidinom. Međutim, nije dokazano da li zahvaljujući ovoj strukturnoj sličnosti virus ima aktivnu ulogu u promjenama

homeostaze željeza (91). Iako je glavni receptor za ulazak SARS-CoV-2 virusa u stanice receptor za enzim 2 koji kida angiotenzin (ACE2, engl. *angiotensin-converting enzyme 2*), ispitivanja na *in vitro* modelima ukazala su da bi TfR1 mogao biti alternativni receptor za ulazak virusa u stanice, no točni mehanizmi ove interakcije virusa s TfR1 receptorima još nisu razjašnjeni (92).

Zbog činjenice da je virusna replikacija ovisna o dostupnosti željeza u ciljnim stanicama, terapijska intervencija s ciljem regulacije homeostaze željeza mogla bi biti korisna u kontroli infekcije i komplikacija bolesti. Mogući pristupi u regulaciji metabolizma željeza uključuju primjenu kelatora željeza, agonista hepcidina ili regulaciju ekspresije gena uključenih u metabolizam željeza (93). Međutim, nužna su daljnja istraživanja koja bi ukazala na korisnost ovih pristupa u liječenju pojedinih virusnih bolesti.

1.2. COVID-19

1.2.1. Definicija i epidemiologija COVID-19

COVID-19 akutna je infektivna bolest uzrokovana virusom SARS-CoV-2 (91). Prvi slučajevi bolesnika sa simptomima pneumonije nepoznatog porijekla pojavili su se u prosincu 2019. godine u kineskom gradu Wuhanu (94). Analizom uzoraka zaraženih bolesnika kao uzročnik identificiran je novi pripadnik obitelji korona virusa nazvan 2019-nCoV (95). Od prve pojave bolesti epidemija COVID-19 brzo se proširila po cijelom svijetu i uzrokovala je zarazu milijuna osoba i velik broj smrtnih slučajeva (96). U veljači 2020. Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) proglasila je globalnu pandemiju COVID-19 te je prema Međunarodnom odboru za taksonomiju virusa uzročnik nazvan SARS-CoV-2 (97, 98).

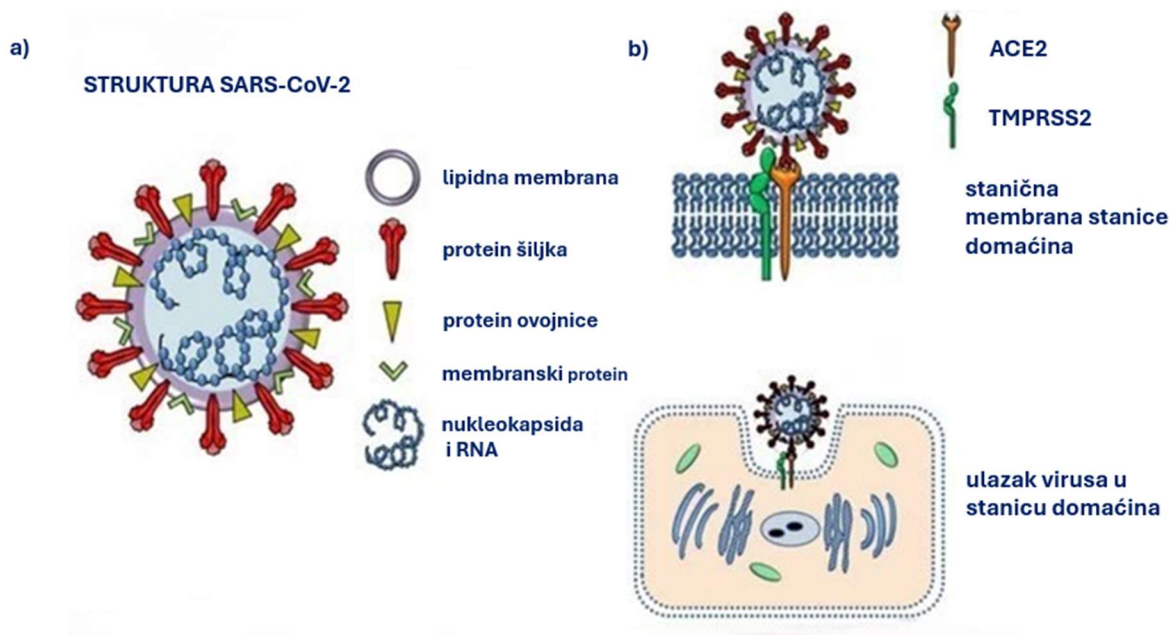
Brzom širenju COVID-19 pridonijela je visoka zaraznost virusa koja je veća u odnosu na ostale pripadnike skupine koronavirusa te činjenica da je dio zaraženih ispitanika asimptomatski (99). Primarnim izvorom SARS-CoV-2 virusa smatraju se životinje dok je kod ljudi primarni put prijenosa virusa respiracijskim putem ili bliskim kontaktom sa zaraženom osobom (97).

Koronavirusi dobili su naziv jer promatrani pod elektronskim mikroskopom nalikuju na krunu zahvaljujući prisutnosti proteina šiljka na svojoj površini(93). Dijele se u četiri roda: alpha-CoV, beta-CoV, gamma-CoV i delta-CoV. SARS-CoV-2 pripada beta rodu koronavirusa kao i drugi uzročnici zoonoza u ljudi poput SARS-CoV i koronavirusa povezanog s bliskoistočnim respiracijskim sindromom (MERS-CoV, engl. *Middle East respiratory syndrome coronavirus*) (97). Analizom genoma SARS-CoV-2 nađeno je 96 % sličnosti s genomom koronavirusa šišmiša RaTG13, 79,5 % sličnosti s genomom SARS-CoV te 50 % sličnosti s MERS-CoV (99, 100).

Mutacije virusnog genoma tijekom pandemije COVID-19 dovele su do pojave različitih varijanti SARS-CoV-2. Promjene u genomu koje stvaraju nove varijante mogu utjecati na prijenos virusa, sposobnost izazivanja bolesti, smrtnost i učinkovitost cjepiva(101).

Infekcija koronavirusima kod ljudi zabilježena je prvi put 1965. u Engleskoj (101). Prvi slučajevi infekcije SARS-CoV-om zabilježeni su 2002. u Kini (102). Epidemija bliskoistočnog respiracijskog sindroma (MERS, engl. *Middle East respiratory syndrome*) pojavila se u Saudijskoj Arabiji 2012. godine te su i nakon te epidemije zabilježeni povremene pojave MERS-a na Bliskom istoku (103).

SARS-CoV-2 je pozitivni jednolančani RNA virus s ovojnicom veličine genoma od 30 kilobaza te promjera oko 125 nm. Virusni genom kodira strukturne proteine: nukleokapsidni protein (engl. *nucleocapside, protein N*), protein šiljka, protein virusnog omotača (engl. *envelope, protein E*) i membranski protein (engl. *membrane, protein M*) te nestrukturne proteine uključene u virusnu replikaciju, transkripciju te razne druge procese. SARS-CoV-2 virus ulazi u stanicu domaćina vezanjem proteina S za receptor na površini ciljne stanice. Protein S sastoji se od S1 podjedinice koja se veže na receptor za ACE2 na površini ciljnih stanica i S2 podjedinice koja posreduje u fuziju virusa s membranom domaćina. Proteolitičkim kidanjem proteina šiljka pomoću TMPRSS2 dolazi do aktivacije S2 podjedinice te se omogućavaju fuzija virusne čestice s membranom stanice domaćina i ulazak virusnog genoma u stanicu. Nakon ulaska u stanicu domaćina dolazi do replikacije genoma i sinteze virusnih proteina koji se uklapaju u nove virusne čestice koje se vezikularnim putem prenose do stanične membrane te otpuštaju egzocitozom (104).



Slika 4. Struktura SARS-CoV-2 virusa (a) i ulazak virusa u stanicu domaćina (b). Preuzeto i prilagođeno prema Russo i sur., 2023. (105).

1.2.2. Klasifikacija i dijagnostička procjena bolesti

Klinička prezentacija COVID-19 je heterogena. Dio zaraženih osoba može biti asimptomatski dok su najčešći simptomi povišena tjelesna temperatura, kašalj, mialgija, glavobolja te gastrointestinalne tegobe. Međutim, kod dijela bolesnika može doći do razvoja teškog oblika bolesti praćenih respiracijskim komplikacijama te napredovanjem bolesti može doći i do razvoja sindroma akutnog respiracijskog distresa (ARDS, engl. *acute respiratory distress syndrome*). U sklopu COVID-19 mogu se javiti i razne manifestacije bolesti izvan pluća poput srčanih, neuroloških, jetrenih i bubrežnih poremećaja (104).

Prema preporukama SZO-a stupanj težine COVID-19 klasificira se kao blagi oblik bolesti (simptomatska bolest bez znakova virusne pneumonije ili hipoksije), umjereni oblik bolesti (prisutni klinički znakovi pneumonije kao što su vrućica, kašalj, dispneja, ubrzano disanje, bez znakova teške pneumonije uz zasićenja hemoglobina kisikom (SpO_2) > 90 % na sobnom zraku), teški oblik bolesti (prisutni klinički znakovi pneumonije uz prisustvo još jednog od kriterija kao što su brzina disanja > 30 udisaja/minuti, teški respiratorni distres ili SpO_2 < 90 % na sobnom zraku) te kritični oblik bolesti (respiracijsko zatajenje, ARDS, sepsa, septički šok te multiorgansko zatajenje) (106).

Pokazalo se da oko 80 % bolesnika s COVID-19 razvija blagi do umjereni oblik bolesti, u oko 15 % slučajeva dolazi do razvoja teškog oblika bolesti i 5 % razvija kritičan oblik bolesti (107). Simptomi bolesti javljaju se najčešće 4 do 5 dana nakon infekcije. Kod težih oblika COVID-19 komplikacije obično nastupaju oko tjedan dana nakon pojave simptoma bolesti (104).

Prisutnost komorbiditeta i stanja kao što su dijabetes, pretilost, respiracijske bolesti, kardiovaskularne bolesti i određeni polimorfizmi gena predstavljaju čimbenike rizika za razvoj težeg oblika COVID-19 (108).

ARDS teška je komplikacija COVID-19. Mehanizmi razvoja ARDS-a uključuju upalu, oštećenje alveolarnog epitela, oštećenje alveolarnih kapilara uz povećanje propusnosti te fibroproliferacijske promjene. Oštećenje alveola dovodi do povećanja propusnosti alveolarnih kapilara te razvoja alveolarnog edema koji remeti difuziju plinova u plućima te uzrokuje nastanak hipoksije (104, 108).

Kod bolesnika sa sumnjom na infekciju virusom SARS-CoV-2 dokazivanje trenutne infekcije provodi se testovima lančane reakcije polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR, engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*) kojima se dokazuje prisutnost virusne RNA ili antigenskim testovima temeljenim na imunokemijskoj metodi kojima se detektira prisutnost virusnog antigena (106, 109).

Osnovna pretraga u procjeni težine COVID-19 ispitivanje je plućne funkcije određivanjem SpO₂ (110). Za procjenu težine respiracijskog zatajenja kod bolesnika s ARDS-om koristi se omjer parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi (PaO₂, engl. *partial pressure of oxygen in arterial blood*) i frakcije kisika u udahnutom zraku (FiO₂, engl. *fraction of inspiratory oxygen concentration*) (111).

Za dijagnostiku pneumonije kod COVID-19 koriste se radiografske tehnike. Karakteristične promjene na radiografskim snimkama (RTG) pluća kod COVID-19 pneumonije su obostrani infiltrati tipa mliječnog stakla u perifernim dijelovima plućnog parenhima, no kod simptomatskih bolesnika u ranoj fazi bolesti mogu se naći i normalni nalazi RTG-a (112, 113). Promjene u nalazima rutinskih laboratorijskih pretraga omogućuju procjenu težine i prognoze bolesti (114). Kod bolesnika se može naći povećan udio neutrofilnih granulocita u odnosu na druge leukocitne subpopulacije. Kod bolesnika s težim oblikom bolesti povišen je i apsolutni broj neutrofilnih granulocita vjerojatno kao posljedica stimulacije hematopoeze upalom (108). Povišen broj neutrofilnih granulocita smatra se čimbenikom rizika za razvoj težeg oblika bolesti (115). Uz broj neutrofilnih granulocita, omjer neutrofilnih granulocita i limfocita (NLR, engl. *neutrophil to lymphocyte ratio*) također se pokazao dobrim prognostičkim biljegom u procjeni težine bolesti (116). Kod bolesnika s COVID-19 također je prisutna limfopenija. Snižen broj limfocita smatra se prognostičkim biljegom u procjeni težine bolesti i smrtnosti kod bolesnika s COVID-19 (117 – 119). Mehanizmi nastanka su vjerojatno višestruki te uključuju smanjenu proliferaciju limfocita, potrošnju, migraciju limfocita u pluća te pojačanu apoptozu uzrokovanu djelovanjem virusa i upalnih citokina (120, 121). Snižen broj eozinofila zabilježen je kod većine bolesnika s COVID-19 već u ranom stadiju bolesti. Mehanizmi razvoja eozinopenije vjerojatno uključuju smanjenu proizvodnju eozinofila u koštanoj srži, povećanu apoptozu eozinofila te migraciju eozinofila u područje zahvaćeno upalom (120, 122).

Koagulacijski poremećaji koji u najtežem obliku mogu dovesti i do diseminirane intravaskularne koagulacije (DIK) česti su uzroci komplikacija kod bolesnika s COVID-19. Porast koncentracije D-dimera bitan je u procjeni težine bolesti i predviđanju komplikacija kod COVID-19 bolesnika (114, 123).

Porast koncentracije upalnog biljega C-reaktivnog proteina (CRP) pokazao se dobrim parametrom u procjeni težine kliničke slike (124). Koncentracija upalnog biljega prokalcitonina (PCT) pokazala se korisnom u isključivanju bakterijske superinfekcije kod bolesnika s COVID-19 (125). Porast aktivnosti laktat-dehidrogenaze (LDH) u serumu posljedica je oslobađanja LDH iz stanica uslijed oštećenja organa te se LDH smatra prognostičkim biljegom težine bolesti (126). Porast aktivnosti aspartat-aminotransferaze (AST), alanin-aminotransferaze (ALT),

bilirubina i kreatinina ukazuju na jetreno i bubrežno oštećenje kod COVID-19 bolesnika (127, 128). Koncentracija feritina pokazala se biljekom teškog oblika COVID-19 te predikcijskim biljekom lošijeg ishoda (129). Oštećenje miokarda također je jedna od komplikacija COVID-19. Mogući mehanizmi razvoja oštećenja su poremećena aktivacija receptora za ACE2 te posljedično poremećaj u regulaciji renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava te ozljede miokarda uslijed sustavnog upalnog odgovora (130). Kod bolesnika u jedinici intenzivnog liječenja (JIL) nađene su značajno više vrijednosti troponina I visoke osjetljivosti I (hsTnI, engl. *high sensitivity troponin I*) (131).

Terapija COVID-19 ovisi o kliničkoj prezentaciji. Kod bolesnika s blagim oblikom bolesti primjenjuje se simptomatsko liječenje, dok bolesnici s težim oblikom bolesti zahtijevaju hospitalizaciju. Kod bolesnika s pneumonijom i prisutnom hipoksijom primjenjuje se terapija kisikom (132). Terapijske mogućnosti obuhvaćaju standardnu terapiju kisikom, te kod težeg oblika hipoksemije primjena kisika kroz nosnu kanilu visokog protoka (HFNO, engl. *high-flow nasal canula*), neinvazivnu ventilaciju i intubaciju uz mehaničku ventilaciju (110).

Također, u liječenju bolesnika s COVID-19 primjenjuju se razni imunomodulacijski i antivirusni lijekovi (133). Za prevenciju težeg oblika bolesti primjenjuje se cijepljenje protiv virusa SARS-CoV-2 (134).

1.2.3. Patogeneza bolesti

Glavni patofiziološki mehanizmi uključeni u razvoj COVID-19 uključuju poremećaje imunosnog odgovora, oštećenje endotela te poremećaje koagulacijskog sustava (104, 108).

Prilikom infekcije virus SARC-CoV-2 ulazi u stanice gornjih dišnih putova u kojima dolazi do replikacije virusa. Prepoznavanje virusnih komponenti od strane receptora za molekularne obrasce (PRR, engl. *pattern recognition receptor*) dovodi do aktivacije signalnih putova te do aktivacije transkripcijskih faktora koji potiču ekspresiju gene za sintezu upalnih citokina kao što je nuklearni faktor kappa B (NF- κ B, engl. *nuclear factor kappa B*) te transkripciju interferona tipa I koji posreduju u imunskoj obrani od virusa (135). Lučenje upalnih citokina dovodi do usmjeravanja upalnih stanica u plućno tkivo te dodatnog lučenja citokina i kemokina koji potiču adaptacijski imunski odgovor na infekciju. Osim djelovanja staničnih mehanizama imunodne obrane, također dolazi do razvoja humoralne imunodne reakcije s ciljem suzbijanja virusne infekcije. Ukoliko urođeni i adaptacijski imunski odgovor ne uspiju suzbiti virusnu infekciju, virus se širi u donje dišne putove inhalacijom ili spontanom širenjem kroz dišni sustav. Primarno mjesto širenja virusa može biti i donji dišni sustav. Širenje virusa u donji dišni sustav uzrokuje oštećenje alveola s posljedičnim poremećajem izmjene plinova i razvojem hipoksije. Kod infekcije virusom SARS-CoV-2 inficirane stanice i alveolarni makrofagi luče upalne medijatore te dolazi do usmjeravanja neutrofila, monocita i limfocita u područje zahvaćeno infekcijom. Nadalje, dolazi do otpuštanja vazoaktivnih peptida, što za posljedicu ima opuštanje glatkih mišića krvnih žila i povećanje vaskularne propusnosti. Posljedično dolazi do razvoja angioedema te aktivacije koagulacije koji pridonose razvoju teških komplikacija COVID-19 (104, 108). Kod bolesnika s COVID-19 zabilježena je neravnoteža između koagulacijskih i fibrinolitičkih procesa. Hiperkoagulabilnosti kod bolesnika s COVID-19 vjerojatno doprinosi izravno oštećenje endotela djelovanjem virusa te oslobađanje upalnih medijatora koji privlače upalne stanice na mjesto oštećenja (108). Tome u prilog govori i relativno visoka učestalost arterijske i venske tromboembolije kod bolesnika s teškim i kritičnim oblikom COVID-19 (136, 137). Histopatološki nalazi bolesnika koji su imali teži oblik COVID-19 ukazali su na prisutnost difuznog oštećenja plućnog tkiva, plućnog edema, nakupljanja tekućine i fibrina u alveolama (138, 139). Povećana signalizacija putem TGF- β nađena je kod bolesnika s teškim COVID-19 (140). TGF- β ima ulogu u obnovi oštećenja nastalih upalom. Međutim, pretjerana aktivnost mogla bi biti uzrokom razvoja fibroze (141 – 143).

Za uspješno razrješenje virusne infekcije nužna je učinkovita reakcija urođenog i adaptacijskog imunskog sustava koja dovodi do uklanjanja virusa i ograničavanja upalnog procesa. Neodgovarajući ili odgođen imunski odgovor može imati za posljedicu daljnju replikaciju i širenje virusa, pridonijeti oštećenju tkiva te dovesti do pretjeranog i nekontroliranog imunskog odgovora. Kod bolesnika s teškim oblikom bolesti dolazi do razvoja citokinske oluje. Citokinska oluja kod bolesnika s COVID-19 vodi ka pretjeranom imunskom odgovoru u plućima i razvoju multiorganskog oštećenja (135). Kod multiorganskog oštećenja sustavno djelovanje citokina dovodi do aktivaciji upalnih i imunskih stanica, njihove ekstrasvazacije i oštećenja endotela. Upalne stanice dospjele u intersticijski prostor i lokalne upalne stanice u intersticiju luče citokine i druge medijatore upale te potiču upalne procese u parenhimu organa koji vode oštećenju tkiva (144).

Kod bolesnika s COVID-19 nađene su povišene koncentracije raznih citokina kao što su IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, interferon γ (IFN- γ), TNF- α , protein 10 kojeg inducira interferon gamma (IP-10, engl. *interferon-gamma inducible protein 10*), faktor koji stimulira granulocitne kolonije (G-CSF, engl. *granulocyte-colony stimulating factor*), monocitni kemotaktični proteina 1 (MCP-1, engl. *monocyte chemotactic protein 1*) i upalni protein makrofaga 1 alpha (MIP-1 α , engl. *macrophage inflammatory protein 1 alpha*) (135). Kod bolesnika s težom kliničkom slikom smještenim u JIL-u nađene su povišene koncentracije citokina IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF-a, IP-10, MCP1, MIP1A i TNF- α u plazmi u odnosu na bolesnike koji nisu bili u JIL-u (145). Također su kod bolesnika s težim oblikom bolesti nađene više koncentracije citokina IL-1, IL-6, IL-8 i TNF- α u odnosu na bolesnika s blažim oblikom COVID-19 (146).

Promjena broja ili fenotipa pojedinih populacija imunskih stanica također je zabilježena kod infekcije virusom SARS-CoV-2. Kod bolesnika s COVID-19 zabilježena je prisutnost blage neutrofilije te limfopenije (108, 146, 147). Napredovanjem bolesti uslijed pretjeranog imunskog odgovora raste apsolutni broj neutrofila koji se smatra pokazateljem težine bolesti (148). Neutrofilu mogu doprinijeti akutnoj plućnoj ozljedi te su povezani s raznim bolestima kod kojih dolazi do razvoja ARDS-a (149). Analiza fenotipa neutrofila periferne krvi ukazala je da je neutrofilija posljedica stimulacije proizvodnje neutrofila upalnim čimbenicima (150, 151). Povišen broj neutrofila zabilježen je i u plućnom tkivu (152). U uzorcima bronhoalveolarnog lavata bolesnika s COVID-19 nađene su povišene koncentracije kemokina koji djeluju na neutrofile (153). U serumu bolesnika s COVID-19 detektirani su biljezi stvaranja neutrofilnih izvanstaničnih zamki (NET, engl. *neutrophil extracellular trap*) koji mogu pridonijeti oštećenju plućnog tkiva i razvoju tromboze (154). Iako nisu zabilježene značajne promjene u apsolutnom broju monocita u perifernoj krvi bolesnika s COVID-19 istraživanja

ukazuju na promjene u fenotipu monocita (108, 155). U cirkulaciji bolesnika s COVID-19 zabilježena je prisutnost monocita koji ekspimiraju biljege aktivacije te pojačano sintetiziraju IL-1 i IL-6 (156, 157). Smatra se da pretjerana aktivacija monocita kod COVID-19 pridonosi upalnim procesima u plućima bolesnika s COVID-19 (108). Limfopenija kod bolesnika s COVID-19 posljedica je sniženog broja CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita (158, 159). Citotoksični T limfociti, CD8⁺ te pomagački CD4⁺ T limfociti imaju važnu ulogu u obrani od virusa. Osim kvantitativnih promjena, zabilježene su i promjene u aktivaciji T limfocita i u ekspresiji kemokinskih receptora. Smatra se da kvantitativni i funkcionalni poremećaji stanične imunosti u kojoj posreduju T limfociti pridonose poremećenoj regulaciji imunskog odgovora te oštećenju plućnog tkiva kod bolesnika s COVID-19 (108).

1.2.4. Promjene u metabolizmu željeza kod COVID-19

Promjene u metabolizmu željeza normalan su odgovor na prisutnu infekciju. No promjene u dostupnosti željeza mogu se odraziti i na sam organizam domaćina. Nedostatak željeza može dovesti do anemije ili oslabjeti imunosti odgovor na infekciju, dok s druge strane visoke koncentracije željeza mogu posredovati u oštećenju stanica uslijed oksidacijskog stresa (160). Sve ove promjene mogu utjecati na patogenezu bolesti kod bolesnika s COVID-19.

Hepcidin kao glavni posrednik promjena u metabolizmu željeza tijekom upale smanjuje apsorpciju željeza iz duodenalnih enterocita i oslobađanje iz makrofaga RES-a (160). U nekim studijama nađene su povišene vrijednosti hepcidina kod bolesnika s COVID-19 (161, 162). No nađene su i niže vrijednosti hepcidina kod bolesnika u JIL-u u odnosu na zdrave ispitanike (163). Ovi podaci ukazuju na kompleksnost regulacije hepcidina kod bolesnika s COVID-19. Kod bolesnika s COVID-19 upala i hipoksija imaju suprotne učinke na ekspresiju hepcidina. S jedne strane upala stimulira, a s druge strane hipoksija inhibira ekspresiju hepcidina. Utjecaj ovih čimbenika ne ovisi samo o hijerarhiji signalnih putova već i o njihovom intenzitetu koji se razlikuje obzirom na težinu bolesti.

Kod bolesnika s COVID-19 najčešće zabilježene promjene u metabolizmu željeza su hipoferemija i hiperferritinemija (129).

Povišena koncentracija feritina biljeg je za COVID-19. Povišena koncentracija feritina kod bolesnika s COVID-19 vjerojatno je posljedica nakupljanja željeza u stanicama zbog djelovanja hepcidina te stimulacije sinteze feritina upalnim citokinima. Feritin se smatra dobrim biljekom za procjenu težine bolesti i previđanje ishoda bolesti. Više vrijednosti feritina nađene su u brojnim studijama kod bolesnika s težim oblikom COVID-19 u odnosu na bolesnike s blažim oblikom bolesti (162–164). Iako je porast koncentracije feritina biljeg upalnog procesa, neki autori smatraju da bi feritin mogao imati i aktivnu ulogu u patološkim procesima zahvaljujući svom imunomodulacijskom djelovanju (42). Teški oblik COVID-19 čak se dovodi u vezu sa sindromom hiperferritinemije zbog sličnosti u kliničkoj prezentaciji i laboratorijskim parametrima (165). Također neki autori su ukazali na moguću povezanost hiperferritinemije s toksičnim učincima željeza i razvojem ferroptoze koja bi mogla igrati ulogu u oštećenju organa kod bolesnika s COVID-19 (166, 167).

Hipoferemija je posljedica inhibicije otpuštanja željeza iz stanica pod utjecajem hepcidina. U više studija nađena je niža koncentracija željeza u serumu i kod hospitaliziranih bolesnika kao i kod izvanbolničkih bolesnika s COVID-19 (168 – 170). Pokazalo se da promjene metabolizma željeza zabilježene kod akutnog COVID-19 mogu biti prisutne i dugo

nakon preboljele bolesti. U studiji Sonnwebera i sur. snižena koncentracija željeza nađena je kod 30 % ispitanika i dva mjeseca nakon akutne bolesti (171). Funkcionalni nedostatak željeza predstavlja ograničavajući čimbenik za normalno odvijanje eritropoeze i dovodi do razvoja anemije upale, a anemija dodatno remeti oksigenaciju tkiva koja je već narušena zbog poremećene izmjene plinova u plućima kod bolesnika s teškim oblikom COVID-19.

S druge strane, zabilježena je i prisutnost slobodnog, katalitički aktivnog oblika željeza u cirkulaciji hospitaliziranih bolesnika s COVID-19 koja je bila povezana sa smrtnošću i lošijim ishodima kod bolesnika (172).

U studiji u kojoj je nakon dokazane infekcije virusom SARS-CoV-2 godinu dana longitudinalno praćeno 214 bolesnika bilježeni su klinički podaci, promjene imunoloških i hematoloških parametara te promjene u ekspresiji gena uključenih u homeostazu željeza. Rezultati studije ukazali su da su upala i promjene u homeostazi željeza prisutni i dva tjedna nakon akutnog COVID-19 te da mogu predvidjeti razvoj dugotrajnog COVID-19 neovisno o težini akutne bolesti. Analizom transkriptoma i površinskih biljega stanica kod bolesnika s umjerenim i teškim COVID-19 te bolesnika kod kojih su naknadno bili prisutni dugotrajni simptomi bolesti zabilježen je poremećaj u raspodjeli željeza koji se očitovao nakupljanjem željeza u monocitima te povećanom potrebom za željezom kod proliferirajućih limfocita (173).

Poremećena stanična homeostaza željeza može biti uzrokom neodgovarajućeg imunskog odgovora na virus. Nakupljanje željeza u stanicama može pridonijeti staničnoj disfunkciji na način da se potiču stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva i ferroptozu, što može pridonijeti oštećenju tkiva i organa kod bolesnika s COVID-19 (174). S druge strane, nedostatak željeza remeti normalno funkcioniranje stanica imunskog sustava. Željezo regulira polarizaciju makrofaga, funkciju neutrofila, aktivaciju prirodno ubilačkih stanica (NK stanice, engl *natural killer cells*), proliferaciju T i B limfocita te utječe na stanični i humoralni adaptacijski imunski odgovor (175). U prilog važnosti željeza u imunskom odgovoru govore i rezultati studije Frosta i sur. gdje je niska koncentracija željeza u serumu uzrokovala poremećen primarni imunski odgovor kao i razvoj imunske memorije kod miševa prilikom cijepljenja. Također, niska koncentracija željeza u serumu kao posljedica povišene koncentracije hepcidina bila je povezana s nižom koncentracijom specifičnih antitijela na određene patogene kod ljudi (176).

Ovi podaci ukazuju na važnost homeostaze željeza za učinkovitu imunsku obranu od virusa gdje s jedne strane organizam nastoji ograničiti dostupnost željeza patogenim mikroorganizmima, a s druge strane nedostatak ili suvišak željeza mogu utjecati na patofiziološke procese u organizmu i uspješnost antivirusne obrane.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Rezultati brojnih studija ukazuju da je metabolizam željeza kod bolesnika s COVID-19 promijenjen, a te se promjene najčešće očituju hipoferemijom i hiperferitinemijom, što se povezuje s lošijom prognozom kod ovih bolesnika. Hipoferemija predstavlja ograničavajući čimbenik za normalno odvijanje eritropoeze te vodi k razvoju anemije upale. Anemija pogoršava stanje u opskrbi kisikom kod ovih bolesnika gdje je već prisutna hipoksija zbog respiracijske disfunkcije. Ograničena dostupnost željeza može utjecati i na imunski odgovor jer stanice adaptacijskog imunskog sustava zahtijevaju prisutnost željeza za normalnu funkciju. Hiperferitinemija je biljeg teškog oblika COVID-19 te prediktor lošijeg ishoda bolesti, no smatra se da bi feritin mogao imati i aktivnu ulogu u imunskim i upalnim procesima.

Glavni regulator metabolizma željeza je jetreni hormon hepcidin. Hepcidin svoj učinak ostvaruje vezanjem za ferroportin, jedini poznati protein koji prenosi željezo iz stanice, što vodi do trajnog uklanjanja ovog transportera s površine stanica. Time se sprječava apsorpcija željeza putem duodenalnih enterocita te izlazak iz stanica retikuloendotelnog sustava i hepatocita. Ekspresiju hepcidina potiču upala, povećana količina željeza u jetrenom tkivu, te povećano zasićenje transferina željezom, dok anemija/hipoksija i povećana eritropoetska aktivnost inhibiraju ekspresiju hepcidina. Kod upale i infekcije poticanje ekspresije hepcidina vodi k ulasku i zadržavanju željeza u skladišnim odjeljcima te smanjenju koncentracije željeza u izvanstaničnim prostorima. Ovim mehanizmom urođene imunosti nastoji se smanjiti dostupnost željeza patogenim mikroorganizmima kojima je željezo također neophodno za replikaciju i preživljavanje. S druge strane, prilikom hipoksije ekspresija hepcidina se potiskuje kako bi se osiguralo željezo za eritropoetske potrebe.

Regulacija metabolizma željeza kod bolesnika s COVID-19 je kompleksna zbog prisutnosti različitih patofizioloških mehanizama. Kod dijela bolesnika s COVID-19 istovremeno su prisutni upala i hipoksija kao signali sa suprotnim učinkom na ekspresiju hepcidina. Pojedina istraživanja su ukazala da hipoksija može nadvladati učinak upale na ekspresiju hepcidina. Stoga je **glavna hipoteza** istraživanja da je u skupini bolesnika s COVID-19 i prisutnom hipoksijom koncentracija hepcidina u krvi snižena i razina parametara statusa željeza je promijenjena u odnosu na skupinu bolesnika s normalnim zasićenjem hemoglobina kisikom.

Glavni cilj ovog doktorskog rada je ispitati postoji li razlika u koncentraciji hepcidina i čimbenika koji reguliraju koncentraciju hepcidina u skupinama normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19 te u skupini zdravih ispitanika.

Uz glavni cilj, **specifični ciljevi** istraživanja su:

- ispitati postoji li povezanost koncentracije hepcidina s parametrima sustavne upale (koncentracija CRP-a i IL-6), parametrom hipoksije (SpO₂), parametrima eritropoetske aktivnosti (broj retikulocita (RTC) i koncentracija EPO-a) i parametrima statusa željeza (koncentracija željeza (Fe), nezasićeni kapacitet vezanja željeza (UIBC), ukupni kapacitet vezanja željeza (TIBC), koncentracija feritina, TSAT, koncentracija sTfR-a i sadržaj hemoglobina u retikulocitima (RET-He)) u ispitivanim skupinama,
- ispitati postoji li povezanost koncentracije hepcidina s vremenom hospitalizacije i potrebom za primjenom mehaničke ventilacije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

U istraživanju je sudjelovalo ukupno 143 ispitanika koji su podijeljeni u tri skupine: ispitanici s akutnom SARS-CoV-2 infekcijom i prisutnom hipoksijom (47 ispitanika), ispitanici s akutnom SARS-CoV-2 infekcijom bez prisustva hipoksije (49 ispitanika) i zdravi ispitanici koji nisu inficirani SARS-CoV-2 virusom (47 ispitanika). U istraživanje su uključeni bolesnici prvi put zaprimljeni na Hitnom prijemu Klinike za infektologiju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Split radi simptoma akutnog COVID-19 kojima je infekcija SARS-CoV-2 virusom dokazanom RT-PCR metodom u uzorku nazofaringealnog obriska. Kao pokazatelj prisutne hipoksije smatrala se vrijednost $SpO_2 < 94\%$ izmjerena odmah po dolasku na Hitni infektološki prijem. Praćenjem tijeka bolesti uvidom u bolnički informacijski sustav ispitanici su naknadno podijeljeni prema težini bolesti (prema preporukama SZO) u skupine koje su imale blagi i umjereni, teški ili kritičan oblik bolesti (106).

Svim ispitanicima je na prijemu uzeta anamneza i zabilježeni su klinički i demografski podaci. Uvidom u medicinsku dokumentaciju dobiveni su klinički podaci o komorbiditetima i stanjima koja utječu na koncentraciju hepcidina i drugih parametara određenih u ovom istraživanju.

Kriteriji uključivanja bolesnika s COVID-19 u studiju bili su dob od 20 do 75 godina i prisutnost infekcije SARS-CoV-2 virusom.

Kriteriji isključivanja iz studije obuhvaćali su stanja i bolesti koje mogu utjecati na koncentraciju hepcidina i drugih ispitivanih parametara:

- anemija (koncentracija hemoglobina kod muškaraca < 130 g/L te koncentracija hemoglobina kod žena < 120 g/L),
- bolesti jetre,
- kronično zatajenje bubrega i izračunata procijenjena brzina glomerularne filtracije (eGFR, engl. *estimated glomerular filtration rate*) < 60 mL/minuti,
- kronične upalne crijevne bolesti,
- sustavne autoimune bolesti,
- maligne bolesti,
- kronična opstruktivska plućna bolest,
- astma,
- operacijski zahvat u posljednja tri mjeseca,

- transfuzija krvi u posljednjih tri mjeseca,
- nadomjestak pripravcima željeza,
- trudnoća i dojenje.

Zdravi ispitanici činili su kontrolnu skupinu koja je zadovoljavala jednake kriterije za uključivanje i isključivanje iz studije osim prisutnosti infekcije SARS-CoV-2 virusom. Uzorkovanje krvi za zdrave ispitanike provedeno je u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split.

Istraživanje je provedeno od 1. 6. 2021. do 1. 6. 2022. u Klinici za infektologiju KBC-a Split u suradnji sa Zavodom za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split i Zavodom za medicinsku biokemiju i hematologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Za provedbu istraživanja ishoda su odobrenja Etičkog povjerenstva KBC-a Split (klasa: 500-03/21-01/91, ur. broj: 2181-147/01/06/M.S.-21-02) i Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta (klasa: 004-01/23-03/01, ur. broj: 251-62-03-23-58) te je istraživanje provedeno u skladu s principima Helsinške deklaracije. Prije uključivanja u studiju, ispitanici su upoznati s istraživanjem te su potpisali informirani pristanak.

3.2. Uzorci

Sve analize određene su iz uzorka krvi uzetog odmah po prijemu bolesnika na Hitni prijem Klinike za infektologiju KBC-a Split, prije uvođenja terapijskih postupaka. Zdravim ispitanicima uzorkovanje je provedeno u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split. Bolesnicima s COVID-19 prilikom dolaska na Hitni infektološki prijem određeni su SpO₂, parametri kompletne krvne slike (KKS) i rutinske biokemijske pretrage. Uz rutinske laboratorijske pretrage zatražene na Hitnom infektološkom prijemu, svim bolesnicima određena je vrijednost hepcidina, željeza, UIBC-a, feritina, sTfR-a, RET-He-a, RTC-a, udijela nezrelih retikulocita (IRF, engl. *immature reticulocyte fraction*), EPO-a, CRP-a i IL-6. Također su izračunati TIBC, TSAT te omjeri hepcidina s parametrima metabolizma željeza (feritin/hepcidin, hepcidin/željezo), parametrima sustavne upale (hepcidin/CRP, hepcidin/IL-6) te parametrom eritropoeze (hepcidin/EPO).

Svakom ispitaniku uzorkovane su dvije epruvete krvi, uzorak s antikoagulansom K₃-etilendiamintetraoctenom kiselinom (K₃-EDTA) i uzorak s antikoagulansom litij-

heparinom. Arterijska krvi za određivanje SpO₂ kod bolesnika s COVID-19 uzorkovana je iz radijalne arterije. Zdravim ispitanicima nije određen SpO₂.

Uzorak plazme za biokemijske analize dobiven je centrifugiranjem uzorka krvi s antikoagulansom litij-heparinom tijekom 10 minuta pri 1800 g. Rutinske laboratorijske pretrage izrađene su u roku od sat vremena od primitka uzoraka u laboratorij te je ostati dio plazme alikvotiran i pohranjen na – 80 °C do analize.

3.3. Metode

Koncentracije hepcidina i EPO-a određene su u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, a ostali parametri određeni su u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split.

Koncentracija hepcidina određena je komercijalnim enzimski povezanim imunosorpcijskim testom (ELISA, engl. *enzyme linked immunosorbent assay*) visoke osjetljivosti DRG Hpcidin 25 (bioactive) HS ELISA (DRG Diagnostics GmbH, Marburg, Germany), a koncentracija EPO-a određena je komercijalnim ELISA testom Quantikine® IVD® Human Erythropoietin ELISA (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), prema uputama i protokolima proizvođača.

Parametri KKS, RTC i RET-He određeni su iz uzorka s antikoagulansom K₃-EDTA na hematološkom analizatoru Sysmex XN100 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) u roku od sat vremena od uzorkovanja.

Iz uzoraka plazme odmah su određene rutinske biokemijske pretrage (koncentracija CRP-a i kreatinina). Iz uzoraka plazme pohranjenih na – 80 °C naknadno je određena koncentracija željeza, UIBC-a, feritina, sTfR-a, IL-6, hepcidina i EPO-a.

Koncentracije kreatinina, željeza, UIBC-a i CRP-a određene su rutinskim biokemijskim metodama na analizatoru Roche Cobas c501 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Koncentracije feritina i IL-6 određene su elektrokemiluminiscentnom imunokemijskom analizom (ECLIA, engl. *electrochemiluminescence immunoassay*) na analizatoru Roche Cobas e601 (Roche diagnostics, Mannheim, Germany). Kod ispitanika kod kojih je koncentracija IL-6 bila ispod mjernog raspona, kao vrijednost koncentracije IL-6 korištena je nominalna vrijednost polovine limita kvantifikacije (LLQ, engl. *limit of quantification*) metode (1,25 pg/mL)(159). Koncentracija TfR-a određena je nefelometrijski na analizatoru BN ProSpec (Siemens, Erlangen, Germany). Zasićenje hemoglobina kisikom (SaO₂) određeno je oksimetrijski na analizatoru ABL90 FLEX PLUS (Radiometer, Brønshøj, Denmark).

Računski su određeni sljedeći parametri:

- $TIBC (\mu\text{mol/L}) = Fe (\mu\text{mol/L}) + UIBC (\mu\text{mol/L})$,
- $TSAT (\%) = Fe (\mu\text{mol/L}) / TIBC (\mu\text{mol/L}) \times 100$,
- omjeri koji uključuju hepcidin (ferritin/hepcidin, hepcidin/željezo, hepcidin/CRP, hepcidin/IL-6 i hepcidin/EPO),
- omjeri upalnih biljega (CRP/IL-6, CRP/neutrofilni granulociti, CRP/limfociti, CRP/monociti, IL-6/neutrofilni granulociti, IL-6/limfociti, IL-6/monociti, NLR, omjer neutrofilnih granulocita i monocita (NMR, engl. *neutrophil to monocyte ratio*), omjer monocita i limfocita (MLR, engl. *monocyte to lymphocyte ratio*)),
- eGFR je izračunata prema predikcijskoj jednadžbi za procjenu brzine glomerularne filtracije iz 2009. (CKD-EPI, engl. *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) koja je unijeta u laboratorijski informacijski sustav te se eGFR izračunava automatski uz svaku izmjerenu koncentraciju kreatinina.

3.4. Statistička analiza

Normalnost raspodjele podataka ispitana je Saphiro-Wilkovim testom. Rezultati koji slijede normalnu razdiobu prikazani su kao srednja vrijednost i standardna devijacija, dok su podaci koji ne slijede normalnu razdiobu prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. Dob je prikazana kao medijan (raspon). Kategoričke varijable prikazane su apsolutnim brojem N. Usporedba rezultata kategoričkih varijabli između dvije skupine ispitanika provedena je Fisherovim egzaktnim testom, a između tri skupine ispitanika primjenom hi-kvadrat testa. Za ispitivanje razlike između dvije skupine varijabli korišteni su parametrijski t-test te neparametrijski Mann-Whitneyev test i Fisherov egzaktni test. Za ispitivanje razlike varijabli između više od dvije skupine nezavisnih mjerenja korišteni su parametrijski test analize varijance (ANOVA, engl. *analysis of variance*) te neparametrijski Kruskal-Wallisov test i hi-kvadrat test. Povezanost varijabli ispitana je neparametrijskim Spearmanovim testom korelacije. Statistički značajna povezanost tumačena je prema sljedećim kriterijima: vrijednosti $0 < r < 0,25$ ili $-0,25 < r < 0$ ukazuju na odsustvo povezanosti, vrijednosti $0,25 < r < 0,50$ ili $-0,50 < r < -0,25$ upućuju na slabu povezanost, vrijednosti $0,50 < r < 0,75$ ili $-0,75 < r < -0,50$ upućuju na umjerenu do dobru povezanost, vrijednosti $0,75 < r < 1$ ili $-1 < r < -0,75$ upućuju na vrlo dobru do izvrsnu povezanost varijabli (177). Logistička regresijska analiza korištena je kako bi se ispitalo može li se na temelju vrijednosti nezavisne varijable predvidjeti vrijednost

zavisne varijable. Vrijednosti $P < 0,05$ smatrane su statistički značajnim. Statistička obrada podataka izrađena je u programu MedCalc verzija 20.013 (Ostend, Belgija).

4. REZULTATI

4.1. Opće karakteristike ispitanika

Osnovne karakteristike zdravih ispitanika i svih bolesnika s COVID-19, kao i bolesnika s COVID-19 podijeljenih u skupine prema zasićenju hemoglobina kisikom, prikazane su u tablici 1. Ispitanici s COVID-19 podijeljeni su na temelju vrijednosti SpO₂ izmjerenih pri dolasku na hitni infektološki prijem u skupine normoksičnih (SpO₂ ≥ 94 %) i hipoksičnih (SpO₂ < 94 %) bolesnika. Skupine hipoksičnih i normoksičnih bolesnika s COVID-19 te skupina zdravih ispitanika bile su podudarne po dobi i spolu te se nisu razlikovale po koncentraciji kreatinina i eGFR-a (tablica 1).

Udio ispitanika s hipertenzijom bio je 15/47 u skupini hipoksičnih bolesnika, 7/49 u skupini normoksičnih bolesnika s COVID-19 i 14/47 u skupini zdravih ispitanika. Učestalost šećerne bolesti iznosila je 2/47 u skupini hipoksičnih bolesnika, 4/49 u skupini normoksičnih bolesnika te 6/47 u skupini zdravih ispitanika. Niska učestalost komorbiditeta među ispitanicima rezultat je primijenjenih kriterija isključivanja iz studije, koji su uključivali anemiju, bolesti jetre, kronično zatajenje bubrega, kronične upalne crijevne bolesti, sistavne autoimune bolesti, maligne bolesti, kroničnu opstruktivnu plućnu bolest, astmu, operacijski zahvat u posljednja tri mjeseca, transfuziju krvi u posljednja tri mjeseca, nadomjestak pripravcima željeza, trudnoću i dojenje. Vrijeme trajanja simptoma bolesti pri dolasku na hitni infektološki prijem bilo je statistički značajno duže u skupini hipoksičnih u odnosu na normoksične bolesnike (tablica 1).

Tablica 1. Osnovne karakteristike zdravih ispitanika i svih bolesnika s COVID-19, kao i bolesnika s COVID-19 podijeljenih u skupine prema zasićenosti hemoglobina kisikom

	zdravi ispitanici (N = 47)	svi bolesnici s COVID-19 (N = 96)	normoksični bolesnici s COVID-19 (N = 49)	hipoksični bolesnici s COVID-19 (N = 47)	P₁	P₂	P₃
dob (godine)	58 (39 – 70)	54 (36 – 73)	53 (36 – 73)	55 (37 – 72)	0,188	0,171	0,175
spol							
muškarci, N	31	64	31	33	1,000	0,769	0,521
žene, N	16	32	18	14			
SpO ₂ (%)	/	96 (88 – 98)	97 (97 – 98)	87 (83 – 89)	/	/	<0,001
kreatinin (μmol/L)	77 ± 12	79 ± 14	80 ± 15	78 ± 14	0,290	0,461	0,479
eGFR (mL/min/1,73m ²)	91 (80 – 99)	87 (77 – 101)	86 (78 – 99)	88 (77 – 102)	0,515	0,700	0,611
trajanje simptoma na prijemu (dani), N	/	8 ± 3	8 ± 3	9 ± 3	/	/	0,001

SpO₂, zasićenje hemoglobina kisikom; eGFR, procijenjena brzina glomerularne filtracije (engl. *estimated glomerular filtration rate*)

P₁ – statistička značajnost razlike između zdravih ispitanika i svih bolesnika s COVID-19

P₂ – statistička značajnost razlike između zdravih ispitanika, normoksičnih bolesnika s COVID-19 i hipoksičnih bolesnika s COVID-19; provedena je post hoc analiza

P₃ – statistička značajnost razlike između normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19

Dob je prikazana kao medijan (raspon), dok su spol i vrijeme trajanje simptoma na prijemu prikazani kao apsolutni broj N. Kvantitativni podaci prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija i medijan (interkvartilni raspon). Statistički značajnim razlikama smatrale su se vrijednosti $P < 0,05$.

Prospektivnim praćenjem tijeka bolesti, bolesnici s COVID-19 naknadno su podijeljeni u skupine prema težini bolesti (prema preporukama SZO-a) na bolesnike s blagim i umjerenim oblikom bolesti te na one s teškim ili kritičnim oblikom bolesti. Opće karakteristike bolesnika s COVID-19 podijeljenih prema težini bolesti, kao i karakteristike zdravih ispitanika, prikazane su u tablici 2.

Kod dva ispitanika koja su na prijemu bila hipoksična, prospektivnim praćenjem je zabilježen blagi i umjereni tijek bolesti. Dvadeset šest hipoksičnih i dva normoksična bolesnika razvila su teški oblik bolesti, dok su svi ispitanici koji su razvili kritični oblik bolesti bili hipoksični već na prijemu. Nije nađena statistički značajna razlika u dobi i spolu među skupinama ispitanika prema težini bolesti te zdravih ispitanika. Također, ispitanici se nisu statistički značajno razlikovali u koncentraciji kreatinina i eGFR-a. Bolesnici s teškim i kritičnim oblikom COVID-19 imali su niže zasićenje hemoglobina kisikom u odnosu na skupinu s blagim i umjerenim COVID-19, s najnižim vrijednostima zabilježenim u skupini kritičnih bolesnika.

Tablica 2. Osnovne karakteristike zdravih ispitanika i bolesnika s COVID-19 koji su prospektivnim praćenjem podijeljeni u skupine s blagim i umjerenim, teškim te kritičnim oblikom bolesti

	zdravi ispitanici (N = 47)	blagi i umjereni COVID-19 (N = 49)	teški COVID-19 (N = 28)	kritični COVID-19 (N = 19)	P₁	P₂	P₃
dob (godine)	58 (39 – 70)	53 (36 – 73)	55 (37 – 69)	60 (39 – 72)	0,188	0,130	0,189
spol							
muškarci, N	31	31	18	15	0,655	0,446	0,343
žene, N	16	18	10	4			
SpO ₂ (%)	/	97 (97 – 98)	88 (87 – 90)	85 (76 – 88)	/	< 0,001	< 0,001
kreatinin (μmol/L)	77 ± 12	80 ± 15	78 ± 13	80 ± 16	0,290	0,903	0,677
eGFR (mL/min/1,73m ²)	91 (80 – 99)	87 (79 – 100)	91 (75 – 102)	84 (77 – 98)	0,515	0,894	0,879
trajanje simptoma na prijemu (dani), N	/	8 ± 3	10 ± 2	9 ± 3	/	0,007	0,420

SpO₂, zasićenje hemoglobina kisikom; eGFR, procijenjena brzina glomerularne filtracije (engl. *estimated glomerular filtration rate*)

P₁ – statistička značajnost razlike između blagih i umjerenih, teških ili kritičnih bolesnika s COVID-19 i zdravih ispitanika; provedena je post hoc analiza

P₂- statistička značajnost razlike između teških ili kritičnih bolesnika i blagih i umjerenih bolesnika s COVID-19; provedena je post hoc analiza

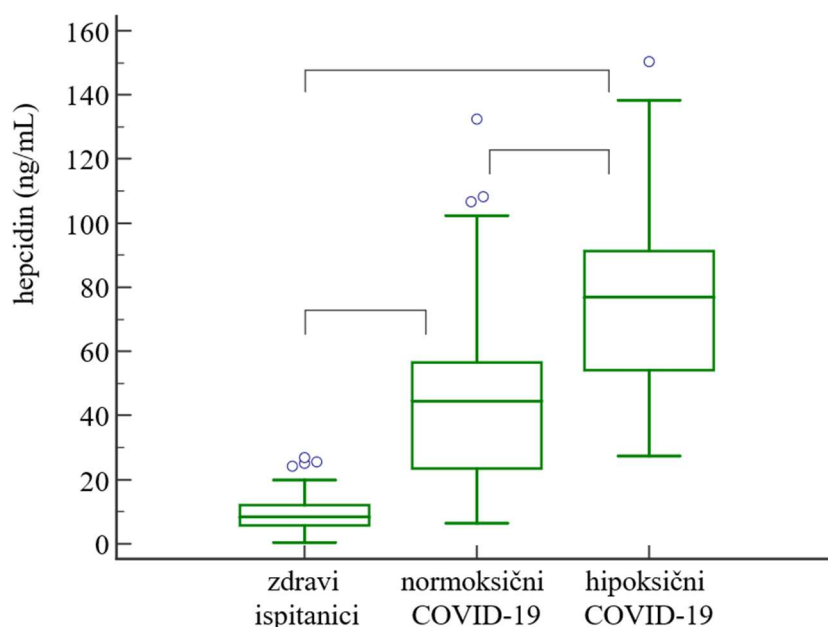
P₃ – statistička značajnost razlike između teških i kritičnih bolesnika s COVID-19

Dob je prikazana kao medijan (raspon), dok su spol i vrijeme trajanja simptoma na prijemu prikazani kao apsolutni broj N. Kvantitativni podaci prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija i medijan (interkvartilni raspon). Statistički značajnim razlikama smatrale su se vrijednosti $P < 0,05$.

4.2. Parametri metabolizma željeza, eritropoetske aktivnosti i upale kod zdravih ispitanika, svih ispitanika s COVID-19 te normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19

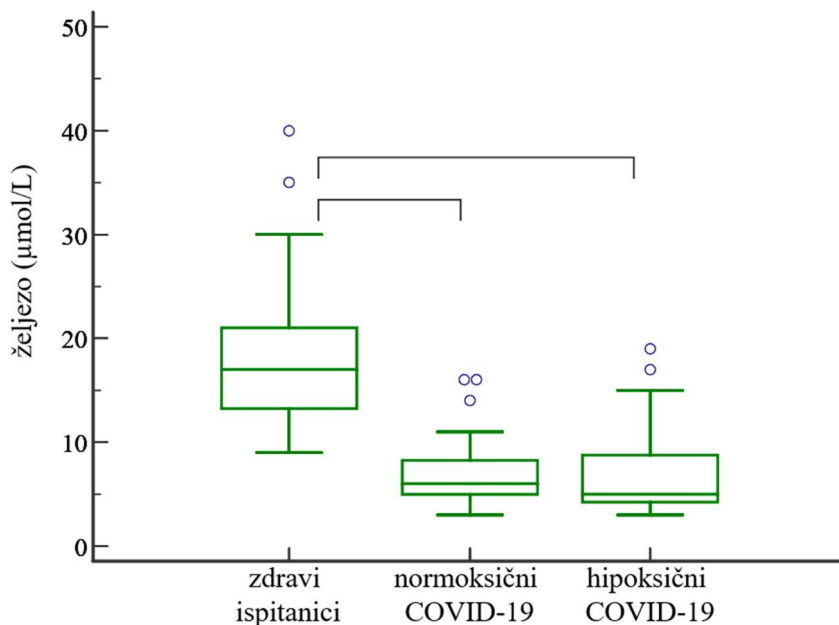
4. 2. 1. Parametri metabolizma željeza i eritropoetske aktivnosti te omjeri hepcidina s parametrima metabolizma željeza i eritropoeze

Plazmatska koncentracija hepcidina bila je značajno viša kod normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19 u usporedbi sa zdravim ispitanicima, pri čemu su najviše koncentracije hepcidina izmjerene u skupini hipoksičnih bolesnika s COVID-19 (slika 5).



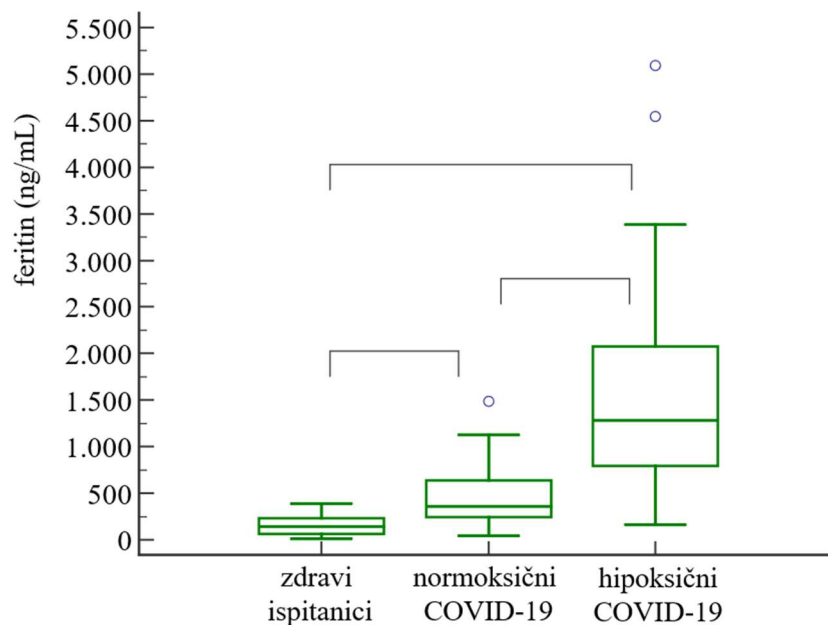
Slika 5. Koncentracija hepcidina u skupini normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19 te skupini zdravih ispitanika. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama ispitane su Kruskal-Wallisovim testom, nakon čega je provedena post hoc analiza. Konektori na slici označavaju između kojih skupina je u post hoc analizi uočena statistički značajna razlika, pri čemu je $P < 0,05$.

Koncentracija željeza bila je značajno niža u obje skupine bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike. Nema razlike u koncentraciji željeza između hipoksičnih i normoksičnih bolesnika (slika 6).



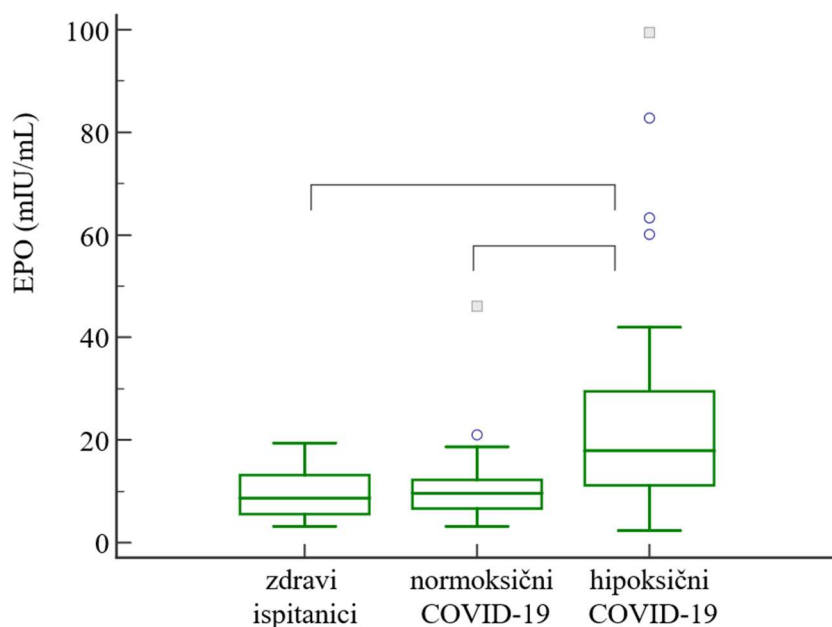
Slika 6. Koncentracija željeza u skupini normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19 te skupini zdravih ispitanika. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama ispitane su Kruskal-Wallisovim testom, nakon čega je provedena post hoc analiza. Konektori na slici označavaju između kojih skupina je u post hoc analizi uočena statistički značajna razlika, pri čemu je $P < 0,05$.

Koncentracija feritina bila je značajno viša kod bolesnika s COVID-19 u usporedbi sa zdravim ispitanicima, s najvišim vrijednostima zabilježenim u skupini hipoksičnih bolesnika s COVID-19 (slika 7).



Slika 7. Koncentracija feritina u skupini normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19 te skupini zdravih ispitanika. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama ispitanice su Kruskal-Wallisovim testom, nakon čega je provedena post hoc analiza. Konektori na slici označavaju između kojih skupina je u post hoc analizi uočena statistički značajna razlika, pri čemu je $P < 0,05$.

Koncentracija EPO-a bila je značajno viša samo u skupini hipoksičnih bolesnika s COVID-19 u odnosu na normoksične bolesnike s COVID-19 i zdrave ispitanike. Nije uočena statistički značajna razlika u koncentraciji eritropoetina između normoksičnih bolesnika s COVID-19 i zdravih ispitanika (slika 8).



Slika 8. Koncentracija EPO-a u skupini normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19 te skupini zdravih ispitanika. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama ispitane su Kruskal-Wallisovim testom, nakon čega je provedena post hoc analiza. Konektori na slici označavaju između kojih skupina je u post hoc analizi uočena statistički značajna razlika, pri čemu je $P < 0,05$.

Tablica 3 prikazuje vrijednosti parametara metabolizma željeza i eritropoetske aktivnosti te omjere hepcidina s parametrima metabolizma željeza (ferritin/hepcidin, hepcidin/željezo) i parametrom eritropoeze (hepcidin/EPO) u zdravih ispitanika, svih bolesnika s COVID-19 te bolesnika s COVID-19 podijeljenih u skupine normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19.

Koncentracija hemoglobina nije se razlikovala među skupinama normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19 te zdravih ispitanika.

Vrijednosti TIBC-a bile su niže u bolesnika s COVID-19 u usporedbi sa zdravim ispitanicima, s najnižim vrijednostima zabilježenim u skupini hipoksičnih ispitanika.

Hipoksični ispitanici imali su značajno niže vrijednosti UIBC-a u odnosu na normoksične bolesnike i zdrave ispitanike, dok razlika između normoksičnih bolesnika i zdravih ispitanika nije nađena.

Zasićenje transferina bilo je značajno niže u obje skupine bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike. Nije nađena razlika u vrijednosti TSAT-a između hipoksičnih i normoksičnih bolesnika.

Vrijednosti sTfR-a bile su više u bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike, te nije nađena statistički značajna razlika između normoksičnih i hipoksičnih bolesnika.

Značajno niže vrijednosti RET-He nađene su u skupinama normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike.

Bolesnici s COVID-19 imali su značajno niži broj RTC-a u odnosu na zdrave ispitanike. IRF je bio niži u obje skupine bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike, no vrijednosti su bile više u hipoksičnih u odnosu na normoksične bolesnike.

Omjer ferritin/hepcidin i hepcidin/željezo bio je značajno viši u skupini hipoksičnih bolesnika u odnosu na normoksične bolesnika s COVID-19.

Nije bilo razlike u vrijednosti omjera hepcidin/EPO među skupinama normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19 (tablica 3).

Tablica 3. Parametri metabolizma železa i eritropoetske aktivnosti kod zdravih ispitanika i svih bolesnika s COVID-19 te normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19

parametar	zdravi ispitanici (N = 47)	svi bolesnici s COVID-19 (N = 96)	normoksični bolesnici s COVID-19 (N = 49)	hipoksični bolesnici s COVID-19 (N = 47)	P₁	P₂
hemoglobin (g/L)	150 (137 - 154)	145 (135 - 154)	144 (135 - 156)	146 (136 - 154)	0,477	0,753
UIBC (μmol/L)	42 (35 - 49)	39 (32 - 45)	44 (37 - 47)	33 (29 - 40) ^{a,b}	0,064	< 0,001
TIBC (μmol/L)	59 (54 - 68)	46 (40 - 51)	50 (45 - 54) ^a	42 (37 - 46) ^{a,b}	< 0,001	< 0,001
TSAT (%)	28 (23 - 36)	13 (10 - 18)	12 (10 - 16) ^a	15 (10 - 20) ^a	< 0,001	< 0,001
sTfR (mg/L)	1,09 (1,00 - 1,25)	1,26 (1,07 - 1,45)	1,30 (1,12 - 1,49) ^a	1,23 (1,02 - 1,41) ^a	0,002	0,002
RET-He (pg)	33,0 (32,4 - 33,7)	30,1 (28,6 - 31,5)	30,2 (28,8 - 31,0) ^a	30,1 (28,4 - 31,9) ^a	< 0,001	< 0,001
RTC (x10 ⁹ /L)	67,60 (56,05 - 82,05)	26,10 (20,90 - 34,80)	25,60 (19,45 - 35,05) ^a	26,20 (21,80 - 34,63) ^a	< 0,001	< 0,001

parametar	zdravi ispitanici (N = 47)	svi bolesnici s COVID-19 (N = 96)	normoksični bolesnici s COVID-19 (N = 49)	hipoksični bolesnici s COVID-19 (N = 47)	P ₁	P ₂
IRF (%)	8,9 (7,5 – 10,3)	4,6 (3,4 – 7,9)	3,6 (3,0 – 4,9) ^a	6,2 (4,1 – 10,7) ^{a,b}	< 0,001	< 0,001
feritin/hepcidin	15,17 (9,84 – 25,09)	13,55 (7,06 – 20,91)	7,72 (6,24 – 13,98) ^a	19,02 (12,98 – 29,64) ^b	0,095	< 0,001
hepcidin/željezo	0,49 (0,34 – 0,84)	10,24 (5,04 – 14,05)	7,37 (3,44 – 12,00) ^a	13,04 (8,06 – 16,04) ^{a,b}	< 0,001	< 0,001
hepcidin/EPO	1,13 (0,57 – 2,14)	4,09 (2,32 – 7,60)	4,23 (2,36 – 7,81) ^a	4,08 (2,26 – 7,37) ^a	< 0,001	< 0,001

UIBC, nezasićeni kapacitet vezanja željeza; TIBC, ukupni kapacitet vezanja željeza; TSAT, zasićenje transferina; sTfR, topljivi transferinski receptori; RET-He, sadržaj hemoglobina u retikulocitima; RTC, retikulociti; IRF, frakcija nezrelih retikulocita; EPO, eritropoetin

P₁ – statistička značajnost razlike između zdravih ispitanika i svih bolesnika s COVID-19

P₂ – statistička značajnost razlike između zdravih ispitanika, normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19; provedena je post hoc analiza

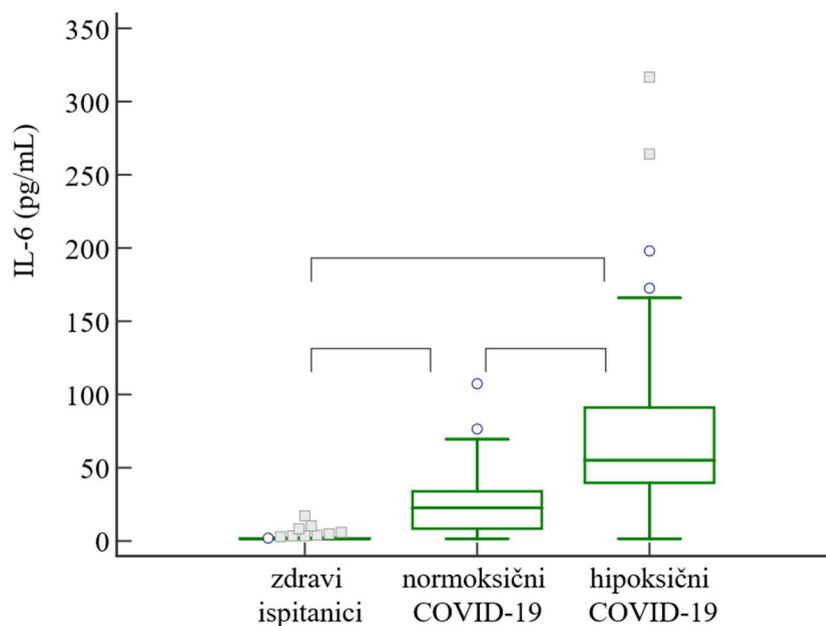
^a statistički značajna razlika između normoksičnih ili hipoksičnih bolesnika s COVID-19 i zdravih ispitanika

^b statistički značajna razlika između normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19

Rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon). Statistički značajnim razlikama smatrale su se vrijednosti P < 0,05.

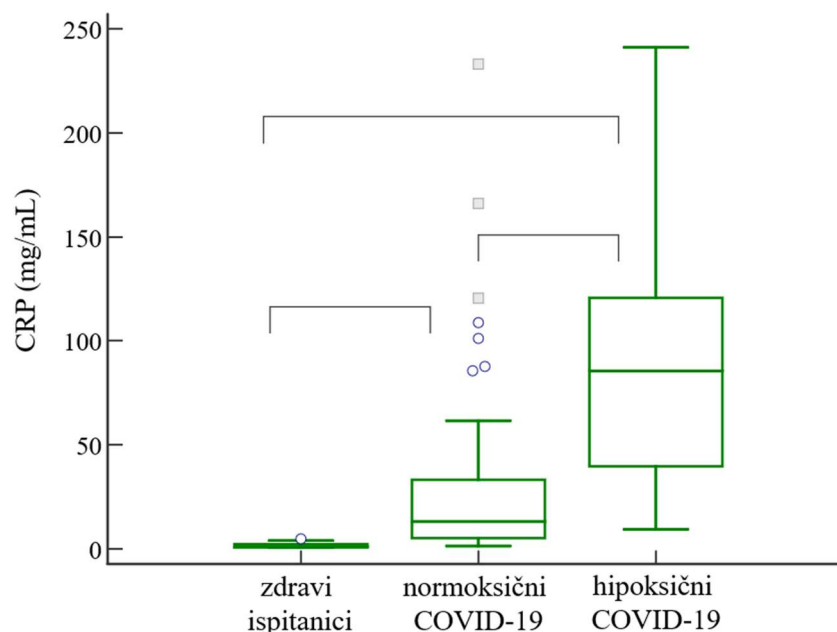
4. 2. 2. Parametri upale te omjeri s upalnim parametrima

Koncentracija IL-6 bila je značajno viša u skupini bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike, sa značajno višim vrijednostima izmjerenim u skupini hipoksičnih ispitanika u odnosu na normoksične ispitanike (slika 9).



Slika 9. Koncentracija IL-6 u skupini normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19 te skupini zdravih ispitanika. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama ispitane su Kruskal-Wallisovim testom, nakon čega je provedena post hoc analiza. Konektori na slici označavaju između kojih skupina je u post hoc analizi uočena statistički značajna razlika, pri čemu je $P < 0,05$.

Koncentracija CRP-a bila je značajno viša kod bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike. Najviše koncentracije CRP-a izmjerene su u skupini hipoksičnih bolesnika s COVID-19 (slika 10).



Slika 10. Koncentracija CRP-a u skupini normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19 te skupini zdravih ispitanika. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama ispitane su Kruskal-Wallisovim testom, nakon čega je provedena post hoc analiza. Konektori na slici označavaju između kojih skupina je u post hoc analizi uočena statistički značajna razlika, pri čemu je $P < 0,05$.

Tablica 4 prikazuje vrijednosti parametara upale te omjere s upalnim parametrima u zdravih ispitanika, svih bolesnika s COVID-19 te bolesnika s COVID-19 podijeljenih u skupine normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19.

Ukupan broj leukocita bio je značajno niži u skupini normoksičnih bolesnika s COVID-19 u odnosu na hipoksične bolesnike i zdrave ispitanike.

Broj neutrofilnih granulocita bio je značajno viši u skupini hipoksičnih bolesnika s COVID-19 u odnosu na normoksične bolesnike i zdrave ispitanike.

Bolesnici s COVID-19 imali su značajno niži broj limfocita, monocita i eozinofilnih granulocita u odnosu na zdrave ispitanike, s najnižim vrijednostima izmjerenim u skupini hipoksičnih bolesnika.

Omjer hepcidin/CRP i hepcidin/IL-6 bio je niži u skupini hipoksičnih u odnosu na normoksične bolesnike.

Omjeri CRP/IL-6 i NMR bili su značajno viši u skupini hipoksičnih bolesnika u odnosu na normoksične bolesnike s COVID-19 i zdrave ispitanike.

Omjer MLR bio je značajno viši u bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike.

Bolesnici s COVID-19 imali su značajno više vrijednosti omjera CRP/neutrofilni granulociti, CRP/limfociti, CRP/monociti, IL-6/neutrofilni granulociti, IL-6/limfociti, IL-6/monociti i NLR u odnosu na zdrave ispitanike, s najvišim vrijednostima izmjerenim u skupini hipoksičnih bolesnika (tablica 4).

Tablica 4. Upalni parametri kod zdravih ispitanika i svih bolesnika s COVID-19 te normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19

parametar	zdravi ispitanici (N = 47)	svi bolesnici s COVID-19 (N = 96)	normoksični bolesnici s COVID-19 (N = 49)	hipoksični bolesnici s COVID-19 (N = 47)	P₁	P₂
ukupni leukociti (x 10 ⁹ /L)	7,0 (5,3 - 7,4)	5,8 (4,4 - 8,8)	4,9 (3,9 - 6,1) ^a	8,3 (5,0 - 11,1) ^b	0,305	< 0,001
neutrofilni granulociti (x 10 ⁹ /L)	3,57 (2,75 - 4,09)	3,82 (2,69 - 6,95)	2,92 (2,02 - 3,86)	6,70 (3,76 - 9,65) ^{a,b}	0,033	< 0,001
limfociti (x 10 ⁹ /L)	2,30 (1,97 - 2,64)	1,04 (0,68 - 1,44)	1,23 (0,97 - 1,61) ^a	0,74 (0,59 - 1,12) ^{a,b}	< 0,001	< 0,001
monociti (x 10 ⁹ /L)	0,54 (0,44 - 0,67)	0,41 (0,32 - 0,58)	0,46 (0,35 - 0,61) ^a	0,37 (0,27 - 0,53) ^{a,b}	< 0,001	< 0,001
eozinofilni granulociti (x 10 ⁹ /L)	0,15 (0,11 - 0,24)	0,00 (0,00 - 0,02)	0,01 (0,00 - 0,04) ^a	0,00 (0,00 - 0,01) ^{a,b}	< 0,001	< 0,001
hepcidin /CRP	7,14 (2,70 - 12,16)	1,67 (0,77 - 3,25)	2,58 (1,39 - 6,42) ^a	0,93 (0,53 - 1,80) ^{a,b}	< 0,001	< 0,001
hepcidin/IL-6	4,54 (2,50 - 7,02)	1,57 (1,00 - 2,45)	1,94 (1,42 - 3,69) ^a	1,33 (0,61 - 1,92) ^{a,b}	< 0,001	< 0,001
CRP/IL-6	0,60 (0,40 - 1,17)	1,01 (0,56 - 1,91)	0,87 (0,52 - 1,36)	1,36 (0,66 - 2,25) ^{a,b}	0,010	0,003
CRP/neutrofilni granulociti	0,36 (0,23 - 0,76)	9,02 (3,14 - 16,98)	4,17 (2,03 - 12,24) ^a	12,30 (7,59 - 21,84) ^{a,b}	< 0,001	< 0,001

parametar	zdravi ispitanici (N = 47)	svi bolesnici s COVID-19 (N = 96)	normoksični bolesnici s COVID-19 (N = 49)	hipoksični bolesnici s COVID-19 (N = 47)	P ₁	P ₂
CRP/limfociti	0,61 (0,32 - 0,95)	43,51 (10,76 - 103,42)	10,92 (3,87 – 36,13) ^a	85,44 (50,18 – 166,98) ^{a,b}	< 0,001	< 0,001
CRP/monociti	2,18 (1,63 - 3,93)	87,69 (28,09 - 250,02)	29,76 (10,95 – 86,19) ^a	232,35 (97,58 - 398,51) ^{a,b}	< 0,001	< 0,001
IL-6/neutrofilni granulociti	0,52 (0,41 - 0,68)	7,71 (4,54 - 14,02)	6,77 (2,65 - 12,17) ^a	9,46 (5,16 – 17,12) ^{a,b}	< 0,001	< 0,001
IL-6/limfociti	0,73 (0,62 - 1,07)	36,29 (17,01 - 73,48)	17,76 (6,20 – 28,42) ^a	69,86 (39,28 – 127,88) ^{a,b}	< 0,001	< 0,001
IL-6/monociti	3,13 (2,51 - 4,15)	84,07 (36,96 - 188,79)	40,24 (17,01 – 87,67) ^a	168,68 (83,92 – 259,77) ^{a,b}	< 0,001	< 0,001
NLR	1,50 (1,26 - 1,87)	4,39 (2,20 - 8,21)	2,52 (1,64 – 3,21) ^a	7,16 (5,16 – 12,93) ^{a,b}	< 0,001	< 0,001
NMR	6,00 (5,01 - 7,26)	10,06 (6,52 - 16,08)	6,69 (5,10 – 9,02)	16,00 (13,23 – 24,08) ^{a,b}	< 0,001	< 0,001
MLR	0,25 (0,19 - 0,30)	0,39 (0,30 - 0,59)	0,33 (0,30 – 0,47) ^a	0,51 (0,33 – 0,69) ^a	< 0,001	< 0,001

CRP, C-reaktivni protein; IL-6, interleukin 6; NLR, omjer neutrofilnih granulocita i limfocita (engl. *neutrophil to lymphocyte ratio*); NMR, omjer neutrofilnih granulocita i monocita (engl. *neutrophil to monocyte ratio*); MLR, omjer monocita i limfocita (engl. *monocyte to lymphocyte ratio*)

P₁ – statistička značajnost razlike između zdravih ispitanika i svih bolesnika s COVID-19

P₂ – statistička značajnost razlike između zdravih ispitanika, normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19; provedena je post hoc analiza

^a statistički značajna razlika između normoksičnih ili hipoksičnih bolesnika s COVID-19 i zdravih ispitanika

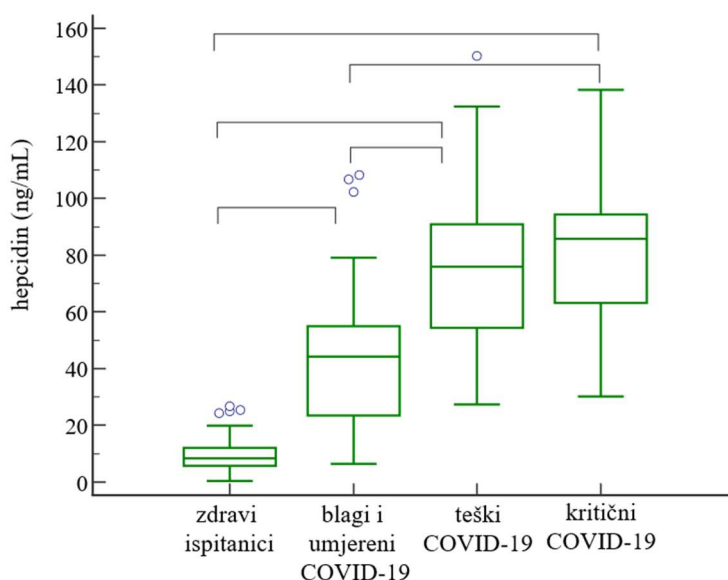
^b statistički značajna razlika između normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19

Rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni) raspon. Statistički značajnim razlikama smatrale su se vrijednosti $P < 0,05$.

4.3. Parametri metabolizma željeza, eritropoetske aktivnosti i upale kod zdravih ispitanika i ispitanika s COVID-19 podijeljenih prospektivnim praćenjem u skupine prema težini bolesti

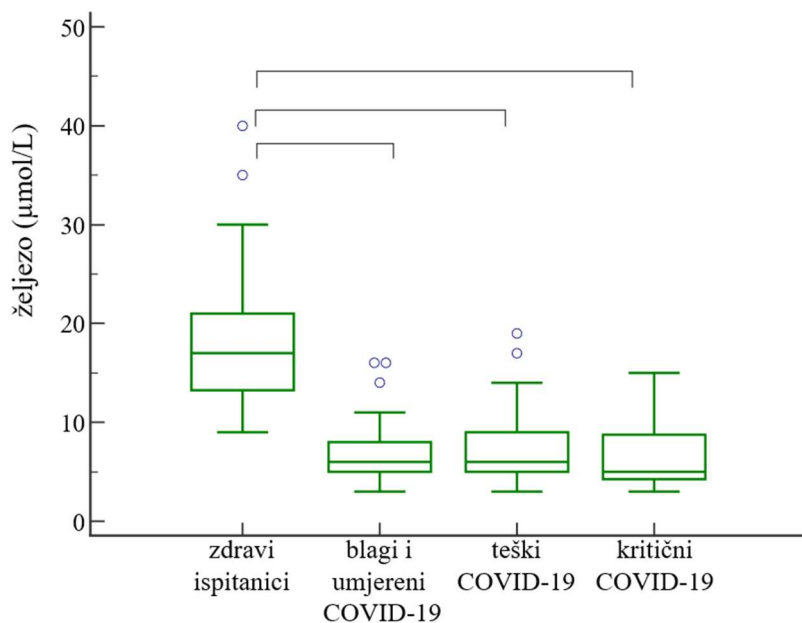
4. 3. 1. Parametri metabolizma željeza i eritropoetske aktivnosti te omjeri hepcidina s parametrima metabolizma željeza i eritropoeze

Plazmatska koncentracija hepcidina bila je značajno viša kod svih bolesnika s COVID-19 na prijemu u odnosu na zdrave ispitanike. Ispitanici koji su razvili teški i kritični oblik bolesti imali su značajno više koncentracije hepcidina na prijemu u odnosu na bolesnike koji su imali blagi i umjereni tijekom bolesti. Koncentracija hepcidina na prijemu nije se razlikovala kod bolesnika koji su razvili teški i onih koji su razvili kritični oblik bolesti (slika 11).



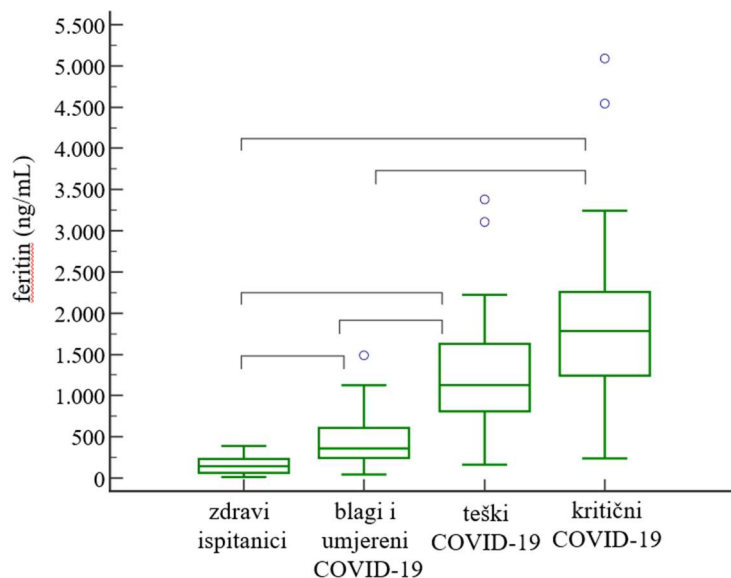
Slika 11. Koncentracija hepcidina kod zdravih ispitanika i kod bolesnika s COVID-19 podijeljenih prospektivnim praćenjem u skupine prema težini bolesti. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama ispitane su Kruskal-Wallisovim testom, nakon čega je provedena post hoc analiza. Konektori na slici označavaju između kojih skupina je u post hoc analizi uočena statistički značajna razlika, pri čemu je $P < 0,05$.

Koncentracija željeza bila je značajno niža kod bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike. Nema razlike u koncentraciji željeza između skupina bolesnika s COVID-19 podijeljenih prema težini bolesti (slika 12).



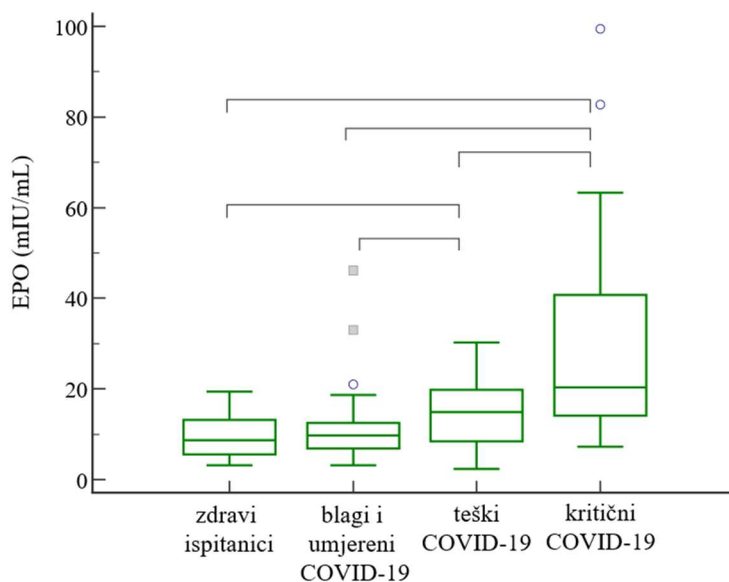
Slika 12. Koncentracija željeza kod zdravih ispitanika i kod bolesnika s COVID-19 podijeljenih prospektivnim praćenjem u skupine prema težini bolesti. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama ispitane su Kruskal-Wallisovim testom, nakon čega je provedena post hoc analiza. Konektori na slici označavaju između kojih skupina je u post hoc analizi uočena statistički značajna razlika, pri čemu je $P < 0,05$.

Koncentracija feritina bila je najviša kod bolesnika koji su razvili teški i kritični oblik COVID-19 te se značajno razlikovala u odnosu na bolesnike s blagim i umjerenim oblikom bolesti i zdrave ispitanike (slika 13).



Slika 13. Koncentracija feritina kod zdravih ispitanika i kod bolesnika s COVID-19 podijeljenih prospektivnim praćenjem u skupine prema težini bolesti. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama ispitane su Kruskal-Wallisovim testom, nakon čega je provedena post hoc analiza. Konektori na slici označavaju između kojih skupina je u post hoc analizi uočena statistički značajna razlika, pri čemu je $P < 0,05$.

Koncentracija EPO-a na prijemu bila je značajno viša u skupinama bolesnika koji su razvili teški i kritični oblik COVID-19 u odnosu na bolesnike s blagim i umjerenim tijekom bolesti i zdrave ispitanike. Najviše koncentracije EPO-a na prijemu imali su bolesnici koji su razvili kritični oblik bolesti. Nije nađena statistički značajna razlika u koncentraciji EPO-a između bolesnika s blagim i umjerenim tijekom bolesti i zdravih ispitanika (slika 14).



Slika 14. Koncentracija EPO-a kod zdravih ispitanika i kod bolesnika s COVID-19 podijeljenih prospektivnim praćenjem u skupine prema težini bolesti. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama ispitane su Kruskal-Wallisovim testom, nakon čega je provedena post hoc analiza. Konektori na slici označavaju između kojih skupina je u post hoc analizi uočena statistički značajna razlika, pri čemu je $P < 0,05$.

Tablica 5 prikazuje vrijednosti parametara metabolizma željeza i eritropoetske aktivnosti te omjere hepcidina s parametrima metabolizma željeza (ferritin/hepcidin, hepcidin/željezo) i parametrom eritropoeze (hepcidin/EPO) u zdravih ispitanika te bolesnika s COVID-19 podijeljenih prospektivnim praćenjem u skupine bolesnika s blagim i umjerenim, teškim i kritičnim oblikom COVID-19 (prema preporukama SZO-a).

Koncentracija hemoglobina nije se razlikovala među skupinama bolesnika s COVID-19 koji su prospektivnim praćenjem podijeljeni u skupine prema težini bolesti.

Vrijednosti TIBC-a i UIBC-a bile su niže u skupini teških i kritičnih COVID-19 bolesnika u odnosu na bolesnike s blagim i umjerenim oblikom bolesti i zdrave ispitanike. Niže vrijednosti TIBC-a nađene su u skupini blagih i umjerenih bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike. Nije bilo razlike u vrijednosti UIBC-a između bolesnika s blagim i umjerenim tijekom bolesti i zdravih ispitanika.

Zasićenje transferina bilo je značajno niže kod bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike. Nije nađena razlika u vrijednosti TSAT-a između skupina bolesnika s COVID-19 podijeljenih prema težini bolesti.

Vrijednosti sTfR-a bile su više u bolesnika s blagim i umjerenim te teškim oblikom COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike, no nije nađena statistički značajna razlika između bolesnika koji su razvili kritični oblik COVID-19 i zdravih ispitanika.

Sve skupine bolesnika s COVID-19 imale su značajno niže vrijednosti RET-He u odnosu na zdrave ispitanike.

Bolesnici s COVID-19 imali su značajno niži broj RTC-a u odnosu na zdrave ispitanike. IRF je bio niži u svim skupinama bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike, no vrijednosti su bile više u bolesnika koji su razvili teški i kritični oblik COVID-19 u odnosu na bolesnike koji su imali blagi i umjereni tijek bolesti.

Omjer ferritin/hepcidin i hepcidin/željezo bio je značajno viši u skupinama bolesnika koji su razvili teški i kritični oblik bolesti u odnosu na bolesnike s blagim i umjerenim oblikom bolesti.

Niže vrijednosti omjera hepcidin/EPO nađene su u skupini bolesnika koja je razvila kritični oblik bolesti u odnosu na bolesnike s teškim oblikom bolesti (tablica 5).

Tablica 5. Parametri metabolizma željeza i eritropoetske aktivnosti kod zdravih ispitanika i bolesnika s COVID-19 koji su prospektivnim praćenjem podijeljeni u skupine s blagim i umjerenim, teškim te kritičnim oblikom bolesti

parametar	zdravi ispitanici (N = 47)	blagi i umjereni COVID-19 (N = 49)	teški COVID-19 (N = 28)	kritični COVID-19 (N = 19)	P
hemoglobin (g/L)	150 (137 - 154)	143 (134 - 156)	145 (138 - 154)	147 (136 - 152)	0,869
UIBC (μmol/L)	42 (35 - 49)	44 (36 - 47)	34 (29 - 39) ^{a,b}	33 (29 - 41) ^{a,b}	< 0,001
TIBC (μmol/L)	59 (54 - 68)	49 (44 - 53) ^a	43 (38 - 47) ^{a,b}	41 (37 - 47) ^{a,b}	< 0,001
TSAT (%)	28 (23 - 36)	12 (10 - 15) ^a	15 (11 - 19) ^a	16 (10 - 21) ^a	< 0,001
sTfR (mg/L)	1,09 (1,00 - 1,25)	1,29 (1,12 - 1,48) ^a	1,23 (1,06 - 1,45) ^a	1,23 (1,01 - 1,40)	0,010
RET-He (pg)	33,0 (32,4 - 33,7)	30,2 (28,6 - 31,0) ^a	30,1 (28,5 - 31,8) ^a	30,1 (28,7 - 31,6) ^a	< 0,001
RTC (x10 ⁹ /L)	67,60 (56,05 - 82,05)	25,60 (19,45 - 35,58) ^a	26,75 (22,05 - 35,05) ^a	26,10 (20,90 - 33,38) ^a	< 0,001
IRF (%)	8,9 (7,5 - 10,3)	3,6 (3,1 - 5,4) ^a	6,5 (4,4, - 11,0) ^{a,b}	4,9 (3,5 - 10,0) ^{a,b}	< 0,001

parametar	zdravi ispitanici	blagi i umjereni	teški	kritični	P
	(N = 47)	COVID-19 (N = 49)	COVID-19 (N = 28)	COVID-19 (N = 19)	
feritin/hepcidin	15,17 (9,84 – 25,09)	7,72 (6,26 – 14,19) ^a	16,78 (11,94 – 24,23) ^b	23,16 (13,83 – 33,23) ^b	< 0,001
hepcidin/željezo	0,49 (0,34 – 0,84)	7,37 (3,44 – 12,00) ^a	12,40 (8,08 – 15,50) ^{a,b}	13,04 (9,86 – 16,92) ^{a,b}	< 0,001
hepcidin/EPO	1,13 (0,57 – 2,14)	4,07 (2,13 – 6,89) ^a	5,40 (3,21 – 7,86) ^a	3,29 (1,51 – 6,42) ^{a,c}	< 0,001

UIBC, nezasićeni kapacitet vezanja željeza; TIBC, ukupni kapacitet vezanja željeza; TSAT, zasićenje transferina; sTfR, topljivi transferinski receptori; RET-He, sadržaj hemoglobina u retikulocitima; RTC, retikulociti; IRF, frakcija nezrelih retikulocita; EPO, eritropoetin

P – statistička značajnost razlike između zdravih ispitanika i skupina COVID-19 bolesnika podijeljenih prema težini bolesti; provedena je post hoc analiza

^a statistički značajna razlika između blagih i umjerenih, teških ili kritičnih bolesnika s COVID-19 i zdravih ispitanika

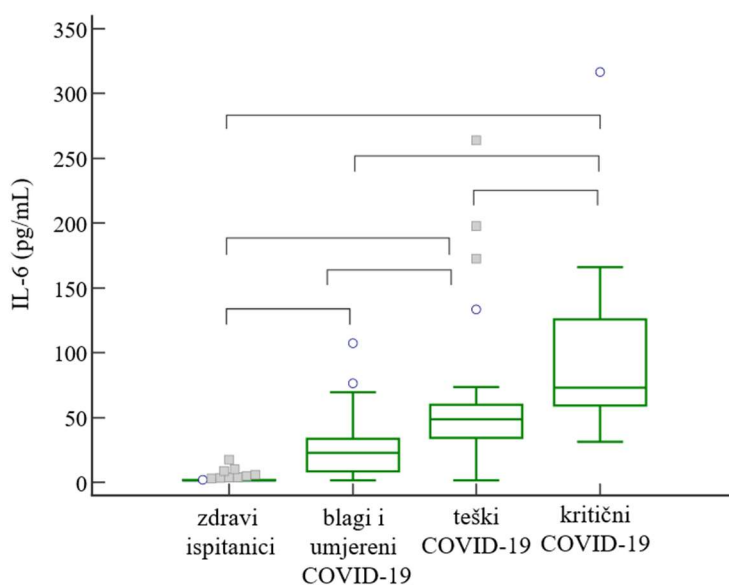
^b statistički značajna razlika između teških ili kritičnih te blagih i umjerenih bolesnika s COVID-19

^c statistički značajna razlika između teških i kritičnih bolesnika s COVID-19

Rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon). Statistički značajnim razlikama smatrale su se vrijednosti $P < 0,05$.

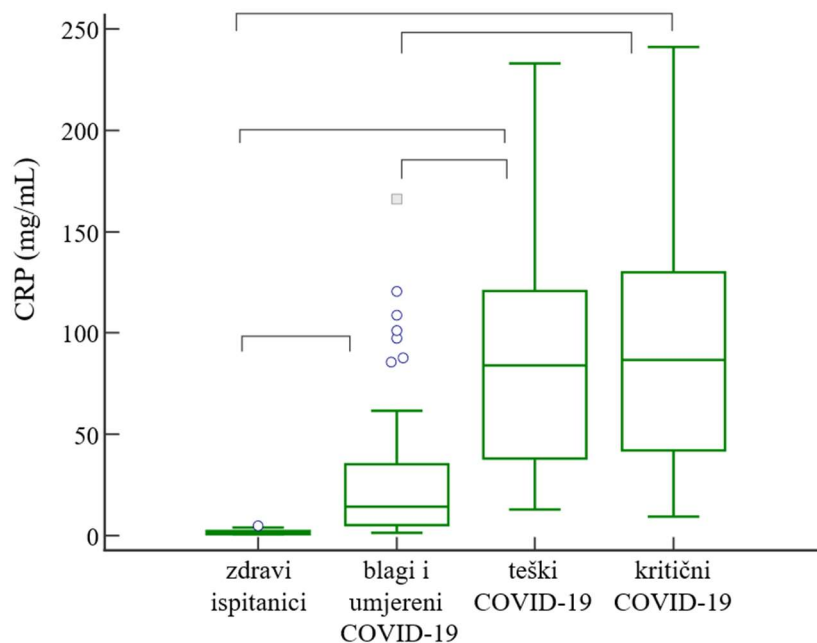
4. 3. 2. Parametri upale te omjeri s upalnim parametrima

Koncentracija IL-6 bila je značajno viša u skupini bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike. Koncentracija IL-6 bila je najviša u skupini bolesnika koji su razvili kritični oblik bolesti. Također, koncentracija IL-6 na prijemu bila je viša u skupini bolesnika koji su razvili teški oblik bolesti u odnosu na bolesnike koji su imali blagi i umjereni tijek bolesti (slika 15).



Slika 15. Koncentracija IL-6 kod zdravih ispitanika i kod bolesnika s COVID-19 podijeljenih prospektivnim praćenjem u skupine prema težini bolesti. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama ispitanice su Kruskal-Wallisovim testom, nakon čega je provedena post hoc analiza. Konektori na slici označavaju između kojih skupina je u post hoc analizi uočena statistički značajna razlika, pri čemu je $P < 0,05$.

Koncentracija CRP-a bila je značajno viša kod bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike. Najviše koncentracije CRP-a izmjerene su u skupinama bolesnika s teškim i kritičnim tijekom bolesti, no nije bilo značajne razlike u koncentraciji CRP-a između skupina bolesnika s teškim i kritičnim oblikom bolesti (slika 16).



Slika 16. Koncentracija CRP-a kod zdravih ispitanika i kod bolesnika s COVID-19 podijeljenih prospektivnim praćenjem u skupine prema težini bolesti. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama ispitane su Kruskal-Wallisovim testom, nakon čega je provedena post hoc analiza. Konektori na slici označavaju između kojih skupina je u post hoc analizi uočena statistički značajna razlika, pri čemu je $P < 0,05$.

Tablica 6 prikazuje vrijednosti parametara upale te omjere s upalnim parametrima u zdravih ispitanika te skupinama bolesnika s COVID-19 podijeljenih prema težini bolesti.

Ukupan broj leukocita bio je značajno niži u skupini bolesnika s blagim i umjerenim tijekom bolesti u odnosu na ispitanike koji su razvili teški ili kritični oblik COVID-19 i zdrave ispitanike.

Broj neutrofilnih granulocita na prijemu bio je značajno viši u skupini bolesnika koji su razvili teški i kritični oblik COVID-19 u odnosu na bolesnike s blagim i umjerenim tijekom bolesti i zdrave ispitanike.

Bolesnici s COVID-19 imali su značajno niži broj limfocita, monocita i eozinofilnih granulocita u odnosu na zdrave ispitanike, s najnižim vrijednostima limfocita i eozinofilnih granulocita u bolesnika koji su razvili teški i kritični oblik bolesti. Broj monocita u skupini bolesnika koja je razvila kritični oblik bolesti bio je značajno niži od broja monocita u skupini bolesnika s blagim i umjerenim oblikom bolesti.

Značajno niže vrijednosti omjera hepcidin/CRP i hepcidin/IL-6 nađene su u skupinama s teškim i kritičnim oblikom bolesti u odnosu na blagi i umjereni COVID-19.

Omjer CRP/IL-6 bio je viši u skupini bolesnika s teškim tijekom bolesti u odnosu na bolesnika s blagim i umjerenim tijekom bolesti i zdrave ispitanike.

Bolesnici s COVID-19 imali su značajno više vrijednosti omjera CRP/neutrofilni granulociti, CRP/limfociti, CRP/monociti, NLR-a i NMR-a u odnosu na zdrave ispitanike, s najvišim vrijednostima izmjerenim u skupini bolesnika s teškim i kritičnim oblikom bolesti.

Omjer IL-6/neutrofilni granulociti, IL-6/limfociti i IL-6/monociti bio je značajno viši kod COVID-19 bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike, s najvišim vrijednostima u skupini bolesnika s kritičnim tijekom bolesti. Vrijednosti omjera IL-6/limfociti i IL-6/monociti bile su značajno više kod teškog oblika bolesti u odnosu na bolesnike s blagim i umjerenim tijekom bolesti.

Više vrijednosti omjera MLR zabilježene su kod bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike, pri čemu su vrijednosti u skupini bolesnika koji su razvili teški oblik bolesti bile značajno više u odnosu na one s blagim i umjerenim oblikom COVID-19 (tablica 6).

Tablica 6. Upalni parametri kod zdravih ispitanika i bolesnika s COVID-19 koji su prospektivnim praćenjem podijeljeni u skupine s blagim i umjerenim, teškim te kritičnim oblikom bolesti

parametri	zdravi ispitanici	blagi i umjereni	teški	kritični	P
	(N = 47)	COVID-19 (N = 49)	COVID-19 (N = 28)	COVID-19 (N = 19)	
ukupni leukociti (x 10 ⁹ /L)	7,0 (5,3 – 7,4)	4,9 (3,9 – 6,2) ^a	8,5 (4,9 – 10,3) ^b	7,6 (5,4 – 12,0) ^b	< 0,001
neutrofilni granulociti (x 10 ⁹ /L)	3,57 (2,75 - 4,09)	2,92 (2,04 – 3,93)	7,03 (3,63 – 8,90) ^{a,b}	6,52 (4,07 – 10,78) ^{a,b}	< 0,001
limfociti (x 10 ⁹ /L)	2,30 (1,97 - 2,64)	1,23 (0,97 – 1,61) ^a	0,76 (0,58 – 1,05) ^{a,b}	0,88 (0,61 – 1,26) ^{a,b}	< 0,001
monociti (x 10 ⁹ /L)	0,54 (0,44 - 0,67)	0,48 (0,35 – 0,65) ^a	0,38 (0,28 – 0,53) ^a	0,35 (0,26 – 0,49) ^{a,b}	< 0,001
eozinofilni granulociti (x 10 ⁹ /L)	0,15 (0,11 - 0,24)	0,01 (0,00 – 0,04) ^a	0,00 (0,00 – 0,00) ^{a,b}	0,00 (0,00 – 0,01) ^{a,b}	< 0,001
hepcidin /CRP	7,14 (2,70 – 12,16)	2,49 (1,34 – 6,42) ^a	1,03 (0,61 – 1,76) ^{a,b}	0,87 (0,43 – 1,98) ^{a,b}	< 0,001
hepcidin/IL-6	4,54 (2,50 – 7,02)	1,85 (1,33 – 3,27) ^a	1,47 (0,75 – 2,07) ^{a,b}	1,39 (0,59 – 1,64) ^{a,b}	< 0,001
CRP/IL-6	0,60 (0,40 - 1,17)	0,88 (0,54 – 1,42)	1,63 (0,69 – 2,64) ^{a,b}	1,32 (0,45 – 1,60)	0,006
CRP/neutrofilni granulociti	0,36 (0,23 - 0,76)	4,17 (2,03 – 12,24) ^a	12,27 (6,40 – 21,41) ^{a,b}	12,30 (7,59 – 22,27) ^{a,b}	< 0,001

parametri	zdravi ispitanici (N = 47)	blagi i umjereni COVID-19 (N = 49)	teški COVID-19 (N = 28)	kritični COVID-19 (N = 19)	P
CRP/limfociti	0,61 (0,32 - 0,95)	11,19 (3,87 – 38,30) ^a	93,53 (40,14 – 177,15) ^{a,b}	67,21 (51,17 – 173,36) ^{a,b}	< 0,001
CRP/monociti	2,18 (1,63 - 3,93)	29,76 (10,95 – 100,49) ^a	238,01 (83,79 – 408,09) ^{a,b}	229,31 (87,68 – 459,91) ^{a,b}	< 0,001
IL-6/neutrofilni granulociti	0,52 (0,41 - 0,68)	6,67 (2,66 – 12,78) ^a	7,18 (4,62 – 16,01) ^a	13,52 (8,51 – 25,55) ^{a,b,c}	< 0,001
IL-6/limfociti	0,73 (0,62 - 1,07)	17,76 (6,20 – 29,64) ^a	61,31 (32,65 – 91,86) ^{a,b}	97,92 (47,28 – 187,53) ^{a,b,c}	< 0,001
IL-6/monociti	3,13 (2,51 - 4,15)	40,24 (17,01 – 79,10) ^a	102,59 (67,02 – 188,84) ^{a,b}	228,22 (166,01 – 321,79) ^{a,b,c}	< 0,001
NLR	1,50 (1,26 - 1,87)	2,66 (1,64 – 3,21) ^a	6,86 (5,02 – 11,22) ^{a,b}	7,13 (5,33 – 14,05) ^{a,b}	< 0,001
NMR	6,00 (5,01 - 7,26)	7,11 (5,10 – 10,07) ^a	16,22 (10,01 – 23,54) ^{a,b}	15,90 (10,93 – 23,79) ^{a,b}	< 0,001
MLR	0,25 (0,19 - 0,30)	0,33 (0,30 – 0,47) ^a	0,52 (0,34 – 0,70) ^{a,b}	0,45 (0,27 – 0,62) ^a	< 0001

CRP, C-reaktivni protein; IL-6, interleukin 6; NLR, omjer neutrofilnih granulocita i limfocita (engl. *neutrophil to lymphocyte ratio*); NMR, omjer neutrofilnih granulocita i monocita (engl. *neutrophil to monocyte ratio*); MLR, omjer monocita i limfocita (engl. *monocyte to lymphocyte ratio*)
P – statistička značajnost razlike između zdravih ispitanika i skupina bolesnika s COVID-19 podijeljenih prema težini bolesti; provedena je post hoc analiza

^a statistički značajna razlika između blagih i umjerenih, teških ili kritičnih bolesnika s COVID-19 i zdravih ispitanika

^b statistički značajna razlika između teških ili kritičnih te blagih i umjerenih bolesnika s COVID-19

^c statistički značajna razlika između teških i kritičnih bolesnika s COVID-19

Rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon). Statistički značajnim razlikama smatrale su se vrijednosti $P < 0,05$.

4.4. Povezanost hepcidina s parametrima metabolizma željeza, eritropoeze, hipoksije i upale

Koncentracija hepcidina regulirana je različitim čimbenicima koji mogu djelovati stimilirajuće ili inhibirajuće na ekspresiju hepcidina. Upala i povećana koncentracija željeza u organizmu stimiliraju, dok anemija/hipoksija, eritropetska aktivnost i smanjena koncentracija željeza u organizmu inhibiraju ekspresiju hepcidina.

Rezultati ispitivanja povezanosti plazmatske koncentracije hepcidina s parametrima metabolizma željeza, eritropoeze, hipoksije i sustavne upale kao čimbenicima koji utječu na koncentraciju hepcidina prikazani su u tablici 7. Povezanost je izražena koeficijentom korelacije r .

Koncentracija hepcidina pozitivno je korelirala s koncentracijom feritina u svim ispitivanim skupinama.

U normoksičnoj skupini COVID-19 bolesnika dokazna je negativna povezanost koncentracije hepcidina s koncentracijom željeza i TSAT-om, no u skupini hipoksičnih bolesnika povezanost ovih parametara nije nađena. U skupini zdravih ispitanika dokazana je pozitivna povezanost s TSAT-om.

Hepcidin nije korelirao s UIBC-om i TIBC-om, sTfR-om i RET-He-om u skupini normoksičnih i hipoksičnih COVID-19 bolesnika. U skupini zdravih ispitanika dokazana je slaba negativna povezanost UIBC-a i TIBC-a s hepcidinom.

Slaba negativna povezanost hepcidina s RTC-om dokazana je u skupini normoksičnih COVID-19 bolesnika, no nije dokazana povezanost hepcidina s IRF-om. Suprotno tome, u skupini hipoksičnih ispitanika hepcidin nije korelirao s RTC-om, no dokazana je slaba negativna korelacija s IRF-om. U skupini zdravih ispitanika nije bilo povezanosti hepcidina s RTC-om i IRF-om.

Hepcidin nije korelirao s SpO₂ niti u normoksičnoj niti u hipoksičnoj skupini bolesnika s COVID-19.

Nije dokazana povezanost hepcidina s koncentracijom EPO-a u normoksičnoj i hipoksičnoj skupini ispitanika, no slaba negativna povezanost dokazana je u skupini zdravih ispitanika.

pozitivna korelacija hepcidina i IL-6 dokazana je u obje skupine bolesnika s COVID-19. U normoksičnih bolesnika dokazana je dobra korelacija hepcidina s koncentracijom ovog upalnog biljega, dok je kod hipoksičnih bolesnika dokazana slaba pozitivna korelacija. Nadalje, u skupini normoksičnih ispitanika hepcidin je dobro korelirao s koncentracijom

CRP-a, dok korelacija u skupini hipoksičnih bolesnika nije dokazana. Kod zdravih ispitanika hepcidin je pokazivao slabu pozitivnu povezanost s koncentracijom CRP-a, no povezanost s koncentracijom IL-6 nije zabilježena (tablica 7).

Tablica 7. Povezanost koncentracije hepcidina s parametrima metabolizma željeza, eritropoetske aktivnosti, hipoksije i upale kod zdravih ispitanika te normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19

parametar	zdravi ispitanici (N = 47)		normoksični bolesnici s COVID-19 (N = 49)		hipoksični bolesnici s COVID-19 (N = 47)	
	r	P	r	P	r	P
hemoglobin (g/L)	0,05	0,742	0,10	0,506	0,19	0,196
željezo (μmol/L)	0,12	0,423	- 0,43	0,002	0,09	0,531
UIBC (μmlo/L)	- 0,44	0,002	0,01	0,941	0,01	0,946
TIBC (μmlo/L)	- 0,40	0,005	- 0,14	0,323	0,12	0,430
TSAT (%)	0,34	0,021	- 0,40	0,005	0,07	0,628
ferritin (ng/mL)	0,59	<0,001	0,57	<0,001	0,39	0,006
sTfR (mg/L)	- 0,07	0,621	- 0,13	0,366	0,00	0,994
RET-He (pg)	- 0,06	0,684	- 0,19	0,198	- 0,10	0,519
RTC (x 10 ⁹ /L)	0,07	0,667	- 0,48	0,001	- 0,21	0,161
IRF (%)	- 0,01	0,956	- 0,10	0,488	- 0,39	0,006
EPO (mIU/mL)	- 0,38	0,009	- 0,13	0,376	- 0,07	0,644
SpO ₂ (%)	/	/	- 0,14	0,339	- 0,12	0,409
CRP (mg/L)	0,32	0,027	0,64	<0,001	0,00	0,986
IL-6 (pg/mL)	0,16	0,298	0,65	<0,001	0,30	0,039

r – koeficijent korelacije; UIBC, nezasićeni kapacitet vezanja željeza; TIBC, ukupni kapacitet vezanja željeza; TSAT, zasićenje transferina; sTfR, topljivi transferinski receptori; RET-He, sadržaj hemoglobina u retikulocitima; RTC, retikulociti; IRF, frakcija nezrelih retikulocita; EPO, eritropoetin; SpO₂, zasićenje hemoglobina kisikom; CRP, C-reaktivni protein; IL-6, interleukin 6

Statistički značajnim razlikama smatrale su se vrijednosti kod kojih je $P < 0,05$.

4.5. Povezanost hepcidina s ishodima bolesti (vrijeme hospitalizacije i potreba za mehaničkom ventilacijom)

Od ukupno 96 ispitanika s COVID-19 uključenih u studiju, 53 bolesnika su hospitalizirana po primitku na hitni infektološki prijem. Svi hipoksični bolesnici su hospitalizirani s medijanom trajanja hospitalizacije 9 (7 – 18) dana. 6 normoksičnih bolesnika je hospitalizirano nakon primitka na hitni infektološki prijem s medijanom trajanja hospitalizacije 4 (3 – 5) dana.

Povezanost koncentracije hepcidina na prijemu s trajanjem hospitalizacije u skupini bolesnika koji su po prijemu hospitalizirani izražena je koeficijentom korelacije r .

Nije dokazana povezanost koncentracije hepcidina na prijemu s trajanjem hospitalizacije u skupini hospitaliziranih bolesnika s COVID-19 ($r = 0,26$, $P = 0,061$).

Povezanost koncentracije hepcidina na prijemu s potrebom za mehaničkom ventilacijom tijekom trajanja COVID-19 bolesti ispitana je logističkom regresijskom analizom. U univarijatnoj logističkoj regresijskoj analizi koncentracija hepcidina korištena je kao nezavisna varijabla, odnosno prediktor ishoda (potreba za primjenom mehaničke ventilacije). Dobivena vrijednost omjera izgleda (OR, engl. *odds ratio*) od 1,03 (95 % interval pouzdanosti (CI, engl. *confidence interval*) 1,01 - 1,05), $P = 0,004$, ukazuje da koncentracija hepcidina izmjerena po primitku na hitni infektološki prijem ima pozitivnu predikcijsku vrijednost u predviđanju potrebe za primjenom mehaničke ventilacije kod daljnjeg tijeka COVID-19 bolesti.

4.6. Predviđanje razvoja kritičnog oblika COVID-19

Sposobnost parametara metabolizma željeza, eritropoeze i sustavne upale u previđanju razvoja kritičnog oblika COVID-19 kao najtežeg oblika bolesti ispitana je korištenjem logističke regresijske analize.

U univarijatnu logističku analizu uključeni su svi parametri metabolizma željeza, eritropoeze i sustavne upale kao i omjeri hepcidina s parametrima metabolizma željeza (feritin/hepcidin, hepcidin/željezo), sustavne upale (hepcidin/CRP, hepcidin/IL-6) te eritropoeze (hepcidin/EPO). S obzirom da nije bilo statistički značajne razlike u dobi i spolu između bolesnika koji su razvili kritični oblik bolesti i ostalih bolesnika s COVID-19 ovi parametri (dob i spol) nisu uključeni u logističku regresijsku analizu.

U univarijatnoj logističkoj regresijskoj analizi hepcidin, UIBC, TIBC, feritin, EPO, CRP, IL-6 te omjeri feritin/hepcidin i hepcidin/željezo identificirani su kao prediktori razvoja kritičnog oblika COVID-19 bolesti. Hecpidin, EPO, CRP i IL-6 te omjeri feritin/hepcidin i hepcidin/željezo imali su $OR > 1$ što ukazuje da povišene vrijednosti ovih parametara ukazuju na povećan izgled za razvoj kritičnog oblika bolesti. UIBC i TIBC imali su $OR < 1$ što ukazuje da povišene vrijednosti ovih parametara ukazuju na smanjen izgled za razvoj kritičnog oblika COVID-19 (tablica 8).

Tablica 8. Univarijatna logistička regresijska analiza parametara metabolizma željeza, eritropoeze i sustavne upale u predviđanju razvoja kritičnog oblika COVID-19

predviđanje razvoja kritičnog oblika COVID-19			
parametar	OR	95% CI	P
hemoglobin (g/L)	1,01	0,97 – 1,05	0,727
hepcidin (ng/mL)	1,03	1,01 – 1,05	0,004
željezo (μmol/L)	0,96	0,83 – 1,11	0,578
UIBC (μmol/L)	0,92	0,86 – 0,99	0,028
TIBC (μmol/L)	0,91	0,85 – 0,98	0,013
TSAT (%)	1,01	0,95 – 1,08	0,688
ferritin (ng/mL)	1,00	1,00 – 1,00	< 0,001
sTfR (mg/L)	0,93	0,16 – 5,50	0,935
RET-He (pg)	1,03	0,80 – 1,33	0,818
RTC (x10 ⁹ /L)	1,01	0,98 – 1,04	0,536
IRF (%)	1,07	0,97 – 1,18	0,157
EPO (mIU/mL)	1,10	1,04 – 1,16	< 0,001
CRP (mg/L)	1,01	1,00 – 1,03	0,005
IL-6 (pg/mL)	1,02	1,01 – 1,03	0,001
ferritin/hepcidin	1,08	1,03 – 1,13	0,001
hepcidin/željezo	1,07	1,00 – 1,15	0,037
hepcidin/CRP	0,80	0,61 – 1,06	0,117

predviđanje razvoja kritičnog oblika COVID-19			
parametar	OR	95% CI	P
hepcidin/IL-6	0,63	0,37 – 1,08	0,094
hepcidin/EPO	0,94	0,83 – 1,07	0,340

OR, omjer izgleda; CI, interval pouzdanosti; UIBC, nezasićeni kapacitet vezanja željeza; TIBC, ukupni kapacitet vezanja željeza; TSAT, zasićenje transferina; sTfR, topljivi transferinski receptori; RET-He, sadržaj hemoglobina u retikulocitima; RTC, retikulociti; IRF, frakcija nezrelih retikulocita; EPO, eritropoetin; CRP, C-reaktivni protein; IL-6, interleukin 6

Statistički značajnim razlikama smatrale su se vrijednosti $P < 0,05$.

U multivarijatnu logističku regresijsku analizu uključeni su parametri metabolizma željeza, eritropoeze i upale koji su se kao pojedinačni parametri pokazali najboljim prediktorima bolesti ili su pokazivali najmanji izgled za razvoj kritičnog oblika bolesti u univarijatnoj logističkoj regresijskoj analizi. Izrađeno je više modela u koje su uključeni TIBC, EPO, hepcidin i omjer feritin/hepcidin, a najboljim se pokazao model koji je uključivao EPO i omjer feritin/hepcidin (tablica 9).

Table 9. Multiparametarski model analiziran logističkom regresijom

predviđanje razvoja kritičnog oblika COVID-19			
parametar	OR	95 % CI	P
EPO	1,10	1,04 – 1,16	< 0,001
feritin/hepcidin	1,08	1,02 – 1,14	0,004

Ova analiza ispravno je klasificirala 88 % od ukupnog broja ispitanika,
uz vrijednost AUC-a od 0,838 (0,749 – 0,905).

OR, omjer izgleda; CI, interval pouzdanosti; AUC, površina ispod krivulje; EPO, eritropoetin
Statistički značajnim razlikama smatrale su se vrijednosti $P < 0,05$.

5. RASPRAVA

Dosadašnja istraživanja pokazala su da je konačna koncentracija hepcidina u perifernoj krvi rezultat doprinosa različitih čimbenika koji reguliraju njegovu ekspresiju. U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivao se utjecaj hipoksije, upale i eritropoeze na koncentraciju hepcidina i drugih parametara metabolizma željeza kod bolesnika s COVID-19 i zdravih osoba. Osim pojedinačnih parametara, u disertaciji su se ispitivali omjeri koji su uključivali hepcidin i molekule koje su povezane s hepcidinom kako bi se istodobno pratio njihov suodnos i međusoban utjecaj, ali i omjeri kojima se povezuju i stavljaju u suodnos različiti upalni parametri kako bi se pokušalo što bolje razlikovati podskupine bolesnika s COVID-19 koje imaju različit obrazac kliničke prezentacije (fenotip) i ishode bolesti.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je koncentracija hepcidina povišena kod bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike. Značajno viša koncentracija hepcidina u plazmi izmjerena je u skupini hipoksičnih bolesnika, definiranoj prema SpO₂ vrijednosti nižoj od 94 %, u odnosu na normoksične bolesnike s COVID-19 (slika 5). Viša koncentracije hepcidina u plazmi kod ove skupine ispitanika vjerojatno je posljedica izraženije sustavne upale koja djeluje stimulirajuće na sintezu hepcidina. U skupini hipoksičnih ispitanika izmjerene su značajno više koncentracije upalnih biljega IL-6 i CRP-a u odnosu na normoksične ispitanike (slike 9 i 10). Stimulirajući učinak upale kod ovih ispitanika vjerojatno je nadvladao inhibirajući učinak hipoksije na sintezu hepcidina. Međutim, istovremena prisutnost ovih suprotnih signala rezultirala je slabom ili odsutnom povezanošću hepcidina s upalnim biljezima u hipoksičnoj skupini bolesnika. Naime, u skupini normoksičnih bolesnika s COVID-19 nađena je dobra pozitivna povezanost koncentracije hepcidina s IL-6 ($r = 0,65$; $P < 0,001$) i CRP-om ($r = 0,64$; $P < 0,001$) kao parametrima sustavne upale. Međutim, u skupini hipoksičnih ispitanika korelacija hepcidina s CRP-om nije nađena ($r = 0,00$; $P = 0,986$), dok je korelacija s IL-6 bila slaba ($r = 0,30$; $P = 0,039$) (tablica 7). Ovi rezultati ukazuju da unatoč izraženoj upali porast koncentracije hepcidina nije bio proporcionalan upali zbog istovremene prisutnosti drugih signala sa suprotnim učinkom, prvenstveno hipoksije, koji utječu na ekspresiju hepcidina i njegovu koncentraciju u perifernoj krvi.

Također, koncentracija hepcidina na prijemu bila je viša u skupini ispitanika koji su imali teški i kritičan tijek bolesti u odnosu na bolesnike s blagim i umjerenim tijekom bolesti (slika 11). Međutim, nije nađena razlika u koncentraciji hepcidina među skupinama bolesnika koji su razvili teški oblik bolesti u odnosu na skupinu koja je razvila kritičan oblik bolesti unatoč statistički značajno višoj koncentraciji IL-6 kod kritičnih bolesnika (slike 11 i 15). Iako IL-6

izravno stimulira ekspresiju hepcidina, niža vrijednost SpO₂ te viša koncentracija EPO-a (slika 14) mogli bi biti razlogom izostanka razlike u koncentraciji hepcidina među ovim skupinama bolesnika s COVID-19.

Kod dijela bolesnika s COVID-19 istovremeno su prisutni upala i hipoksija kao signali sa suprotnim učinkom na ekspresiju hepcidina. Tijekom upale i infekcije upalni citokini, prvenstveno IL-6, stimuliraju ekspresiju hepcidina (64). Ovaj mehanizam urođene imunosti naziva se nutritivskom imunošću i bitan je u uskraćivanju željeza patogenim mikroorganizmima koji također trebaju željezo za preživljavanje, proliferaciju i virulenciju (87, 178). S druge strane, hipoksija djeluje inhibirajuće na ekspresiju hepcidina (71). Tijekom hipoksije, smanjena ekspresija hepcidina povećava dostupnost željeza za eritropoetske potrebe. Ekspresija hepcidina u tim situacijama posljedica je istovremenog djelovanja različitih signala te ne ovisi samo o nadređenosti signala već i o njihovoj relativnoj snazi (179).

Kako bi izrazili i normalizirali koncentraciju hepcidina prema intenzitetu upale kod bolesnika s COVID-19 izračunati su omjeri hepcidin/IL-6 i hepcidin/CRP (tablice 4 i 6). Omjer hepcidin/IL-6 bio je značajno niži u skupini hipoksičnih bolesnika u odnosu na normoksične bolesnike s COVID-19, a jednak rezultat dobiven je i za omjer hepcidin/CRP gdje je koncentracija IL-6 zamijenjena rutinskim upalnim biljekom. Dobivena vrijednost omjera ukazuje na utjecaj drugih, neupalnih čimbenika koji reguliraju koncentraciju hepcidina. Upravo niži rezultat ovog omjera u skupini hipoksičnih ispitanika upućuje na to da porast koncentracije hepcidina u skupini hipoksičnih ispitanika nije bio proporcionalan upali, vjerojatno zbog inhibirajućeg učinka istovremeno prisutne hipoksije na ekspresiju hepcidina. Omjer hepcidin/CRP već je određivan u jednom istraživanju na bolesnicima s COVID-19 (180). S druge strane, omjer hepcidin/IL-6 nije prethodno korišten u literaturi no izračunat je po uzoru na omjer hepcidin/CRP upravo zbog činjenice da je IL-6 glavni upalni citokin koji izravno stimulira ekspresiju hepcidina.

U više studija nađena je povišena koncentracija hepcidina u perifernoj krvi kod bolesnika s COVID-19, uz više koncentracije kod bolesnika s težim oblikom bolesti (161, 162, 172). Međutim, u jednoj studiji kod bolesnika s COVID-19 liječenih u JIL-u nađena je niža koncentracija hepcidina u perifernoj krvi u odnosu na zdrave ispitanike (163). Činjenica da razina hepcidina ovisi o prisutnosti raznih fizioloških i patofizioloških stanja navodi na zaključak da je dizajn studija ključan čimbenik u tumačenju rezultata koncentracije hepcidina u perifernoj krvi bolesnika s COVID-19. Razlike u vremenu uzorkovanja, trajanju bolesti, prisutnim komorbiditetima, dobi i spolu ispitanika te stupnju težine bolesti mogući su izvori heterogenosti rezultata koncentracije hepcidina među pojedinim istraživanjima. U ovoj studiji

skupine bolesnika s COVID-19 kao i kontrolna skupina bile su podudarne po dobi i spolu, što je iznimno bitno jer koncentracije hepcidina i drugih parametara metabolizma željeza ovise o tim čimbenicima. Također, kvaliteti ove studije pridonosi i činjenica da su primijenjeni vrlo strogi kriteriji isključivanja čime se nastojao eliminirati utjecaj tih čimbenika na rezultate studije.

U studiji Naia i sur. nađena je pozitivna povezanost hepcidina s koncentracijom CRP-a i feritina kao upalnih biljega te negativna povezanost s omjerom parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi i frakcije kisika u udahnutom zraku ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) kao biljegom respiracijskog zatajenja (161). Koncentracija hepcidina na prijemu predložena je kao prediktor smrtonosnog ishoda. U ovoj studiji također je nađena povišena koncentracija hepcidina i CRP-a u cirkulaciji bolesnika s hipoksemijom ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ mm Hg) u odnosu na normoksemične ispitanike ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 > 300$ mm Hg). Međutim, hipoksična skupina ispitanika značajno se razlikovala po dobi u odnosu na normoksičnu skupinu ispitanika, a uz to, udio muškaraca bio je značajno viši (161). U istraživanju Chakurkara i sur. koncentracije hepcidina i feritina te CRP-a bile su više kod bolesnika s teškim oblikom COVID-19 u odnosu na ispitanike s blagim i umjerenim oblikom bolesti. U ovoj studiji koncentracija hepcidina i feritina pokazala se korisnom u predviđanju negativnih ishoda bolesti, odnosno koncentracija ovih biljega bila je povezana s bolničkom smrtnošću, potrebom za primjenom mehaničke ventilacije te bubrežne nadomjesne terapije (172). Također, u studiji Zhoua i sur. hepcidin je bio viši kod ispitanika s teškim COVID-19 u usporedbi s bolesnicima koji su imali blagi oblik bolesti te je hepcidin predložen kao biljeg težine bolesti (162). Međutim, u radu nisu navedeni podaci o intenzitetu sustavne upale te stupnju hipoksije, iako su to čimbenici koji značajno utječu na koncentraciju hepcidina.

U studiji Yagcia i sur. koncentracija hepcidina je bila niža kod bolesnika s kritičnim oblikom COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike (163). U istoj studiji kod kritičnih bolesnika te onih bolesnika koji su preminuli izmjerena je i niža koncentracija EPO-a. Nadalje, kritični bolesnici su također imali značajno nižu koncentraciju hemoglobina u odnosu na druge ispitivane skupine. Međutim, nisu navedeni podaci o parametrima upale te stoga nije moguće usporediti u kojoj mjeri su hipoksija i upala mogli doprinijeti ovim rezultatima. Ova studija obuhvatila je skupinu hospitaliziranih bolesnika kod kojih nije točno definirana vremenska točka u kojoj je uzorkovanje provedeno te nije bilo poznato vrijeme trajanja bolesti kod ispitanika i mogući utjecaj primijenjenih terapijskih postupaka. Autori ovog istraživanja objasnili su snižen nalaz koncentracije hepcidina mogućim utjecajem SARS-CoV-2 virusa koji bi zbog strukturne sličnosti mogao oponašati učinak hepcidina. Ova pretpostavka temelji se na rezultatima

istraživanja strukturnih modela u kojima je uočena sličnost između citoplazmatskog dijela proteina šiljka SARS-CoV-2-virusa i molekule hepcidina (91).

U multicentričnoj opažajnoj studiji Maira i sur. koja je obuhvatila hospitalizirane bolesnike s COVID-19 koncentracija hepcidina, EPO-a i upalnih biljega mjerena je na prijemu i 7 dana nakon hospitalizacije (181). Nije nađena razlika u koncentraciji hepcidina i EPO-a među skupinama ispitanika podijeljenih prema težini hipoksije na prijemu ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 150 \text{ mm Hg}$ i $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \geq 150 \text{ mm Hg}$) iako su hipoksični ispitanici imali izraženiju sustavnu upalu. Studija Maira i sur. imala je za cilj ispitati prevalenciju anemije u ispitivanoj skupini bolesnika s COVID-19 te je velik dio ispitanika u ovoj studiji bio anemičan što je sigurno utjecalo na dobivene rezultate (181). Za razliku od navedene studije, prisutnost anemije bila je jedan od glavnih kriterija isključivanja ispitanika iz ovog doktorskog rada. Obzirom na normalnu koncentraciju hemoglobina kod svih ispitanika (tablice 3 i 5) nije nađena povezanost između koncentracija hemoglobina i hepcidina u ispitivanim skupinama. Istovremena prisutnost anemije može utjecati na učinak upale na ekspresiju hepcidina. U prospektivnoj studiji provedenoj na mladim ženama poticanje blage akutne upale primjenom trovalentnog cjepiva protiv gripe te cjepiva protiv difterije, tetanusa i hripavca bilo je praćeno jednakim porastom IL-6 kod ispitanica. Međutim, statistički značajan porast koncentracije hepcidina zabilježen je samo u skupini ispitanica kod kojih prethodno nije bila prisutna anemija, dok je porast hepcidina izostao u skupini ispitanica s anemijom zbog nedostatka željeza. Autori su zaključili da su niska koncentracija željeza te eritropoetski čimbenici nadvladali utjecaj upale na ekspresiju hepcidina (182).

Koncentracija EPO-a kod normoksičnih bolesnika s COVID-19 nije se razlikovala u odnosu na zdrave ispitanike, no koncentracija EPO-a bila je značajno viša kod hipoksičnih bolesnika. Povišena koncentracija EPO-a u ovoj skupini bolesnika s COVID-19 normalan je fiziološki odgovor na prisutnu hipoksiju. Međutim, povezanost koncentracije hepcidina s koncentracijom EPO-a i vrijednosti SaO_2 nije nađena niti u skupini normoksičnih niti u skupini hipoksičnih ispitanika. Izostanak povezanosti u skupini normoksičnih ispitanika može se objasniti činjenicom da je kod ovih ispitanika hipoksija bila odsutna te da su drugi signali imali dominantnu ulogu u regulaciji koncentracije hepcidina. S druge strane, izostanak povezanosti u skupini ispitanika sa hipoksijom vjerojatno je posljedica učinka upale, prvenstveno povišene koncentracije IL-6, čiji signal je bio znatno izraženiji u ovoj skupini ispitanika te je nadvladao učinak hipoksije. Kako bi normalizirali koncentraciju hepcidina na koncentraciju EPO-a, izračunat je omjer hepcidin/EPO. Iako bi zbog učinka EPO-a na koncentraciju hepcidina očekivali niži omjer u skupini hipoksičnih ispitanika, ovaj omjer nije se razlikovao među

skupinama normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19, što nadalje ukazuje na utjecaj upale na koncentraciju hepcidina u ovoj skupini ispitanika. Međutim, niža vrijednost ovog omjera nađena u skupini ispitanika koji su razvili kritičan oblik COVID-19 u odnosu na one koji su imali teški tijek bolesti govori da je u ovoj skupini ispitanika vjerojatno bio izraženiji učinak hipoksije na koncentraciju hepcidina, odnosno SpO_2 je bio niži i EPO viši, u prilog čemu govori i činjenica da nije nađena razlika u koncentraciji hepcidina između ove dvije skupine ispitanika unatoč višoj koncentraciji IL-6 nađenoj kod kritičnih bolesnika. Ovi rezultati ukazuju da je možda i intenzitet hipoksije imao ulogu u tome u kojoj mjeri su ovi čimbenici utjecali na koncentraciju hepcidina u perifernoj cirkulaciji.

Pojedina istraživanja provedena na ljudima pokazala su da hipoksija može nadvladati signal upale te izraženije djelovati na ekspresiju hepcidina (71, 183). Prilikom hipoksije i/ili anemije dolazi do porasta ekspresije EPO-a, hormona koji stimulira eritropoezu (184, 185). Studije na životinjskim modelima pokazale su da je eritropoeza, a ne razina samog EPO-a, potrebna za potiskivanje ekspresije hepcidina (186). Eritroferon je hormon kojeg luče eritroidni prekursori nakon stimulacije eritropoetinom te eritroferon vjerojatno djeluje izravno na ekspresiju hepcidina kako bi se osigurala dostupnost željeza za eritropoezu (187). Kako koncentracija eritroferona nije mjerena u ovom doktorskom radu, ne možemo zaključiti da li je porast koncentracije EPO-a bio praćen odgovarajućim porastom koncentracije eritroferona.

Bolesnici s COVID-19 imali su niži broj retikulocita u odnosu na zdrave ispitanike te nije bilo razlike u broju retikulocita među skupinama normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19. Nađena je slaba negativna povezanost broja retikulocita s koncentracijom hepcidina samo u skupini normoksičnih ispitanika s COVID-19. Budući da i hipoksija i upala utječu na eritropoezu, eritropoetske promjene se moraju razmatrati u kontekstu utjecaja ovih antagonističkih signala. S obzirom na višu koncentraciju EPO-a, za očekivati je bilo da će u skupini hipoksičnih ispitanika broj retikulocita biti viši. Međutim, razlika u broju retikulocita nije nađena. Izostanak porasta broja retikulocita može se objasniti prisutnošću izraženije upale u ovoj skupini bolesnika koja je možda uzrokovala rezistenciju na EPO. Utjecaj upale je vjerojatno razlogom nižeg broja retikulocita u obje skupine bolesnika s COVID-19. Bolesnici s COVID-19 imali su niže vrijednosti IRF-a u odnosu na zdrave ispitanike. Međutim, vrijednost IRF-a bila je značajno viša u hipoksičnih bolesnika u odnosu na normoksične bolesnike, što upućuje na mogući stimulacijski učinak EPO-a na eritropoezu koja je već narušena izraženim utjecajem upale. Naime, IRF se smatra parametrom koji ukazuje na ubrzanje eritropoeze te vrijednost ovog parametra raste nekoliko dana prije porasta broja retikulocita kao kvantitativnog pokazatelja eritropoetske aktivnosti (188). Stoga je u tumačenju rezultata bitna

vremenska dinamika promjene ovih parametra . Zbog činjenice da se u ovoj disertaciji radilo o presječnoj studiji ne može se zaključiti da li bi daljnjim praćenjem broja retikulocita zaista uočili i porast apsolutnog broja retikulocita kao odgovora eritropoeze na povišenu koncentraciju EPO-a.

U ovom doktorskom radu koncentracija željeza i vrijednost TSAT-a bili su značajno niži, dok je koncentracija sTfR-a bila viša kod bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike. Uzrok tome vjerojatno je utjecaj upale na homeostazu željeza. Poticanje ekspresije hepcidina kod upale vodi ka ulasku i zadržavanju željeza u skladišnim odjeljcima te smanjenju koncentracije željeza u izvanstaničnim prostorima s ciljem smanjenja dostupnosti željeza patogenim mikroorganizmima (64, 160). S druge strane, nedostatak željeza inhibira ekspresiju hepcidina (18, 189). Nađena je slaba negativna povezanost koncentracije hepcidina s koncentracijom željeza i vrijednost TSAT-a kod normoksičnih ispitanika, dok je kod hipoksičnih ispitanika korelacija hepcidina s ovim parametrima bila odsutna. Također, omjer hepcidin/željezo bio je viši kod bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike, s najvišim vrijednostima izmjerenim u hipoksičnih bolesnika i bolesnika koji su imali teški i kritičan tijek bolesti. Ovi rezultati su očekivani budući da je u ispitivanim skupinama bila prisutna upala te je stoga kod ovih ispitanika nemoguće procijeniti doprinos statusa željeza na razinu hepcidina. Niska koncentracija željeza zabilježena je kod bolesnika s COVID-19 u raznim studijama, a osobito kod bolesnika s težim oblikom COVID-19, te je predložena kao prediktor za hospitalizaciju i smrtni ishod (168, 170).

Zanimljivo je da nije nađena razlika u koncentraciji željeza, vrijednosti TSAT-a i koncentraciji sTfR-a među skupinama normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19 unatoč značajno višim koncentracijama CRP-a i IL-6 kao parametrima koji ukazuju na prisutnost upale. U skladu s ovim rezultatima su i nalazi istraživanja Naia i sur. kod kojih koncentracija željeza izmjerena na prijemu bolesnika s COVID-19 na bolničko liječenje nije imala značenje u predviđanju tijeka bolesti zbog jednako niskih vrijednosti izmjerenih kod svih ispitanika (161). Također, prilikom tumačenja ovih rezultata treba imati na umu cirkadijalni ritam koncentracije željeza koji bi mogao biti razlogom razlike u rezultatima dobivenim u različitim studijama. U ovom doktorskom radu vrijeme uzorkovanja nije bilo standardizirano jer je uzorkovanje provedeno odmah po primitku bolesnika na Hitni prijem Klinike za infektologiju, no upravo to je i bio cilj studije kako bi se mjerenje ispitivanih parametara provelo iz uzoraka uzetih prije uvođenja terapije kisikom i drugih terapijskih postupaka koji bi mogli utjecati na rezultate.

Koncentracija sTfR-a u sustavnoj cirkulaciji ovisi o količini receptora na stanicama, prvenstveno eritroidnim prekursorima, što ukazuje na dostupnost željeza ili o samom broju

stanica koje nose receptore, što ukazuje na eritropoetsku aktivnost (190). Budući da je broj retikulocita, koji je parametar eritropoetske aktivnosti, bio jednako snižen u obje skupine ispitanika s COVID-19, povišena koncentracija sTfR-a kod normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike vjerojatno je pokazatelj funkcionalnog nedostatka željeza za eritropoetske potrebe. U prilog tome govori i činjenica da je u obje skupine bolesnika s COVID-19 izmjerena niža vrijednost RET-He-a u odnosu na zdrave ispitanike. RET-He predstavlja sadržaj hemoglobina u retikulocitima te stoga ukazuje na nedavnu dostupnost željeza za eritropoezu (191). Ovi rezultati upućuju da je kod normoksičnih bolesnika s nižim stupnjem upale već bila prisutna jednaka promjena u eritropoezi uzrokovana smanjenom dostupnošću željeza kao i kod hipoksičnih ispitanika s izraženijom upalom. U prospektivnoj studiji koja je uključivala mali broj ispitanika izlaganje zdravih dobrovoljaca eksperimentalno induciranoj infekciji *Plasmodium falciparum* uzrokovalo je blagi porast koncentracije IL-6 i hepcidina. Međutim, već mali porast IL-6 i hepcidina u ranoj fazi eksperimentalno inducirane malarije bio je praćen značajnim promjenama u redistribuciji željeza i očitovao se hipoferemijom, porastom koncentracije feritina te naglim padom RET-He-a (192).

Značajno niže vrijednosti TIBC-a i UIBC-a nađene su kod hipoksičnih bolesnika s COVID-19 u odnosu na normoksične bolesnike i zdrave ispitanike. Također, vrijednosti su bile niže u skupini teških i kritičnih bolesnika u odnosu na ispitanike s blagim i umjerenim tijekom bolesti i zdrave ispitanike. U skladu s tim su i rezultati univarijatne logističke regresije koji su pokazali da TIBC i UIBC imaju negativnu predikcijsku vrijednost za predviđanje kritičnog oblika bolesti. TIBC je neizravan pokazatelj koncentracije transferina. Stoga se niske vrijednosti u skupinama bolesnika s najizraženijom sustavnom upalom mogu objasniti inhibicijom sinteze ovog proteina djelovanjem upale. Rezultati ovog istraživanja u skladu su s rezultatima prethodnih studija. U istraživanju na hospitaliziranim bolesnicima s COVID-19 nađene su niže koncentracije transferina i željeza te više koncentracije IL-6, CRP-a i feritina kod bolesnika s teškim oblikom bolesti u odnosu na one s blagom bolešću. Također, transferin se pokazao negativnim prediktorom težine i napretka bolesti (193). U studiji Hippchena i sur. koncentracija transferina bila je niža kod bolesnika s kritičnim oblikom u odnosu na bolesnike s blažim oblikom COVID-19 koji nisu zahtijevali bolničko liječenje (168). U studiji Maira i sur. niža koncentracija TIBC-a nađena je kod bolesnika koji su preminuli u odnosu na preživjele te kod bolesnika koji su zahtijevali intubaciju u odnosu na bolesnike kod kojih nije bilo potrebe za intubacijom (181). U studiji Chakurkara i sur. koncentracija TIBC-a na prijemu bila je niža

kod bolesnika s negativnim ishodom bolesti (smrt, potreba za mehaničkom ventilacijom te potreba za bubrežnom nadomjesnom terapijom) (172).

Povišena koncentracija feritina nađena je kod svih bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike. Koncentracija feritina bila je značajno viša kod hipoksičnih bolesnika s COVID-19 u odnosu na normoksične bolesnike. Također, koncentracija feritina bila je viša na prijemu kod bolesnika koji su razvili teški i kritičan oblik bolesti u odnosu na bolesnike s COVID-19 koji su imali blagi i umjereni tijek bolesti. Povišena koncentracija feritina kod bolesnika s COVID-19 potvrđena je u brojnim studijama (162, 163, 194). Koncentracija feritina smatra se ne samo biljekom bolesti već i prognostičkim parametrom u predviđanju težine bolesti kod COVID-19 (172). Koncentracija feritina u ovom istraživanju pozitivno je korelirala s koncentracijom hepcidina, kao što je već uočeno u prethodim istraživanjima (161, 180). Korelacija koncentracije hepcidina s koncentracijom feritina bila je prisutna i u normoksičnih ($r = 0,57$; $P < 0,001$) i u hipoksičnih bolesnika ($r = 0,39$; $P = 0,006$). Povezanost koncentracije hepcidina i feritina može se objasniti činjenicom da njihova sinteza ne ovisi samo o statusu željeza u organizmu već je također stimulirana upalom (160, 195). Sinteza feritina raste uslijed nakupljanja željeza u unutarstaničnim prostorima pod utjecaje hepcidina. Nadalje, upalni citokini također stimuliraju sintezu feritina (33). Kako bi istražili odnos feritina i hepcidina u različitim skupinama bolesnika s COVID-19, izračunat je omjer feritin/hepcidin. Ovaj omjer bio je značajno viši u skupini hipoksičnih bolesnika s izraženijom upalom u odnosu na normoksične bolesnike. Također, značajno viša vrijednost omjera feritin/hepcidin nađena je u skupini bolesnika s teškim i kritičnim tijekom COVID-19 u odnosu na ispitanike s blagim i umjerenim tijekom bolesti. Promjene u odnosu koncentracije feritina i hepcidinina kod ovih bolesnika vjerojatno su odraz ne samo regulacije ovih proteina statusom željeza već i prisutnosti upale kod bolesnika s COVID-19 (196).

Premda je feritin protein koji služi kao skladišni oblik željeza štiteći stanicu od potencijalnog toksičnog učinka reaktivnog željeza, hiperferitinemija se povezuje s ferroptozom. Ferroptozna je oblik stanične smrti ovisan o željezu i karakteriziran lipidnom peroksidacijom. Ovaj oblik stanične smrti povezuje se s patogenezi brojnih degeneracijskih, ishemijskih te malignih bolesti (197, 198). Neki autori smatraju kako bi ferroptozna mogla biti povezana s razvojem komplikacija i oštećenjem organa kod bolesnika s COVID-19 (166, 199). Feritin bi mogao djelovati protekcijski na stanice na način da veže željezo i da ih štiti od ferroptoze. Međutim, feritin bi također mogao biti i izvor slobodnog željeza oslobođenog u procesu feritinofagije (200). Nije poznato da li je koncentracija feritina samo odraz težine bolesti ili feritin igra aktivnu ulogu u patogenezi COVID-19. Međutim, pored istraživanja koja ukazuju na

prognostičku ulogu feritina u akutnom COVID-19, istraživanje Sonnwebera i sur. pokazalo je da je koncentracija feritina kod bolesnika koji su imali kritičan oblik COVID-19 povišena i nakon dva mjeseca te je koncentracija feritina bila povezana s dugotrajnim patološkim promjenama pluća i smanjenom tolerancijom napora (171).

U ovom je doktorskom radu ispitana predikcijska vrijednost parametara metabolizma željeza, upale i eritropoeze u predviđanju razvoja kritičnog oblika COVID-19 kao najtežeg oblika bolesti. Rezultati univarijatne logističke regresijske analize ukazali su na povišen omjer izgleda ($OR > 1$) za razvoj kritičnog oblika COVID-19 za hepcidin, EPO, CRP, IL-6 te omjere feritin/hepcidin i hepcidin/željezo, što upućuje da porast koncentracije ovih parametara povećava izgled za razvoj kritičnog oblika bolesti. S druge strane, snižen omjer izgleda ($OR < 1$) za razvoj kritičnog oblika COVID-19 nađen je za UIBC i TIBC.

Primjenom multiparametarske logističke regresijske analize dobiven je model koji je uključivao kombinaciju EPO-a i omjer feritin/hepcidin kao parametre koji su se u univarijantnoj regresijskoj analizi pokazali kao najbolji prediktori bolesti. Dobiveni model imao je vrijednost AUC-a 0,838 (0,749 – 0,906) s 88 % ispravno klasificiranih slučajeva. Primjena ovog modela na prijemu bolesnika mogla bi biti važna za predviđanje tijeka bolesti, odnosno za predviđanje razvoja kritičnog oblika COVID-19.

Promjene hematoloških parametara kod COVID-19 također imaju dijagnostičku i prognostičku vrijednost (120). U ovom istraživanju nađen je niži ukupan broj leukocita kod normoksičnih bolesnika s COVID-19 u odnosu na hipoksične bolesnike i zdrave ispitanike te je niži ukupan broj leukocita nađen kod bolesnika s blagim i umjerenim tijekom bolesti u odnosu na bolesnike koji su razvili teški i kritičan oblik COVID-19 i zdrave ispitanike. Uzrok ove razlike u apsolutnom boju leukocita među skupinama bolesnika s COVID-19 je prisutnost neutrofilije i izraženije limfopenije kod bolesnika s težim oblikom bolesti. Kao i u drugim studijama, broj eozinofila je bio niži te gotovo nemjerljiv kod bolesnika s COVID-19. Apsolutni broj monocita također je bio niži kod bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike.

Povišen broj neutrofilnih granulocita smatra se pokazateljem težine bolesti, teških respiracijskih simptoma te lošeg ishoda kod COVID-19 (115, 201). Snižen broj limfocita nađen je kod bolesnika s COVID-19 u brojnim studijama te se apsolutni broj limfocita smatra prediktorom težine bolesti (118, 119, 202). Snižen broj eozinofila prisutan je kod većine bolesnika s COVID-19 te dolazi do porasta broja eozinofila prema normalnim vrijednostima s oporavkom od bolesti (122). Iako većina studija navodi normalan ili povišen broj monocita kod bolesnika s COVID-19, u pojedinim studijama nađen je snižen broj monocita u perifernoj cirkulaciji koji je bio niži kod onih bolesnika s COVID-19 koji su preminuli (203).

Osim omjera s hepcidinom koji su, uz sam hepcidin, u središtu ovog doktorskog rada, a pripomažu u boljem istodobnom povezivanju i sagledavanju parametara koji su u međusobnom odnosu (parametri metabolizma željeza, eritropoetske aktivnosti i upale), u disertaciji su ispitani i različiti upalni omjeri koji se sve više koriste ne samo u znanstvenim istraživanjima već i u kliničke svrhe u smislu boljeg prepoznavanja težine bolesti i neželjenih ishoda bolesti, osobito kod infekcijskih i/ili upalnih bolesti.

U ovom se radu MLR nije razlikovao među hipoksičnim i normoksičnim bolesnicima s COVID-19, ali je u tim skupinama bio viši u odnosu na zdrave ispitanike. S druge strane, NMR i CRP/IL-6 su kod hipoksičnih bolesnika bili viši i u odnosu na normoksične bolesnike i u odnosu na zdrave osobe, ali nije bilo statistički značajne razlike između zdravih i normoksičnih skupina. Kod svih ostali upalnih omjera vrijednosti su bile značajno više kod hipoksičnih bolesnika u odnosu na normoksične i zdrave, ali su i vrijednosti kod normoksičnih bolesnika bile značajno više u odnosu na zdrave ispitanike. S druge strane, kada su bolesnici prospektivnim praćenjem podijeljeni u skupine prema težini bolesti (prema smjernicama SZO-a), vrijednosti za MLR i CRP/IL-6 su bile najviše u skupini bolesnika s teškim oblikom COVID-19, dok su vrijednosti za NLR, NMR, CRP/neutrofilni granulociti, CRP/limfociti i CRP/monociti bile najviše i međusobno slične kod teških i kod kritičnih bolesnika s COVID-19. Samo su kod omjera IL-6 s leukocitnim podskupinama (IL-6/neutrofilni granulociti, IL-6/ limfociti i IL-6/monociti) vrijednosti bile statistički značajno više kod bolesnika s kritičnim oblikom COVID-19 u odnosu na ostale skupine bolesnika.

Omjer koji već pomalo postaje „zlatni standard“ pri kliničkoj procjeni bolesnika u brojnim različitim stanjima i bolestima je NLR. Slično kao i u ovom doktorskog radu, drugi su autori pokazali da je NLR viši u bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike (204) te da pokazuje povezanost s težinom bolesti i da su njegove vrijednosti više kod bolesnika s težim oblikom COVID-19 (205 – 207). NLR se pokazao i kao dobar prediktor smrtnog ishoda bolesti (207–211) te potrebe za mehaničkom ventilacijom (211). Obzirom da je od ukupno 96 bolesnika s COVID-19 koji su uključeni u ovo istraživanje samo njih 6 umrlo, zbog malog broja umrlih (što je zasigurno posljedica pažljivog probiranja ispitanika zbog vrlo strogih kriterija isključivanja) nije se mogla ispitati povezanost pojedinačnih parametara i omjera sa smrtnošću, ali je, osim za hepcidin, što je prikazano u poglavlju Rezultati, istražena i povezanost upalnih omjera s vremenom hospitalizacije i s potrebom za mehaničkom ventilacijom. Obzirom da su svi bolesnici koji su razvili kritičan oblik COVID-19 imali potrebu za mehaničkom ventilacijom, ta dva ishoda se u ovom doktorskog radu preklapaju. Što se tiče NLR-a, opaženo je, slično kao kod istraživanja Ullaha i sur. (211), da je ovaj omjer dobar prediktor potrebe za

mehaničkom ventilacijom, ali istovremeno i prediktor rizika za razvoj kritičnog oblika bolesti (OR 1,15; 95 % CI 1,06 – 1,26; P = 0,002).

U odnosu na NLR, omjeri NMR i MLR ili njegova inačica omjer limfocita i monocita (LMR, engl. *lymphocyte to monocyte ratio*) do sada su manje korišteni pri obradi bolesnika s COVID-19. Pokazalo se da je NMR viši u bolesnika koji su zaprimljeni u JIL nego u onih koji su hospitalizirani tj. zaprimljeni na nekom drugom bolničkom odjelu (212). Slično kao NLR, u ovoj se disertaciji i NMR pokazao kao prediktor potrebe za mehaničkom ventilacijom, a ujedno i prediktor rizika za razvoj kritičnog oblika bolesti (OR 1,08; 95 % CI 1,02 – 1,13; P = 0,006). MLR je, kao i u ovom doktorskom radu, bio viši u bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike (213), odnosno LMR je bio viši u zdravih u odnosu na one inficirane SARS-CoV-2 virusom (204). Uz to, vrijednosti za MLR, također kao i u ovom doktorskom radu, bile su više u bolesnika s teškim u odnosu na bolesnike s blagim i umjerenim oblikom COVID-19 (206). Osim povezanosti s težinom bolesti, pokazalo se da je LMR dobar prediktor smrtnog ishoda bolesti (207).

Iako je CRP/IL-6 korišten kod različitih bolesti, samo je jedan znanstveni članak objavljen s ovim omjerom kod bolesnika s COVID-19. U tom istraživanju su bolesnici podijeljeni u četiri skupine prema težini bolesti koristeći pritom modificiran način bodovanja ranih upozoravajućih simptoma (MEWS, engl. *modified early warning score*), poput respiracijske stope (udisaji u minuti), srčane stope (otkucaji u minuti), sistoličkog krvnog tlaka, volumena mokraćne izlučenog po satu po kilogramu tjelesne mase, tjelesne temperature i neuroloških simptoma. Pokazalo se da bolesnici u posljednjoj (četvrtoj) skupini imaju najnižu vrijednost ovog omjera (214).

Omjeri CRP-a i IL-6 s limfocitima često se koriste. S druge strane, samo je po jedan znanstveni članak objavljen s omjerima CRP/neutrofilni granulociti i CRP/monociti, dok omjeri IL-6/neutrofilni granulociti i IL-6/monociti nisu do sada primijenjeni kod bolesnika s COVID-19.

Kao i u ovom doktorskom radu, vrijednost za CRP/neutrofilni granulociti je bila povišena u bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike (213). Omjer CRP/monociti je uspoređen između bolesnika koji su imali B.1.1.7 SARS-CoV-2 varijantu i ostalih bolesnika koji su bili inficirani SARS-CoV-2 virusom te je bila niža kod onih s B.1.1.7 varijantom (215). U ovoj disertaciji omjeri CRP/monociti (OR 1,00; 95 % CI 1,00 – 1,01; P = 0,003) i CRP/limfociti (OR 1,01; 95 % CI 1,00 – 1,01; P = 0,007) pokazali su se kao pozitivni prediktori, iako slabi, za razvoj kritičnog oblika COVID-19 i potrebe za mehaničkom ventilacijom.

U nekim su istraživanjima primijenjeni omjeri CRP/limfociti i IL-6 limfociti, a u nekima njihove inačice limfociti/CRP i limfociti/IL-6. Kao i u ovom doktorskom radu, vrijednost za CRP/limfociti je bila viša u bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike (204,213), a bila je viša i u bolesnika koji su zaprimljeni u JIL nego u onih koji su hospitalizirani tj. zaprimljeni na nekom drugom bolničkom odjelu (216). Pokazalo se da je limfociti/CRP povezan s težinom bolesti (217, 218), što potvrđuju i naši rezultati (za CRP/limfociti), te da je CRP/limfociti neovisan prognostički čimbenik u identificiranju bolesnika s kritičnim oblikom COVID-19 (204). Uz to, utvrđeno je da su omjeri CRP/limfociti ili limfociti/CRP povezani sa smrtnošću (209, 211, 218, 219). S druge strane, vrijednosti za IL-6/limfociti bile su više u skupini bolesnika inficiranih SARS-CoV-2 virusom koji su razvili pneumoniju i kod kojih je prisutno pogoršanje kliničkih simptoma u odnosu na one kod kojih nije došlo do pogoršanja (220). te u skupini bolesnika inficiranih SARS-CoV-2 virusom koji su razvili pneumoniju i koji su umrli tijekom boravka u bolnici i/ili su zahtijevali orotrahealnu intubaciju u odnosu na one koji su preživjeli i/ili nisu zahtijevali orotrahealnu intubaciju (221). Pokazalo se da je limfociti/IL-6 povezan s težinom bolesti (218), što potvrđuju i naši rezultati (za IL-6/limfociti), te da su omjeri IL-6/limfociti ili limfociti/IL-6 povezani sa smrtnošću (218, 220 – 222).

U ovom doktorskom radu omjeri IL-6/limfociti ($r = 0,40$; $P = 0,003$) i IL-6/monociti ($r = 0,36$; $P = 0,008$) pokazali su slabu povezanost s trajanjem hospitalizacije, dok su se svi omjeri IL-6 sa stanicama leukocitne loze pokazali kao pozitivni prediktori potrebe za mehaničkom ventilacijom i za razvoj kritičnog oblika bolesti (OR 1,08; 95 % CI 1,02 – 1,14; $P = 0,005$ za IL-6/neutrofilni granulociti, OR 1,01; 95 % CI 1,00 – 1,02; $P = 0,004$ za IL-6/limfociti, OR 1,00; 95 % CI 1,00 – 1,01; $P = 0,006$ za IL-6/monociti).

Razumijevanje regulacije metabolizma željeza kod bolesnika s COVID-19 iznimno je važno. Iako nije u potpunosti jasno da li su promjene u metabolizmu željeza zabilježene kod bolesnika s COVID-19 samo posljedica patoloških zbivanja ili imaju aktivnu ulogu u patogenezi bolesti, istraživanja povezuju ove promjene s lošijom prognozom bolesti (129). Promjene u metabolizmu željeza koje se javljaju uslijed upalnih zbivanja uzrokuju redistribuciju željeza u stanične odjeljke i razvoj funkcionalnog nedostatka željeza, što u konačnici vodi ka razvoju anemije upale (223). U studiji Bellman-Weilera i sur. funkcionalni deficit željeza zabilježen je kod 80 % ispitanika s COVID-19 te je bio povezan s trajanjem hospitalizacije. Gotovo četvrtina bolesnika bila je anemična već na prijemu, glavnom s prisutnom anemijom upale, te se prisutnost anemije pokazala prediktorom smrtnog ishoda (224). Anemija remeti opskrbu tkiva kisikom kod bolesnika s već oslabjelom plućnom funkcijom, što predstavlja dodatni teret

bolesti. Nadalje, prisutnost željeza također je nužna za normalno funkcioniranje imunskog sustava. Iako je ulazak i zadržavanje željeza u skladišnim odjeljcima važan mehanizam urođene imunosti, promjene u metabolizmu željeza mogu se odraziti na učinkovitost reakcije imunskog sustava. Primjerice, nedostatak željeza može biti uzrokom neodgovarajućeg adaptacijskog imunskog odgovora jer je željezo nužno za normalnu funkciju i proliferaciju limfocita. Uz to, kod bolesnika sa sniženom koncentracijom željeza zabilježen je slabiji odgovor na cjepiva (176).

Poznato je da status željeza utječe na tijek virusnih bolesti. Iako virusima željezo nije nužno za preživljavanje, prisutnost željeza u stanicama domaćina neophodna je za virusnu replikaciju. Različiti virusi razvili su mehanizme kojima osiguravaju dostupnost željeza u stanicama domaćina za vlastite potrebe i ti mehanizmi specifični su za pojedine patogene mikroorganizme. Povećana dostupnost željeza povezuje se s povećanom proliferacijom virusnih čestica te lošijim ishodom bolesti kod bolesnika s određenim virusnim bolestima (88, 89).

Ove činjenice upućuju na to da je kod infektivnih bolesti homeostaza željeza jako bitna. Željezo je nužno za normalno funkcioniranje i patogenim mikroorganizmima i domaćinu te konačan ishod reakcije imunskog sustava može ovisiti o dostupnosti željeza. Također, promjene u metabolizmu željeza mogu doprinijeti oštećenju tkiva i organa (172).

Stoga su istraživanja čimbenika koji reguliraju razinu hepcidina kod infektivnih bolesti važna upravo radi boljeg razumijevanja metabolizma željeza te potencijalnog razvoja terapijskih intervencija u budućnosti.

Završna razmatranja

Ovaj doktorski rad predstavlja prvo istraživanje u kojem su istodobno proučeni učinci upale i hipoksije u bolesnika s COVID-19 koji nisu imali anemiju te su odabrani na temelju vrlo strogih kriterija isključivanja kako bi se otklonili komorbiditeti i stanja koja bi mogla utjecati na koncentraciju hepcidina i drugih parametara metabolizma željeza. Također, omjeri hepcidin/željezo i hepcidin/EPO do sada su se koristili kod istraživanja nekih drugih bolesti, ali su ovdje prvi put primijenjeni kod bolesnika s COVID-19. Uveden je i u potpunosti novi omjer hepcidin/IL-6 kako bi se mogla istodobno pratiti koncentracija hepcidina normalizirana na razinu upale te je uspoređen s omjerom hepcidin/CRP koji je već korišten u nekoliko istraživanja. Uz to, po prvi put su kod bolesnika s COVID-19 korišteni upalni omjeri IL-6/neutrofilni granulociti i IL-6/monociti, a korišteni su i brojni drugi upalni omjeri koji su u

pojedininim istraživanjima već ispitani na bolesnicima s COVID-19. Primjena omjera dobiva sve veće značenje i u dijagnostici i u pravodobnom prepoznavanju težine bolesti i njenih ishoda. Istraživanje je pokazalo da hipoksični signal u odabranoj skupini ispitanika nije dovoljno snažan da nadvlada stimulirajući učinak upale na ekspresiju hepcidina. Rezultati ovog doktorskog rada pridonose boljem poznavanju kompleksnih odnosa između hepcidina i drugih parametara metabolizma željeza te hipoksije, upale i eritropoeze, no izazov je za budućnost primijeniti dobivene rezultate za potencijalne nove dijagnostičke, prognostičke i/ili terapijske svrhe ne samo kod infekcije SARS-CoV-2 virusom već i u različitim drugim infektivnim i upalnim stanjima i bolestima. Određivanjem hepcidina i primjenom omjera s hepcidinom i upalnih omjera u kliničkoj praksi mogli bi se utvrditi određeni funkcionalni ili patobiološki mehanizmi bolesti, tzv. endotipovi, a time bi se mogli na vrijeme primijeniti specifični individualizirani terapijski pristupi koji bi spriječili ili makar umanjili neželjene ishode bolesti.

6. ZAKLJUČCI

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na sljedeće:

- Koncentracija hepcidina u plazmi povišena je kod bolesnika s COVID-19 u odnosu na zdrave ispitanike. Povezanost koncentracije hepcidina i IL-6 kao glavnog upalnog čimbenika koji regulira sintezu hepcidina prisutna je samo kod bolesnika s COVID-19 kod kojih je odsutna hipoksija. Kod bolesnika kod kojih je uz sustavnu upalu prisutna i hipoksija, koncentracija hepcidina u plazmi nije povezana s koncentracijom IL-6.
- Ovim istraživanjem nije dokazana povezanost koncentracije hepcidina sa SpO₂ kao pokazateljem hipoksije što ukazuje da je upalni signal imao veći utjecaj na koncentraciju hepcidina u odnosu na negativni signal hipoksije. Viša koncentracija hepcidina u skupini hipoksičnih ispitanika u odnosu na normoksične ispitanike potkrepljuje ovaj zaključak.
- Vrijednosti omjera hepcidin/IL-6 i hepcidin/CRP bile su značajno niže u skupini hipoksičnih bolesnika u odnosu na normoksične bolesnike s COVID-19. Niži rezultati ovih omjera u skupini hipoksičnih ispitanika upućuju na to da porast koncentracije hepcidina u skupini hipoksičnih ispitanika nije bio proporcionalan upali, vjerojatno zbog inhibirajućeg učinka istovremeno prisutne hipoksije na ekspresiju hepcidina.
- Koncentracija EPO nije se razlikovala kod normoksičnih bolesnika s COVID-19 i zdravih ispitanika no bila je značajno viša kod bolesnika s COVID-19 kod kojih je bila prisutna hipoksija, što ukazuje na normalan fiziološki odgovor uslijed prisutnosti hipoksije.
- U svim skupinama ispitanika dokazana je povezanost koncentracije hepcidina s koncentracijom feritina, što je posljedica regulacije ovih parametara istim mehanizmima, odnosno upalom i statusom željeza.
- Ispitanici s COVID-19 imali su niže koncentracije željeza, UIBC-a, TIBC-a, RET-He-a i manju vrijednost TSAT-a te višu koncentraciju sTfR-a u odnosu na zdrave ispitanike. Koncentracije željeza i RET-He-a te vrijednost TSAT-a nisu se razlikovala među

skupinama bolesnika s COVID-19 unatoč različitom intenzitetu upale i težini bolesti, što ukazuje da već blaga upala uzrokuje promjene u homeostazi željeza.

- U svim skupinama bolesnika s COVID-19 nađen je snižen apsolutni broj retikulocita u odnosu na zdrave ispitanike, što ukazuje na potiskivanje eritropoeze uslijed upalnog procesa. Broj retikulocita nije se razlikovao među skupinama COVID-19 ispitanika unatoč različitom intenzitetu upale. Razlog bi mogla biti istovremena prisutnost upale i hipoksije kao čimbenika sa suprotnim učinkom na eritropoezu.
- Kod bolesnika s COVID-19 nađen je povišen apsolutni broj neutrofilnih granulocita te niži apsolutni broj limfocita, monocita i eozinofila u odnosu na zdrave ispitanike što ukazuje na imunosna zbivanja kod ove skupine bolesnika.
- Vrijednosti omjera CRP-a s leukocitnim podskupinama (CRP/neutrofilni granulociti, CRP/limfociti, CRP/monociti), NLR i NMR bile su najviše i međusobno slične kod bolesnika koji su imali teški i kritični tijek bolesti. Omjeri IL-6 s leukocitnim podskupinama (IL-6/neutrofilni granulociti, IL-6/limfociti, IL-6/monociti) bili su statistički značajno viši u skupini ispitanika koja je imala kritični tijek bolesti u odnosu na ostale skupne bolesnika što upućuje da bi ovi omjeri mogli biti korisni u predviđanju tijeka i težine bolesti.

7. LITERATURA

1. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001;276:7806–10.
2. Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 2000;480:147–50.
3. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001;276:7811–9.
4. Kwapisz J, Slomka A, Zekanowska E. Heparin and its role in iron homeostasis. *EJIFCC*. 2009;20:124–8.
5. Valore EV, Ganz T. Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cell Mol Dis* 2008;40:132–8.
6. Addo L, Ikuta K, Tanaka H, Toki Y, Hatayama M, Yamamoto M, et al. The three isoforms of hepcidin in human serum and their processing determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-tandem MS). *Int J Hematol* 2016;103:34–43.
7. Jordan JB, Poppe L, Haniu M, Arvedson T, Syed R, Li V, et al. Heparin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure. *J Biol Chem*. 2009;284:24155–67.
8. Peslova G, Petrak J, Kuzelova K, Hrdy I, Halada P, Kuchel PW, et al. Heparin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to α -2-macroglobulin in blood. *Blood* 2009;113:6225–36.
9. Itkonen O, Stenman UH, Parkkinen J, Soliymani R, Baumann M, Hämäläinen E. Binding of hepcidin to plasma proteins. *Clin Chem* 2012;58:1158–60.
10. Nemeth E, Ganz T. The Role of Heparin in Iron Metabolism. *Acta Haematol* 2009;122:78–86.
11. Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood* 2008;112:4292–7.
12. Troutt JS, Butterfield AM, Konrad RJ. Heparin-25 concentrations are markedly increased in patients with chronic kidney disease and are inversely correlated with estimated glomerular filtration rates. *J Clin Lab Anal*. 2013;27:504–10.
13. Preza GC, Pinon R, Ganz T, Nemeth E. Cellular catabolism of the iron-regulatory peptide hormone hepcidin. *PLOS ONE*. 2013;8:e58934.
14. Nemeth E, Ganz T. Heparin-ferroportin interaction controls systemic iron homeostasis. *Int J Mol Sci* 2021;22:6493.

15. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306:2090–3.
16. De Domenico I, Lo E, Ward DM, Kaplan J. Heparin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:3800–5.
17. De Domenico I, Ward DM, Langelier C, Vaughn MB, Nemeth E, Sundquist WI, et al. The molecular mechanism of heparin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell* 2007;18:2569–78.
18. Zhang AS, Enns CA. Molecular mechanisms of normal iron homeostasis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009;2009:207–14.
19. Kemna EHJM, Kartikasari AER, van Tits LJH, Pickkers P, Tjalsma H, Swinkels DW. Regulation of heparin: Insights from biochemical analyses on human serum samples. *Blood Cells Mol Dis* 2008;40:339–46.
20. Meynard D, Babitt JL, Lin HY. The liver: conductor of systemic iron balance. *Blood*. 2014;123:168–76.
21. Kroot JJ, Tjalsma H, Fleming RE, Swinkels DW. Heparin in Human Iron Disorders: Diagnostic Implications. *Clin Chem* 2011;57:1650–69.
22. Correnti M, Gammella E, Cairo G, Recalcati S. Iron absorption: molecular and pathophysiological aspects. *Metabolites* 2024;14:228.
23. Baker HM, Anderson BF, Baker EN. Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3579–83.
24. Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:188–202.
25. Brissot P, Ropert M, Le Lan C, Loréal O. Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:403–10.
26. Sargent PJ, Farnaud S, Evans RW. Structure/function overview of proteins involved in iron storage and transport. *Curr Med Chem* 2005;12:2683–93.
27. Aisen P. Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:2137–43.
28. Dassler K, Zydek M, Wandzik K, Kaup M, Fuchs H. Release of the soluble transferrin receptor is directly regulated by binding of its ligand ferritransferrin. *J Biol Chem* 2006;281:3297–304.
29. Goswami T, Andrews NC. Hereditary hemochromatosis protein, hfe, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J Biol Chem* 2006;281:28494–8.

30. Gao J, Chen J, Kramer M, Tsukamoto H, Zhang AS, Enns CA. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab* 2009;9:217–27.
31. Rapisarda C, Puppi J, Hughes RD, Dhawan A, Farnaud S, Evans RW, et al. Transferrin receptor 2 is crucial for iron sensing in human hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299:G778–83.
32. Camaschella C, Nai A, Silvestri L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. *Haematologica*. 2020;105:260–72.
33. Kernan KF, Carcillo JA. Hyperferritinemia and inflammation. *Int Immunol* 2017;29:401–9.
34. Chasteen ND, Harrison PM. Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *J Struct Biol* 1999;126:182–94.
35. Kidane TZ, Sauble E, Linder MC. Release of iron from ferritin requires lysosomal activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291:C445–55.
36. Watt RK, Hilton RJ, Graff DM. Oxido-reduction is not the only mechanism allowing ions to traverse the ferritin protein shell. *Biochim Biophys Acta* 2010;1800:745–59.
37. Fuhrmann DC, Mondorf A, Beifuß J, Jung M, Brüne B. Hypoxia inhibits ferritinophagy, increases mitochondrial ferritin, and protects from ferroptosis. *Redox Biol*. 2020;36:101670.
38. Zhang DL, Ghosh MC, Rouault TA. The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis - an update. *Front Pharmacol*. 2014;5:124.
39. Thompson KJ, Fried MG, Ye Z, Boyer P, Connor JR. Regulation, mechanisms and proposed function of ferritin translocation to cell nuclei. *J Cell Sci* 2002;115:2165–77.
40. Levi S, Corsi B, Bosisio M, Invernizzi R, Volz A, Sanford D, et al. A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J Biol Chem* 2001;276:24437–40.
41. Ganz T. Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev*. 2013;93:1721–41.
42. Rosário C, Zandman-Goddard G, Meyron-Holtz EG, D’Cruz DP, Shoenfeld Y. The Hyperferritinemic Syndrome: macrophage activation syndrome, Still’s disease, septic shock and catastrophic antiphospholipid syndrome. *BMC Med*. 2013;11:185.
43. Xu Y, Alfaro-Magallanes VM, Babitt JL. Physiological and pathophysiological mechanisms of hepcidin regulation: clinical implications for iron disorders. *Br J Haematol* 2021;193:882–93.
44. Casanovas G, Mleczo-Sanecka K, Altamura S, Hentze MW, Muckenthaler MU. Bone morphogenetic protein (BMP)-responsive elements located in the proximal and distal hepcidin promoter are critical for its response to HJV/BMP/SMAD. *J Mol Med*. 2009;87:471–80.
45. Core AB, Canali S, Babitt JL. Hemojuvelin and bone morphogenetic protein (BMP) signaling in iron homeostasis. *Front Pharmacol*. 2014;5:104.

46. Wu Q, Sun CC, Lin HY, Babitt JL. Repulsive guidance molecule (RGM) family proteins exhibit differential binding kinetics for bone morphogenetic proteins (BMPs). Skoulakis EMC, editor. PLoS ONE. 2012;7:e46307.
47. Gkouvatzos K, Wagner J, Papanikolaou G, Sebastiani G, Pantopoulos K. Conditional disruption of mouse HFE2 gene: maintenance of systemic iron homeostasis requires hepatic but not skeletal muscle hemojuvelin. Hepatology. 2011;54:1800–7.
48. Babitt JL, Huang FW, Xia Y, Sidis Y, Andrews NC, Lin HY. Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. J Clin Invest 2007;117:1933–9.
49. Lin L, Goldberg YP, Ganz T. Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. Blood. 2005;106:2884–9.
50. Silvestri L, Pagani A, Camaschella C. Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. Blood. 2008;111:924–31.
51. Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. Cell Metab 2008;8:502–11.
52. Lin L, Nemeth E, Goodnough JB, Thapa DR, Gabayan V, Ganz T. Soluble hemojuvelin is released by proprotein convertase-mediated cleavage at a conserved polybasic RNRR site. Blood Cells Mol Dis 2008;40:122–31.
53. Enns CA, Ahmed R, Zhang AS. Neogenin Interacts with matriptase-2 to facilitate hemojuvelin cleavage. J Biol Chem 2012;287:35104–17.
54. Zhang AS, West AP, Wyman AE, Bjorkman PJ, Enns CA. Interaction of hemojuvelin with neogenin results in iron accumulation in human embryonic kidney 293 cells. J Biol Chem 2005;280:33885–94.
55. Maxson JE, Chen J, Enns CA, Zhang AS. Matriptase-2- and proprotein convertase-cleaved forms of hemojuvelin have different roles in the down-regulation of hepcidin expression. J Biol Chem 2010;285:39021–8.
56. Corradini E, Meynard D, Wu Q, Chen S, Ventura P, Pietrangelo A, et al. Serum and liver iron differently regulate the bone morphogenetic protein 6 (BMP6)-SMAD signaling pathway in mice. Hepatology. 2011;54:273–84.
57. Ramos E, Kautz L, Rodriguez R, Hansen M, Gabayan V, Ginzburg Y, et al. Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading. Hepatology. 2011;53:1333–41.
58. D'Alessio F, Hentze MW, Muckenthaler MU. The hemochromatosis proteins HFE, Tfr2, and HJV form a membrane-associated protein complex for hepcidin regulation. J Hepatol 2012;57:1052–60.

59. Wang CY, Babitt JL. Heparin Regulation in the Anemia of Inflammation. *Curr Opin Hematol* 2016;23:189–97.
60. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 2003;101:2461–3.
61. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;6:a016295–a016295.
62. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol* 2010;22:347–52.
63. Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces heparin expression through STAT3. *Blood* 2006;108:3204–9.
64. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone heparin. *J Clin Invest* 2004;113:1271–6.
65. Kemna E, Pickkers P, Nemeth E, van der Hoeven H, Swinkels D. Time-course analysis of heparin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood* 2005;106:1864–6.
66. Ong ST, Shan Ho JZ, Ho B, Ding JL. Iron-withholding strategy in innate immunity. *Immunobiology*. 2006;211:295–314.
67. Theurl I, Schroll A, Nairz M, Seifert M, Theurl M, Sonnweber T, et al. Pathways for the regulation of heparin expression in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia in vivo. *Haematologica* 2011;96:1761–9.
68. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH, et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest* 2007;117:1926–32.
69. Haase VH. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;299:F1–13.
70. Talbot NP, Lakhal S, Smith TG, Privat C, Nickol AH, Rivera-Ch M, et al. Regulation of heparin expression at high altitude. *Blood* 2012;119:857–60.
71. Piperno A, Galimberti S, Mariani R, Pelucchi S, Ravasi G, Lombardi C, et al. Modulation of heparin production during hypoxia-induced erythropoiesis in humans in vivo: data from the HIGHCARE project. *Blood* 2011;117:2953–9.
72. Lakhal S, Schödel J, Townsend ARM, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. Regulation of Type II Transmembrane Serine Proteinase TMPRSS6 by Hypoxia-inducible Factors. *J Biol Chem* 2011;286:4090–7.

73. Sonnweber T, Nachbaur D, Schroll A, Nairz M, Seifert M, Demetz E, et al. Hypoxia induced downregulation of hepcidin is mediated by platelet derived growth factor BB. *Gut* 2014;63:1951–9.
74. Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production. *J Physiol* 2011;589:1251–8.
75. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 1995;83:59–67.
76. Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol* 2007;78:183–205.
77. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002;110:1037–44.
78. Vokurka M, Krijt J, Šulc K, Nečas E. Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res* 2006;667–74.
79. Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood* 2006;108:3730–5.
80. Kattamis A, Papassotiriou I, Palaiologou D, Apostolakou F, Galani A, Ladis V, et al. The effects of erythropoietic activity and iron burden on hepcidin expression in patients with thalassemia major. *Haematologica*. 2006 ;91:809–12.
81. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh SH, Staker P, Lee YT, et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med* 2007;13:1096–101.
82. Tanno T, Porayette P, Sripichai O, Noh SJ, Byrnes C, Bhupatiraju A, et al. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood* 2009;114:181–6.
83. Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* 2014;46:678–84.
84. Kautz L, Jung G, Du X, Gabayan V, Chapman J, Nasoff M, et al. Erythroferrone contributes to hepcidin suppression and iron overload in a mouse model of β -thalassemia. *Blood* 2015;126:2031–7.
85. Ganz T, Jung G, Naeim A, Ginzburg Y, Pakbaz Z, Walter PB, et al. Immunoassay for human serum erythroferrone. *Blood* 2017;130:1243–6.
86. Casanovas G, Spasic MV, Casu C, Rivella S, Strelau J, Unsicker K, et al. The murine growth differentiation factor 15 is not essential for systemic iron homeostasis in phlebotomized mice. *Haematologica* 2013;98:444–7.

87. Hennigar SR, McClung JP. Nutritional Immunity: Starving pathogens of trace minerals. *Am J Lifestyle Med* 2016;10:170–3.
88. Drakesmith H, Prentice A. Viral infection and iron metabolism. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:541–52.
89. Schmidt SM. The role of iron in viral infections. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2020;25:893–911.
90. Armitage AE, Stacey AR, Giannoulatou E, Marshall E, Sturges P, Chatha K, et al. Distinct patterns of hepcidin and iron regulation during HIV-1, HBV, and HCV infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:12187–92.
91. Ehsani S. COVID-19 and iron dysregulation: distant sequence similarity between hepcidin and the novel coronavirus spike glycoprotein. *Biol Direct* 2020;15:19.
92. Sokolov A, Isakova-Sivak I, Grudinina N, Mezhenskaya D, Litasova E, Kostevich V, et al. Ferristatin II Efficiently Inhibits SARS-CoV-2 Replication in Vero Cells. *Viruses* 2022;14:317.
93. Liu W, Zhang S, Nekhai S, Liu S. Depriving Iron Supply to the Virus Represents a Promising Adjuvant Therapeutic Against Viral Survival. *Curr Clin Microbiol Rep* 2020;7:13–9.
94. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus–infected pneumonia. *N Engl J Med* 2020;382:1199–207.
95. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020;382:727–33.
96. Rahman S, Montero MTV, Rowe K, Kirton R, Kunik F. Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2021;14:601–21.
97. Jin Y, Yang H, Ji W, Wu W, Chen S, Zhang W, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19. *Viruses* 2020;12:372.
98. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 2020;5:536–44.
99. Araf Y, Faruqui NA, Anwar S, Hosen MJ. SARS-CoV-2: a new dimension to our understanding of coronaviruses. *Int Microbiol* 2021;24:19–24.
100. Sharma A, Ahmad Farouk I, Lal SK. COVID-19: A Review on the novel coronavirus disease evolution, transmission, detection, control and prevention. *Viruses*;13:202.
101. Hillary VE, Ceasar SA. An update on COVID-19: SARS-CoV-2 variants, antiviral drugs, and vaccines. *Heliyon* 2023;9:e13952.

102. Zhong N, Zheng B, Li Y, Poon L, Xie Z, Chan K, et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *The Lancet* 2003;362:1353–8.
103. Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Haque S, Sah R, Tiwari R, Malik YS, et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: a comparative overview. *Infez Med* 2020 Ahead of print Jun 1;28(2):174-184. PMID: 32275259.
104. Lamers MM, Haagmans BL. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2022;20:270–84.
105. Russo E, Corrao S, Di Gaudio F, Alberti G, Caprnda M, Kubatka P, et al. Facing the challenges in the COVID-19 pandemic era: from standard treatments to the umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells as a new therapeutic strategy. *Cells* 2023;12:1664.
106. World Health Organization. Living guidance for clinical management of COVID-19. Preuzeto s: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-2>. (pristupljeno 29. kolovoza 2023.)
107. The Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team. The Epidemiological Characteristics of an Outbreak of 2019 Novel Coronavirus Diseases (COVID-19) — China, 2020. *China CDC Wkly* 2020;2:113–22.
108. Osuchowski MF, Winkler MS, Skirecki T, Cajander S, Shankar-Hari M, Lachmann G, et al. The COVID-19 puzzle: deciphering pathophysiology and phenotypes of a new disease entity. *Lancet Respir Med* 2021;9:622–42.
109. Peeling RW, Heymann DL, Teo YY, Garcia PJ. Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control. *Lancet* 2022;399:757–68.
110. D'Silva C. Oxygenation indices in noninvasive ventilation: could they predict mortality in COVID-19? *Indian J Crit Care Med* 2021;25:841–2.
111. ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 2012;307:2526–33.
112. Cozzi D, Albanesi M, Cavigli E, Moroni C, Bindi A, Luvarà S, et al. Chest X-ray in new Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) infection: findings and correlation with clinical outcome. *Radiol med* 2020;125:730–7.
113. Litmanovich DE, Chung M, Kirkbride RR, Kicska G, Kanne JP. Review of chest radiograph findings of COVID-19 pneumonia and suggested reporting language. *J Thorac Imaging* 2020;35:354.
114. Thompson S, Bohn MK, Mancini N, Loh TP, Wang CB, Grimmmler M, et al. IFCC Interim guidelines on biochemical/hematological monitoring of COVID-19 patients. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:2009–16.

115. Zhang L, Huang B, Xia H, Fan H, Zhu M, Zhu L, et al. Retrospective analysis of clinical features in 134 coronavirus disease 2019 cases. *Epidemiol Infect* 2020;148:e199.
116. Piovani D, Tsantes AG, Bonovas S. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with COVID-19. *J Clin Med* 2022;11:4688.
117. Toori KU, Qureshi MA, Chaudhry A. Lymphopenia: a useful predictor of COVID-19 disease severity and mortality. *Pak J Med Sci* 2021;37:1984–8.
118. Chen G, Zhao X, Chen X, Liu C. Early decrease in blood lymphocyte count is associated with poor prognosis in COVID-19 patients: a retrospective cohort study. *BMC Pulm Med* 2023;23:453.
119. Jafarzadeh A, Jafarzadeh S, Nozari P, Mokhtari P, Nemati M. Lymphopenia an important immunological abnormality in patients with COVID-19: possible mechanisms. *Scand J Immunol* 2021;93:e12967.
120. Palladino M. Complete blood count alterations in COVID-19 patients: a narrative review. *Biochem Med (Zagreb)* 2021;31:403–15.
121. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Elalamy I, Kastritis E, Sergentanis TN, Politou M, et al. Hematological findings and complications of COVID-19. *Am J Hematol* 2020;95:834–47.
122. Rosenberg HF, Foster PS. Eosinophils and COVID-19: diagnosis, prognosis, and vaccination strategies. *Semin Immunopathol* 2021;43:383–92.
123. Yao Y, Cao J, Wang Q, Shi Q, Liu K, Luo Z, et al. D-dimer as a biomarker for disease severity and mortality in COVID-19 patients: a case control study. *J Intensive Care* 2020;8:49.
124. Zeng F, Huang Y, Guo Y, Yin M, Chen X, Xiao L, et al. Association of inflammatory markers with the severity of COVID-19: a meta-analysis. *Int J Infect Dis* 2020;96:467–74.
125. Dolci A, Robbiano C, Aloisio E, Chibireva M, Serafini L, Falvella FS, et al. Searching for a role of procalcitonin determination in COVID-19: a study on a selected cohort of hospitalized patients. *Clin Chem Lab Med* 2021;59:433–40.
126. Han Y, Zhang H, Mu S, Wei W, Jin C, Tong C, et al. Lactate dehydrogenase, an independent risk factor of severe COVID-19 patients: a retrospective and observational study. *Aging* 2020;12:11245–58.
127. Feng G, Zheng KI, Yan QQ, Rios RS, Targher G, Byrne CD, et al. COVID-19 and liver dysfunction: current insights and emergent therapeutic strategies. *J Clin Transl Hepatol* 2020;8:18–24.
128. Cheng Y, Luo R, Wang K, Zhang M, Wang Z, Dong L, et al. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. *Kidney Int* 2020;97:829–38.
129. Suriawinata E, Mehta KJ. Iron and iron-related proteins in COVID-19. *Clin Exp Med* 2022;23:969–91.
130. Akhmerov A, Marbán E. COVID-19 and the Heart. *Circ Res* 2020;126:1443–55.

131. Lippi G, Lavie CJ, Sanchis-Gomar F. Cardiac troponin I in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): Evidence from a meta-analysis. *Prog Cardiovasc Dis* 2020;63:390–1.
132. Jin YH, Cai L, Cheng ZS, Cheng H, Deng T, Fan YP, et al. A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infected pneumonia (standard version). *Mil Med Res* 2020;7:4.
133. Lotfi M, Hamblin MR, Rezaei N. COVID-19: transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities. *Clin Chim Acta* 2020;508:254–66.
134. Speiser DE, Bachmann MF. COVID-19: mechanisms of vaccination and immunity. *Vaccines (Basel)* 2020;8:404.
135. Lebeau G, Vagner D, Frumence É, Ah-Pine F, Guillot X, Nobécourt E, et al. Deciphering SARS-CoV-2 virologic and immunologic features. *Int J Mol Sci* 2020;21:5932.
136. Obi AT, Barnes GD, Napolitano LM, Henke PK, Wakefield TW. Venous thrombosis epidemiology, pathophysiology, and anticoagulant therapies and trials in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord* 2021;9:23–35.
137. Klok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, Arbous MS, Gommers D a. MPJ, Kant KM, et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res* 2020;191:145–7.
138. Carsana L, Sonzogni A, Nasr A, Rossi RS, Pellegrinelli A, Zerbi P, et al. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. *Lancet Infect Dis* 2020;20:1135–40.
139. Hellman U, Karlsson MG, Engström-Laurent A, Cajander S, Dorofte L, Ahlm C, et al. Presence of hyaluronan in lung alveoli in severe Covid-19: an opening for new treatment options? *J Biol Chem* 2020;295:15418–22.
140. Ferreira-Gomes M, Kruglov A, Durek P, Heinrich F, Tizian C, Heinz GA, et al. SARS-CoV-2 in severe COVID-19 induces a TGF- β -dominated chronic immune response that does not target itself. *Nat Commun* 2021;12:1961.
141. Wilson MS, Wynn TA. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunol* 2009;2:103–21.
142. Chen W. A potential treatment of COVID-19 with TGF- β blockade. *Int J Biol Sci* 2020;16:1954–5.
143. Quartuccio L, Semerano L, Benucci M, Boissier MC, De Vita S. Urgent avenues in the treatment of COVID-19: Targeting downstream inflammation to prevent catastrophic syndrome. *Joint Bone Spine* 2020;87:191–3.
144. Wang H, Ma S. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. *Am J Emerg Med* 2008;26:711–5.

145. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395:497–506.
146. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis* 2020;71:762–8.
147. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest* 2020;130:2620–9.
148. Camp JV, Jonsson CB. A Role for neutrophils in viral respiratory disease. *Front Immunol* 2017;8:550.
149. Abraham E. Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med* 2003;31(4 Suppl):S195-199.
150. Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19 - PMC [Internet]. [cited 2024 Jul 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7405878/>
151. Silvin A, Chapuis N, Dunsmore G, Goubet AG, Dubuisson A, Derosa L et al. Elevated calprotectin and abnormal myeloid cell subsets discriminate severe from mild COVID-19. *Cell* 2020 Sep 17;182(6):1401-1418.e18
152. Buja LM, Wolf DA, Zhao B, Akkanti B, McDonald M, Lelenwa L, et al. The emerging spectrum of cardiopulmonary pathology of the coronavirus disease 2019 (COVID-19): Report of 3 autopsies from Houston, Texas, and review of autopsy findings from other United States cities. *Cardiovasc Pathol* 2020;48:107233.
153. Zhou Z, Ren L, Zhang L, Zhong J, Xiao Y, Jia Z, et al. Heightened innate immune responses in the respiratory tract of COVID-19 patients. *Cell Host Microbe* 2020 Jun 10;27(6):883-890.e2.
154. Barnes BJ, Adrover JM, Baxter-Stoltzfus A, Borczuk A, Cools-Lartigue J, Crawford JM, et al. Targeting potential drivers of COVID-19: neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* 2020 Jun 1;217(6):e20200652.
155. Wilk AJ, Rustagi A, Zhao NQ, Roque J, Martínez-Colón GJ, McKechnie JL, et al. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat Med* 2020;26:1070–6.
156. Wen W, Su W, Tang H, Le W, Zhang X, Zheng Y et al.. Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing. *Cell Discov.* 2020;6:31. Erratum in: *Cell Discov* 2020;6:41
157. Zhou Y, Fu B, Zheng X, Wang D, Zhao C, Qi Y, et al. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. *Natl Sci Rev.* 2020;7:998–1002.

158. De Biasi S, Meschiari M, Gibellini L, Bellinazzi C, Borella R, Fidanza L, et al. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat Commun* 2020;11:3434.
159. Mazzone A, Salvati L, Maggi L, Capone M, Vanni A, Spinicci M, et al. Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent. *J Clin Invest* 2020;130:4694–703.
160. Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823:1434–43.
161. Nai A, Lorè NI, Pagani A, De Lorenzo R, Di Modica S, Saliu F, et al. Hepcidin levels predict Covid-19 severity and mortality in a cohort of hospitalized Italian patients. *Am J Hematol* 2021;96(1):E32–5.
162. Zhou C, Chen Y, Ji Y, He X, Xue D. Increased serum levels of hepcidin and ferritin Are associated with severity of COVID-19. *Med Sci Monit* 2020 Sep 26;26:e926178-1-e926178-6.
163. Yağcı S, Serin E, Acicbe Ö, Zeren Mİ, Odabaşı MS. The relationship between serum erythropoietin, hepcidin, and haptoglobin levels with disease severity and other biochemical values in patients with COVID-19. *Int J Lab Hematol* 2021;43(Suppl 1):142–51.
164. Dahan S, Segal G, Katz I, Hellou T, Tietel M, Bryk G, et al. Ferritin as a marker of severity in COVID-19 patients: a fatal correlation. *Isr Med Assoc J* 2020;22:494–500.
165. Colafrancesco S, Alessandri C, Conti F, Priori R. COVID-19 gone bad: A new character in the spectrum of the hyperferritinemic syndrome? *Autoimmun Rev* 2020;19:102573.
166. Li Q, Chen Z, Zhou X, Li G, Zhang C, Yang Y. Ferroptosis and multi-organ complications in COVID-19: mechanisms and potential therapies. *Front Genet*. 2023;14:1187985.
167. Čepelak I, Dodig S, Vučenik I. Hyperferritinemia and COVID-19? *RAD CASA - Medical Sciences*. 2020;544:18-25.
168. Hippchen T, Altamura S, Muckenthaler MU, Merle U. hypoferremia is associated with increased hospitalization and oxygen demand in COVID-19 patients. *HemaSphere*. 2020 Dec;4(6):e492.
169. Shah A, Frost JN, Aaron L, Donovan K, Drakesmith H, Collaborators, et al. Systemic hypoferremia and severity of hypoxemic respiratory failure in COVID-19. *Crit Care* 2020;24(1):320.
170. Zhao K, Huang J, Dai D, Feng Y, Liu L, Nie S. Serum iron level as a potential predictor of Coronavirus disease 2019 severity and mortality: a retrospective study. *Open Forum Infect Dis* 2020 Jul;7(7):ofaa250.
171. Sonnweber T, Boehm A, Sahanic S, Pizzini A, Aichner M, Sonnweber B, et al. Persisting alterations of iron homeostasis in COVID-19 are associated with non-resolving lung pathologies and poor patients' performance: a prospective observational cohort study. *Respir Res* 2020;21:276.

172. Chakurkar V, Rajapurkar M, Lele S, Mukhopadhyay B, Lobo V, Injarapu R, et al. Increased serum catalytic iron may mediate tissue injury and death in patients with COVID-19. *Sci Rep* 2021;11:19618.
173. Hanson AL, Mulè MP, Ruffieux H, Mescia F, Bergamaschi L, Pelly VS, et al. Iron dysregulation and inflammatory stress erythropoiesis associates with long-term outcome of COVID-19. *Nat Immunol* 2024;25:471–82.
174. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of non-apoptotic cell death. *Cell* 2012;149:1060–72.
175. Ni S, Yuan Y, Kuang Y, Li X. Iron Metabolism and Immune Regulation. *Front Immunol* 2022;13:816282.
176. Frost JN, Tan TK, Abbas M, Wideman SK, Bonadonna M, Stoffel NU, et al. Hepcidin-mediated hypoferremia disrupts immune responses to vaccination and infection. *Med* 2021 Feb 12;2(2):164-179.e12.
177. Udovičić M, Baždarić K, Bilić-Zulle L, Petrovečki M. What we need to know when calculating the coefficient of correlation? *Biochem Med (Zagreb)* 2007;17:10–5.
178. Vogt ACS, Arsiwala T, Mohsen M, Vogel M, Manolova V, Bachmann MF. On iron metabolism and its regulation. *Int J Mol Sci* 2021;22:4591.
179. Huang H, Constante M, Layoun A, Santos MM. Contribution of STAT3 and SMAD4 pathways to the regulation of hepcidin by opposing stimuli. *Blood* 2009;113:3593–9.
180. Hegelund MH, Glenthøj A, Ryrso CK, Ritz C, Dungu AM, Sejdic A, et al. Biomarkers for iron metabolism among patients hospitalized with community-acquired pneumonia caused by infection with SARS-CoV-2, bacteria, and influenza. *APMIS* 2022;130:590–6.
181. Maira D, Duca L, Busti F, Consonni D, Salvatici M, Vianello A, et al. The role of hypoxia and inflammation in the regulation of iron metabolism and erythropoiesis in COVID-19: The IRONCOVID study. *Am J Hematol* 2022;97:1404–12.
182. Stoffel NU, Lazrak M, Bellitir S, Mir NE, Hamdouchi AE, Barkat A, et al. The opposing effects of acute inflammation and iron deficiency anemia on serum hepcidin and iron absorption in young women. *Haematologica* 2019;104:1143–9.
183. Goetze O, Schmitt J, Spliethoff K, Theurl I, Weiss G, Swinkels DW, et al. Adaptation of iron transport and metabolism to acute high-altitude hypoxia in mountaineers. *Hepatology* 2013;58:2153–62.
184. Ganz T, Nemeth E. Iron balance and the role of hepcidin in chronic kidney disease. *Semin Nephrol* 2016;36:87–93.
185. Kowdley KV, Gochanour EM, Sundaram V, Shah RA, Handa P. Hepcidin signaling in health and disease: ironing out the details. *Hepatol Commun*. 2021;5:723–35.

186. Pasricha SR, McHugh K, Drakesmith H. Regulation of hepcidin by erythropoiesis: the story so far. *Annu Rev Nutr* 2016;36:417–34.
187. Coffey R, Ganz T. Erythroferrone: An erythroid regulator of hepcidin and iron metabolism. *hemasphere*. 2018 Mar 28;2(2):e35. doi: 10.1097/HS9.000000000000035. PMID: 31723763; PMCID: PMC6745900.
188. Buttarello M. Laboratory diagnosis of anemia: are the old and new red cell parameters useful in classification and treatment, how? *Int J Lab Hematol* 2016 May;38 Suppl 1:123–32.
189. Sangkhae V, Nemeth E. Regulation of the iron homeostatic hormone hepcidin. *Adv Nutr* 2017;8:126–36.
190. Speeckaert MM, Speeckaert R, Delanghe JR. Biological and clinical aspects of soluble transferrin receptor. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2010;47:213–28.
191. Hoenemann C, Ostendorf N, Zarbock A, Doll D, Hagemann O, Zimmermann M, et al. Reticulocyte and erythrocyte hemoglobin parameters for iron deficiency and anemia diagnostics in patient blood management. A narrative review. *J Clin Med*. 2021;10:4250.
192. De Mast Q, Van Dongen-Lases EC, Swinkels DW, Nieman AE, Roestenberg M, Druilhe P, et al. Mild increases in serum hepcidin and interleukin-6 concentrations impair iron incorporation in haemoglobin during an experimental human malaria infection. *Br J Haematol*. 2009;145:657–64.
193. Claise C, Saleh J, Rezek M, Vaulont S, Peyssonnaud C, Edeas M. Low transferrin levels predict heightened inflammation in patients with COVID-19: new insights. *Int J Infect Dis* 2022;116:74–9.
194. Ahmed S, Ansar Ahmed Z, Siddiqui I, Haroon Rashid N, Mansoor M, Jafri L. Evaluation of serum ferritin for prediction of severity and mortality in COVID-19- A cross sectional study. *Ann Med Surg* 2021;63:102163.
195. Weiss G. Iron and immunity: a double-edged sword. *Eur J Clin Invest*. 2002 Mar;32 Suppl 1:70–8.
196. Hortová-Kohoutková M, Skotáková M, Onyango IG, Slezáková M, Panovský R, Opatřil L, et al. Hepcidin and ferritin levels as markers of immune cell activation during septic shock, severe COVID-19 and sterile inflammation. *Front Immunol*. 2023 Jan 27;14:1110540.
197. Stockwell BR, Angeli JPF, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon S, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. *Cell* 2017;171:273–85.
198. Yan H fa, Zou T, Tuo Q zhang, Xu S, Li H, Belaidi AA, et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. *Sig Transduct Target Ther* 2021;6:1–16.
199. Jankauskas SS, Kansakar U, Sardu C, Varzideh F, Avvisato R, Wang X, et al. COVID-19 causes ferroptosis and oxidative stress in human endothelial cells. *Antioxidants* 2023;12:326.

200. Chen X, Yu C, Kang R, Tang D. Iron Metabolism in Ferroptosis. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:590226.
201. Gonzalez-Mosquera LF, Gomez-Paz S, Lam E, Cardenas-Maldonado D, Fogel J, Adi V, Rubinstein S. Hematologic involvement as a predictor of mortality in COVID-19 patients in a safety net hospital. *Kans J Med* 2022;15:8-16.
202. Zhao Y, Nie HX, Hu K, Wu XJ, Zhang YT, Wang MM, et al. Abnormal immunity of non-survivors with COVID-19: predictors for mortality. *Infect Dis Poverty* 2020;9:108.
203. Kilercik M, Demirelce Ö, Serdar MA, Mikailova P, Serteser M. A new haematocytometric index: Predicting severity and mortality risk value in COVID-19 patients. *PLOS ONE* 2021;16(8):e0254073.
204. Ben Jemaa A, Salhi N, Ben Othmen M, Ben Ali H, Guissouma J, Ghadhoun H, et al. Evaluation of individual and combined NLR, LMR and CLR ratio for prognosis disease severity and outcomes in patients with COVID-19. *Int Immunopharmacol* 2022 ;109:108781.
205. Chan AS, Rout A. Use of neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios in COVID-19. *J Clin Med Res* 2020;12:448–53.
206. Asan A, Üstündağ Y, Koca N, Şimşek A, SAyan HE, Parildar H, et al. Do initial hematologic indices predict the severity of COVID-19 patients? *Turk J Med Sci* 2021 26;51:39–44.
207. Dymicka-Piekarska V, Dorf J, Milewska A, Łukaszyk M, Kosidło JW, Kamińska J, et al. Neutrophil/lymphocyte ratio (NLR) and lymphocyte/monocyte ratio (LMR) – risk of death inflammatory biomarkers in patients with COVID-19. *J Inflamm Res* 2023;16:2209–22.
208. Raman N, Kv P, Ashta KK, Vardhan V, Thareja S, J M, et al. Ferritin and hemoglobin as predictors of fatal outcome in COVID-19: two sides of the same coin. *J Assoc Physicians India* 2021;69:11–2.
209. Khadzhieva MB, Gracheva AS, Belopolskaya OB, Chursinova YV, Redkin IV, Pisarev MV, et al. Serial changes in blood-cell-count-derived and CRP-derived inflammatory indices of COVID-19 patients. *Diagnostics* 2023;13:746.
210. Thungthienthong M, Vattanavanit V. Platelet-to-white blood cell ratio as a predictor of mortality in patients with severe COVID-19 pneumonia: a retrospective cohort study. *Infect Drug Resist* 2023;16:445–55.
211. Ullah W, Basyal B, Tariq S, Almas T, Saeed R, Roomi S, et al. Lymphocyte-to-C-Reactive Protein Ratio: A novel predictor of adverse outcomes in COVID-19. *J Clin Med Res* 2020;12:415–22.
212. Yildirim Akan O, Bilgir O. Effects of neutrophil/monocyte, neutrophil/lymphocyte, neutrophil/platelet ratios and C-reactive protein levels on the mortality and intensive care need of the patients diagnosed with Covid-19. *EJMI*. 2021; 5: 21-26

213. Koc I, Dogan S. Ferritin lymphocyte ratio and D-dimer C-Reactive protein ratio as diagnostic parameters in pre-COVID-19 healthy individuals. *Ulutas Med J* 2022; 8: 51-57.
214. Wolszczak-Biedrzycka B, Dorf J, Milewska A, Łukaszyk M, Naumnik W, Kosidło JW, et al. The diagnostic value of inflammatory markers (CRP, IL6, CRP/IL6, CRP/L, LCR) for assessing the severity of COVID-19 symptoms based on the MEWS and predicting the risk of mortality. *J Inflamm Res* 2023;16:2173–88.
215. Koç İ, Gullu YT. How to differentiate the B.1.1.7 variant from COVID-19 in hospitalized patients? *Eur Res J* 2022;8:629–35.
216. Safak T, Koza M, Cikrikci Isik G, et al. Correlation of C-reactive protein/lymphocyte ratio with mortality in patients diagnosed with COVID-19 in the emergency department. *Int Target Med J* 2023;2:12-7
217. Abensur Vuillaume L, Lefebvre F, Benhamed A, Schnee A, Hoffmann M, Godoy Falcao F, et al. Lymphocyte-to-C-reactive protein (LCR) ratio is not accurate to predict severity and mortality in patients with COVID-19 admitted to the ED. *Int J Mol Sci.* 2023;24:5996.
218. Sara I. Taha, Aalaa K. Shata, Eman M. El-Sehsah, Shaimaa H. Fouad, Aya H. Moussa, Shaimaa A. Abdalgeleel, Nouran M. Moustafa, Mariam K. Youssef. Evaluation of the predictive value of C-reactive protein, interleukin-6 and their derived immune-inflammatory indices in COVID-19 Egyptian patients. *Microbes and Infectious Diseases* 2022; 3: 13-23
219. Demirkol ME, Bilgin S, Kahveci G, Kurtkulagi O, Atak Tel BM, Duman TT, et al. C-reactive protein-to-lymphocyte ratio is a reliable marker in patients with COVID-19 infection: the CLEAR COVID study. *Cir Cir* 2022;90:596–601.
220. Donati G, Gasperoni L, Zappulo F, Scrivo A, Napoli M, Di Filippo F, et al. Interleukin-6 and outcome of chronic hemodialysis patients with SARS-CoV-2 pneumonia. *Medicina* 2022;58:1659.
221. Masotti L, Grifoni E, Pelagalli G, Cioni E, Mattaliano C, Cioffi E, et al. Prognostic role of Interleukin-6/lymphocytes ratio in SARS-CoV2 related pneumonia. *Int Immunopharmacol* 2022;103:108435.
222. Yang B, Chang X, Huang J, Pan W, Si Z, Zhang C, et al. The role of IL-6/lymphocyte ratio in the peripheral blood of severe patients with COVID-19. *Int Immunopharmacol* 2021;97:107569.
223. Weiss G, Ganz T, Goodnough LT. Anemia of inflammation. *Blood.* 2019;133:40–50.
224. Bellmann-Weiler R, Lanser L, Barket R, Rangger L, Schapfl A, Schaber M, et al. prevalence and predictive value of anemia and dysregulated iron homeostasis in patients with COVID-19 Infection. *J Clin Med* 2020;9:2429.

8. POPIS KRATICA

ANOVA	analiza varijance (engl. <i>analysis of variance</i>)
ACE-2	enzim 2 koji kida angiotenzin (engl. <i>angiotensin-converting enzyme 2</i>)
ALT	alanin-aminotransferaza
ARDS	sindrom akutnog respiracijskog ditresa (engl. <i>acute respiratory distress syndrome</i>)
AST	aspartat-aminotransferaza
AUC	površina ispod krivulje (engl. <i>area under the curve</i>)
BMP	koštani morfogeni protein (engl. <i>bone morphogenic protein</i>)
BMP-RE	element koji odgovara na BMP (engl. <i>BMP responsive element</i>)
CD biljezi	diferencijacijski biljezi CD (engl. <i>cluster of differentiation</i>)
CI	interval pouzdanosti (engl. <i>confidence interval</i>)
CNV	pseći parvovirus (engl. <i>canine parvovirus</i>)
CRP	C-reaktivni protein
COVID-19	koronavirusna bolest (engl. <i>coronavirus disease</i>)
DMT1	prijenosnik 1 dvovalentnih metala (engl. <i>divalent metal transporter 1</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DyctB	duodenalni citokrom B
DIK	diseminirana intravaskularna koagulacija
ECLIA	elektrokemiluminiscentna imunokemijska analiza (engl. <i>electrochemiluminescence immunoassay</i>)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
eGFR	procijenjena brzina gomerularne filtracije (engl. <i>estimated glomerular filtration rate</i>)

ELISA	enzimski povezan imunosorpcijski test (engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
EPO	eritropoetin
ERFE	eritroferon
Fe	željezo
FiO₂	frakcija kisika u udahnutom zraku (engl. <i>fraction of inspiratory oxygen concentration</i>)
FNP	virus mačje panleukopenije (engl. <i>feline panleukopenia virus</i>)
GDF 15	faktor rasta i diferencijacije 15 (engl. <i>growth differentiation factor 15</i>)
G-CSF	faktor koji stimulira granulocitne kolonije (engl. <i>granulocyte-colony stimulating factor</i>)
HBV	virus hepatitisa B
HCMV	humani citomegalovirus (engl. <i>human cytomegalovirus</i>)
HCP1	protein 1 koji prenosi hem (engl. <i>heme-carrier protein 1</i>)
HCV	virus hepatitisa C
HFE	protein nasljedne hemokromatoze (engl. <i>hereditary hemochromatosis protein</i>)
HFNO	nosna kanila visokog protoka (engl. <i>high flow nasal oxigen</i>)
HIF	faktor induciran hipoksijom (engl. <i>hypoxia inducible factor</i>)
HIF2α	faktor 2 alpha induciran hipoksijom (engl. <i>hypoxia inducible factor 2 alpha</i>).
HIV	virus humane imunodeficijencije (engl. <i>human immunodeficiency virus</i>)
HJV	hemojuvelin
HO-1	oksigenaza 1 hema
HRE	element koji odgovara na stanje hipoksije (engl. <i>hypoxia-responsive element</i>)
hsTnI	troponin visoke osjetljivosti I (engl. <i>high sensitivity troponin I</i>)
IL	interleukin

IFN-γ	interferon γ
IP-10	protein 10 kojeg inducira interferon gamma (engl. <i>interferon-gamma inducible protein 10</i>)
IRF	udio nezrelih retikulocita (engl. <i>immature reticulocyte fraction</i>)
IRE	element koji odgovara na željezo (engl. <i>iron-responsive element</i>)
IRP	protein koji odgovara na željezo (engl. <i>iron-responsive protein</i>)
JAK	Janus kinaza
JIL	jedinica intenzivnog liječenja
KBC	klinički bolnički centar
KKS	kompletna krvna slika
LEAP	antimikrobni peptid eksprimiran u jetri (engl. <i>liver-expressed antimicrobial peptide</i>)
LDH	laktat-dehidrogenaza
NET	neutrofilna izvanstanična zamka (engl. <i>neutrophil extracellular trap</i>)
NF-κB	nuklearni faktor kappa B (engl. <i>nuclear factor kappa B</i>)
NK stanice	prirodnoubilačke stanice (engl. <i>natural killer cells</i>)
NLR	omjer neutrofilnih granulocita i limfocita (engl. <i>neutrophil to lymphocyte ratio</i>)
NMR	omjer neutrofilnih granulocita i monocita (engl. <i>neutrophil to monocyte ratio</i>)
NTBI	frakcija željeza koja nije vezana za transferin (engl. <i>non-transferin binding iron</i>)
MERS	bliskoistočni respiracijski sindrom (engl. <i>Middle East respiratory syndrome</i>)
MERS-CoV	koronavirusa povezanog s bliskoistočnim respiracijskim sindromom (engl. <i>Middle East respiratory syndrome coronavirus</i>)
MCP 1	monocitni kemotaktični protein 1 (engl. <i>monocyte chemotactic protein 1</i>)
MIP1A	upalni protein makrofaga 1 alpha (engl. <i>macrophage inflammatory protein 1 alpha</i>)

MLR	omjer monocita i limfocita (engl. <i>monocyte to lymphocyte ratio</i>)
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (engl. <i>messenger ribonucleid acid</i>)
OR	omjer izgleda (engl. <i>odds ratio</i>)
PaO₂	parcijalni tlak kisika u arterijskoj krvi (engl. <i>partial pressure of oxygen in arterial blood</i>)
PCT	prokalcitonin
PRR	receptori za molekularne obrasce (engl. <i>pattern recognition receptors</i>)
PDGF-BB	trombocitni faktor rasta BB (engl. <i>platelet derived growth factor BB</i>)
r	koeficijent korelacije
RET-He	sadržaj hemoglobina u retikulocitima (engl. <i>reticulocyte haemoglobin equivalent</i>)
RES	retikuloendotelni sustav
RTC	retikulociti
RTG	radiografska snimka
RT-PCR	lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (engl. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
sHJV	topljivi oblik hemojuvelina (engl. <i>soluble hemojuvelin</i>)
SpO₂	zasićenje hemoglobina kisikom
SARS CoV-2	koronavirus 2 povezan s teškim akutnim respiracijskim sindromom (engl. <i>severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>)
STAT	prenositelj signala i aktivator transkripcije (engl. <i>signal transducer and activator of transcription</i>)
SMAD	engl. <i>sons of mothers against decapentaplegic</i>
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
sTfR	topljivi transferinski receptori
TfR1	tip 1 transferinskog receptora

TfR2	tip 2 transferinskog receptora
TGF-β	transformirajući faktor rasta beta (engl. <i>transforming growth factor beta</i>)
TIBC	ukupni kapacitet vezanja željeza (engl. <i>total iron binding capacity</i>)
TMPRSS	transmembranska serinska proteaza (engl. <i>transmembrane serine protease</i>)
TNF-α	faktor tumorske nekroze alpha (engl. <i>tumor necrosis factor alpha</i>)
TSAT	zasićenje transferina
UIBC	nezasićeni kapacitet vezanja željeza (engl. <i>unsaturated iron binding capacity</i>)
3'-UTR	netranslatirajuća regija na 3' kraju (engl. <i>3' untranslated region</i>)
5'-UTR	netranslatirajuća regija na 5' kraju (engl. <i>5' untranslated region</i>)
TWSG1	homolog 1 proteina izokrenute gastrulacije (engl. <i>twisted gastrulation protein 1</i>)

9. ŽIVOTOPIS

Katarina Gugo rođena je 1. listopada 1983. godine u Kninu gdje je pohađala osnovnu školu i opću gimnaziju. Upisala je studij medicinske biokemije na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu 2002. godine te je diplomirala 2008. godine.

Pripravnički staž odradila je od 2008. do 2009. godine u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Split. Od veljače 2010. do studenog 2010. radila je kao voditelj laboratorija u Domu zdravlja Drniš. U Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split zaposlena je od 2010. godine, a specijalistički ispit iz medicinske biokemije i laboratorijske medicine položila je 2015. godine. Kao vanjski suradnik sudjeluje u nastavi na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu i na Katedri za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku na Zdravstvenom studiju Sveučilišta u Splitu. Izabrana je u zvanje predavača na Katedri za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku na Zdravstvenom studiju Sveučilišta u Splitu 2019. godine.

Član je Hrvatske komore medicinskih biokemičara i Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu. Od 2018. godine član je Radne skupine za laboratorijsku dijagnostiku autoimunih bolesti Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu.

POPIS RADOVA

1. Gugo K, Tandara L, Juricic G, Pavicic Ivelja M, Rumora L. Effects of hypoxia and inflammation on hepcidin concentration in non-anaemic COVID-19 patients. *J Clin Med* 2024;13:3201.
2. Perković D, Petrić M, Šimac P, Vodanović A, Borić K, Gugo K, Tandara L. Antineutrophil cytoplasmic antibody positivity incidence before and during COVID-19 pandemic. *Rheumatol Int* 2024 Apr 24. doi: 10.1007/s00296-024-05596-3. [Epub ahead of print].
3. Nazlić J, Jurić D, Mudnić I, Boban Z, Dželalija AM, Tandara L, Šupe-Domić D, Gugo K, Boban M. Effects of moderate consumption of red wine on hepcidin levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Foods* 2022;11:1881.
4. Simac P, Perkovic D, Bozic I, Matijas M, Gugo K, Martinovic D, Bozic J. Serum catestatin levels in patients with rheumatoid arthritis. *Sci Rep* 2022;12:3812.
5. Danolić MJ, Perković D, Petrić M, Barišić I, Gugo K, Božić J. Adropin serum levels in patients with primary Sjögren's syndrome. *Biomolecules* 2021;11:1296.
6. Tešija Kuna A, Đerek L, Drvar V, Kozmar A, Gugo K. Assessment of antinuclear antibodies (ANA): National recommendations on behalf of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. *Biochem Med* 2021;31:020502. Erratum in: *Biochem Med* 2022;32:011201.
7. Tandara L, Grubisic TZ, Ivan G, Jurisic Z, Tandara M, Gugo K, Mladinov S, Salamunic I. Systemic inflammation up-regulates serum hepcidin in exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Biochem* 2015;48:1252-7.

10. PRILOG



Article

Effects of Hypoxia and Inflammation on Hepcidin Concentration in Non-Anaemic COVID-19 Patients

Katarina Gugo^{1,2,*} , Leida Tandara^{1,3} , Gordana Juricic⁴ , Mirela Pavicic Ivelja^{2,5} and Lada Rumora⁶

¹ Medical Laboratory Diagnostic Division, University Hospital of Split, Soltanska 1, 21000 Split, Croatia; ltandara@kbsplit.hr

² Department of Health Studies, University of Split, Rudera Boskovicica 35, 21000 Split, Croatia; mpavivelj@kbsplit.hr

³ Department of Medical Chemistry and Biochemistry, University of Split School of Medicine, Soltanska 2, 21000 Split, Croatia

⁴ Department of Laboratory Diagnostics, General Hospital Pula, Santoriovca 24a, 52100 Pula, Croatia; gordana.juricic@obpula.hr

⁵ Department of Infectious Diseases, University Hospital of Split, Soltanska 1, 21000 Split, Croatia

⁶ Department of Medical Biochemistry and Haematology, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, A. Kovacica 1, 10000 Zagreb, Croatia; lada.rumora@pharma.unizg.hr

* Correspondence: kgugo@kbsplit.hr; Tel.: +385-21-557319

Abstract: Background/Objectives: This study aimed to explore the influence of hypoxia, inflammation, and erythropoiesis on hepcidin and other iron status parameters in non-anaemic COVID-19 patients admitted to the emergency unit before the introduction of therapeutic interventions. **Methods:** Ninety-six COVID-19 patients and 47 healthy subjects were recruited. Patients were subdivided into hypoxic or normoxic groups and, after follow-up, into mild and moderate, severe or critical disease severity groups. Iron, unsaturated iron-binding capacity (UIBC), ferritin, C-reactive protein (CRP), and interleukin 6 (IL-6) were measured on automatic analysers. ELISA kits were used for hepcidin and erythropoietin (EPO) determination. We calculated total iron-binding capacity (TIBC) and ratios of hepcidin with parameters of iron metabolism (ferritin/hepcidin, hepcidin/iron), inflammation (hepcidin/CRP, hepcidin/IL-6), and erythropoietic activity (hepcidin/EPO). **Results:** Hepcidin, ferritin, EPO, CRP, IL-6, ferritin/hepcidin, and hepcidin/iron were increased, while UIBC, TIBC, hepcidin/CRP, and hepcidin/IL-6 were decreased in hypoxic compared to normoxic patients as well as in patients with severe or critical disease compared to those with mild and moderate COVID-19. Regarding predictive parameters of critical COVID-19 occurrence, in multivariable logistic regression analysis, a combination of EPO and ferritin/hepcidin showed very good diagnostic performances and correctly classified 88% of cases, with an AUC of 0.838 (0.749–0.906). **Conclusions:** The hypoxic signal in our group of patients was not strong enough to overcome the stimulating effect of inflammation on hepcidin expression. EPO and ferritin/hepcidin might help to identify on-admission COVID-19 patients at risk of developing a critical form of the disease.

Keywords: COVID-19; hepcidin; iron; ferritin; erythropoietin; interleukin 6; hypoxia; inflammation



Citation: Gugo, K.; Tandara, L.; Juricic, G.; Pavicic Ivelja, M.; Rumora, L. Effects of Hypoxia and Inflammation on Hepcidin Concentration in Non-Anaemic COVID-19 Patients. *J. Clin. Med.* **2024**, *13*, 3201. <https://doi.org/10.3390/jcm13113201>

Academic Editor: Edward A. Bittner

Received: 22 April 2024

Revised: 20 May 2024

Accepted: 27 May 2024

Published: 29 May 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The liver hormone hepcidin is the master regulator of iron metabolism. Hepcidin modulates iron homeostasis through interaction with ferroportin, the only known iron exporter, resulting in internalisation, degradation, and permanent removal of ferroportin from the cell membrane [1]. This leads to the retention of iron in the storage compartments and decreased availability of iron in the extracellular milieu [2,3]. Thus, hepcidin regulates intestinal iron absorption and release of iron from storage compartments. Iron is essential for all living organisms, including microorganisms, which also need iron for survival, replication, and virulence [4]. Consequently, the regulation of iron homeostasis during infection is of crucial importance since both the host and pathogen compete for iron [5,6].

Hepcidin production is regulated on a transcriptional level. Infection, inflammation, and high iron stores stimulate hepcidin expression, and anaemia/hypoxia, low iron stores, and erythropoietic activity downregulate hepcidin expression [7,8]. A rise in hepcidin level leads to iron redistribution to protect the host cells from invading microorganisms through a process called nutritional immunity [9].

Coronavirus disease-2019 (COVID-19) caused by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) predominantly impacts the respiratory system, though other organs can also be affected. SARS-CoV-2 infection presents with a spectrum of symptoms, ranging from asymptomatic infection to symptomatic disease of different severity [10]. Diverse symptoms can be observed in patients at the time of clinical presentation, with no clear association with risk factors and SARS-CoV-2 genotypes noticed [11]. In severe cases, pulmonary dysfunction occurs, leading to hypoxemia [12]. In patients with SARS-CoV-2 infection, the inflammatory response involves the secretion of various proinflammatory cytokines [13], some of which may impact iron homeostasis. Given that iron availability can influence viral replication [14], host immune effector mechanisms [5], contribute to tissue damage, and worsen disease outcomes [15], potential therapeutic interventions aimed at regulating iron homeostasis in infectious diseases are emerging as promising tools. Therefore, a better understanding of iron homeostasis is necessary.

Studies investigating the parameters of iron homeostasis during the infection with SARS-CoV-2 in COVID-19 found that iron metabolism is altered, and these disturbances mainly manifest as hypoferrremia and hyperferritinemia [16,17]. Some authors even propose that iron metabolism changes could be involved in complications of COVID-19-induced pathology [18]. However, it is not entirely clear whether these changes primarily reflect a physiological response to infection or disturbances of iron metabolism actively contribute to COVID-19 pathology [19]. During infection, an elevation in hepcidin level caused primarily by the stimulatory effect of interleukin 6 (IL-6) leads to the development of hypoferrremia [20]. However, in some pathological conditions like COVID-19, different factors which control hepcidin expression can be simultaneously present, generating opposing signals for hepcidin expression. It was shown that the final effect of signals that regulate hepcidin expression is not determined only by the hierarchy between signalling pathways but rather by the strength of the individual stimuli [21]. Studies that measured hepcidin concentration in the circulation of COVID-19 patients gave conflicting results, with most studies demonstrating elevated hepcidin concentrations [22–25], but its decreased concentrations in critically ill patients compared to healthy controls were also reported [26].

While most studies have primarily focused on the prognostic value of iron status biomarkers [16,22,23,27], insufficient studies regarding the mechanisms regulating iron metabolism in SARS-CoV-2 infection are available. Hypoxia and inflammation are simultaneously present in COVID-19 as two opposing signals which influence hepcidin expression. Studies on human models involving healthy volunteers have shown that hypoxia can prevail over inflammatory stimuli on hepcidin expression [28,29]. Hypoxia might regulate hepcidin expression through the induction of hypoxia-inducible transcription factors. Hypoxia also stimulates erythropoietin (EPO) production, which stimulates erythropoiesis and leads to the expression of erythroferrone in erythroblasts [30,31], and erythroferrone probably directly inhibits hepcidin expression in response to increased erythropoietic demand for iron [32].

Our hypothesis is that in COVID-19 patients, hypoxia, when present, might overcome the inflammatory impact on hepcidin expression and cause a decrease in its concentration in peripheral blood compared to COVID-19 patients with normal oxygen saturation. The aim of this study was to explore the influence of hypoxia, inflammation, and erythropoiesis on concentrations of hepcidin and other parameters of iron status in groups of non-anaemic normoxic and hypoxic COVID-19 patients on admission into the emergency unit before the introduction of therapeutic interventions. We applied rigorous exclusion criteria to eliminate comorbidities and conditions that could influence hepcidin concentration. We also examined the diagnostic potential of various iron metabolism-related parameters

measured on admission to predict the risk of developing a critical form of the disease later on.

Therefore, we have determined the concentrations of hepcidin as well as the parameters of iron metabolism, inflammation, and erythropoiesis. We also calculated various ratios of hepcidin with parameters of iron metabolism (ferritin-to-hepcidin ratio; hepcidin-to-iron ratio) and parameters reflecting inflammation (hepcidin-to-CRP ratio; hepcidin-to-IL-6 ratio) or erythropoietic activity (hepcidin-to-EPO ratio).

2. Materials and Methods

2.1. Study Subjects

This study included 47 healthy volunteers as a control group, and 96 COVID-19 patients with COVID-19 symptoms were admitted to the emergency unit of the Infectious Disease Department of the University Hospital of Split (Split, Croatia). SARS-CoV-2 positivity was confirmed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) from a nasopharyngeal swab. The inclusion criterion was age between 20 and 75 years for both groups. Exclusion criteria applied were as follows: anaemia (haemoglobin < 120 g/L for women and <130 g/L for men); history of any haematological disease; liver disease; chronic kidney disease; estimated glomerular filtration rate (eGFR) < 60 mL/min; inflammatory bowel disease; systemic autoimmune disease; malignant disease; chronic obstructive pulmonary disease; asthma; surgical procedure and blood transfusion in previous 3 months; therapy with iron supplements; pregnancy; and breastfeeding.

Based on oxygen saturation levels measured on admission, COVID-19 patients were classified into two groups: hypoxic ($\text{SpO}_2 < 94\%$); and normoxic ($\text{SpO}_2 \geq 94\%$). A total of 47 hypoxic COVID-19 patients and 49 normoxic COVID-19 patients were matched by age and sex. The control group was also matched by age and sex to the COVID-19 patients and met the same criteria, except for SARS-CoV-2 positivity.

COVID-19 patients were categorised based on prospective follow-up into three groups, according to the World Health Organization guidelines [33]: patients with mild and moderate, severe and critical COVID-19. Symptomatic COVID-19 patients without viral pneumonia or hypoxia were classified as mild cases. Moderate COVID-19 disease was determined by the presence of mild pneumonia with $\text{SpO}_2 > 90\%$ on room air, while severe disease was indicated by severe pneumonia with $\text{SpO}_2 < 90\%$ on room air. Critical COVID-19 disease was identified by respiratory failure resulting from viral pneumonia and other critical conditions requiring mechanical respiratory support and other life-sustaining therapies.

2.2. Study Design

This single-centre observational study was performed at the University Hospital of Split between June 2021 and June 2022. This study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Split (Split, Croatia) and Ethics Committee for Experimentation of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry (Zagreb, Croatia) (approval protocol numbers: 2181-147/01/06/M.S.-21-02 and 251-62-03-23-58, respectively) and was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all study participants.

For each patient demographic, clinical and anamnestic data were collected upon arrival at the emergency unit and analysis of oxygen saturation (SpO_2), complete blood count, and routine biochemical tests were performed. Information on the course of the disease was prospectively monitored by reviewing the medical documentation from the hospital information system.

In addition to routine tests performed on admission, the concentrations of hepcidin, iron, unsaturated iron-binding capacity (UIBC), ferritin, soluble transferrin receptors (sTfR), reticulocyte haemoglobin equivalent (RET-He), reticulocyte number (RTC), immature reticulocyte fraction (IRF), EPO, C-reactive protein (CRP), and IL-6 were also measured for all subjects, and total iron-binding capacity (TIBC) and transferrin saturation (TSAT) were cal-

culated, as well as various ratios that included hepcidin (ferritin/hepcidin, hepcidin/iron, hepcidin/CRP, hepcidin/IL-6, and hepcidin/EPO).

2.3. Blood Sampling

Blood samples were taken immediately upon admission of the COVID-19 patients to the emergency unit of the Department of Infectious Disease prior to the initiation of therapeutic interventions. Blood sampling for the control group was performed at the Medical Laboratory Diagnostic Division of the University Hospital of Split (Split, Croatia).

Two tubes of venous blood were sampled for all patients: a tube with K3-ethylenediaminetetraacetic acid (K3EDTA); and a tube with lithium heparin (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Arterial blood samples for determination of SpO₂ were taken from the radial artery.

Plasma sample for biochemical analyses was obtained by centrifugation of lithium heparin anticoagulated sample at 1800 × *g* for 10 min. All routine analyses were performed within 1 h of receiving the samples at the laboratory, and the remaining plasma samples were immediately aliquoted and stored at −80 °C until analyses.

2.4. Methods

Haemoglobin concentration, RTC number, IRF, and RET-He were measured on the haematology analyser Sysmex XN-1000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). Plasma concentration of CRP, creatinine, iron, UIBC, ferritin, and IL-6 was measured by standard laboratory methods on a Roche Cobas 6000 analyser (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Since IL-6 concentration was below the reported range in some individuals, a nominal level of half of the lower limit of quantification (LLQ) value (1.25 pg/mL) was used in the analysis in these individuals [34]. TIBC and TSAT were calculated by the following equations: TIBC = iron (μmol/L) + UIBC (μmol/L); TSAT (%) = iron (μmol/L)/TIBC (μmol/L) × 100. eGFR was calculated according to the CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) equation. sTfR concentration was measured nephelometrically on a BN ProSpec analyser (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany). All parameters were determined at the University Hospital of Split (Split, Croatia) except hepcidin and EPO, which were measured at the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry (Zagreb, Croatia). Hepcidin and EPO concentrations were determined by commercially available ELISA tests: Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA (DRG Diagnostics GmbH, Marburg, Germany); and Quantikine® IVD® Human Erythropoietin ELISA (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) according to manufacturers' instructions. SpO₂ was measured by an oximetric method on an ABL90 analyser FLEX PLUS (Radiometer, Copenhagen, Denmark).

2.5. Statistical Analysis

All data were tested for normality of distribution with Shapiro–Wilk test. Depending on the data distribution, results were presented as mean ± standard deviation for data showing normal distribution, otherwise as median with Q1–Q3 range. Age was shown as median with minimum and maximum. Categorical variables were presented as an absolute number *N*. A comparison of categorical variables between two groups was performed by Fisher's exact test and between three groups by Chi-squared test. The difference between the two groups was tested using a *t*-test or Mann–Whitney test. Differences between more than two groups were tested using a one-way ANOVA analysis of variance or the Kruskal–Wallis test with post hoc testing. Univariate and multivariate logistic regression analyses were performed. Data were considered significant if *p* < 0.05. Data analysis was performed using the MedCalc statistical software version 20.013 (MedCalc Software, Ostend, Belgium).

3. Results

The research included 96 COVID-19 patients and 47 age- and sex-matched healthy subjects. Patients with COVID-19 disease were classified as normoxic or hypoxic on

admission to the emergency unit based on their SpO₂ values. Baseline characteristics of healthy volunteers and COVID-19 patients on admission are presented in Table 1.

Table 1. Baseline patient characteristics.

	Healthy Subjects (<i>n</i> = 47)	Total COVID-19 Patients (<i>n</i> = 96)	Normoxic COVID-19 Patients (<i>n</i> = 49)	Hypoxic COVID-19 Patients (<i>n</i> = 47)	P ₁	P ₂	P ₃
age (years)	58 (39–70)	54 (36–73)	53 (36–73)	55 (37–72)	0.19	0.17	0.18
sex							
male, <i>n</i>	31	64	31	33	1.00	0.77	0.52
female, <i>n</i>	16	32	18	14			
SpO ₂ (%)	/	96 (88–98)	97 (97–98)	87 (83–89)	/	/	<0.001
creatinine (μmol/L)	77 ± 12	79 ± 14	80 ± 15	78 ± 14	0.29	0.46	0.48
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	91 (80–99)	87 (77–101)	86 (78–99)	88 (77–102)	0.52	0.70	0.61
symptoms duration on admission (days), <i>n</i>	/	8 ± 3	8 ± 3	9 ± 3	/	/	0.001

SpO₂, oxygen saturation. eGFR, estimated glomerular filtration rate. P₁—statistical significance of differences between healthy subjects and total COVID-19 patients. P₂—statistical significance of differences between healthy subjects, normoxic COVID-19 patients and hypoxic COVID-19 patients; post hoc analysis was performed. P₃—statistical significance of differences between normoxic and hypoxic COVID-19 patients. Age was presented as median with minimum and maximum, while sex was presented as absolute number *n*. SpO₂ and eGFR were presented as median with Q1–Q3 range and creatinine concentration and symptoms duration on admission as mean ± standard deviation. Data were considered significant if *p* < 0.05.

Hypertension was the most common comorbidity in all study groups, occurring in 15/47 hypoxic COVID-19 patients, 7/49 normoxic COVID-19 patients, and 14/47 healthy individuals. The incidence of diabetes mellitus was low in our study participants, with 2/47 in the hypoxic group, 4/49 in the normoxic group, and 6/47 in the control group. Out of a total of 96 COVID-19 patients, 53 were hospitalised upon admission to the emergency unit. Those included all hypoxic patients with a median hospitalisation duration of 9 (7–18) days and six normoxic patients with a median hospitalisation duration of 4 (3–5) days. Nineteen hypoxic patients, all with critical disease severity, subsequently required mechanical ventilation, and only six of them died. Additionally, there was no statistically significant difference in the concentration of creatinine and eGFR among the studied groups (*p* = 0.46 and *p* = 0.70, respectively).

The clinical manifestation data of patients with COVID-19 on admission are presented in Table 2.

In order to investigate a potential disturbance in hepcidin expression in COVID-19 patients and the influence of factors that might affect it, we measured hepcidin concentration in peripheral blood as well as concentrations of iron metabolism parameters, parameters reflecting erythropoietic activity, and parameters of systemic inflammation.

Hepcidin concentrations were significantly higher in both normoxic [44.50 (23.49–56.54) ng/mL] and hypoxic [76.95 (54.14–91.28) ng/mL] groups of COVID-19 patients compared to healthy controls [8.38 (5.74–12.06) ng/mL] (*p* < 0.001), with the highest values in the hypoxic group (Figure 1a). Similarly, ferritin was also significantly increased in COVID-19 patients, especially in those with hypoxia (Figure 1b).

Table 2. The clinical manifestations of patients with COVID-19 on admission.

Clinical Manifestations	Normoxic COVID-19 Patients (n = 49)	Hypoxic COVID-19 Patients (n = 47)
fever before admission	47 (96)	46 (98)
fever on admission	28 (57)	35 (74)
cough	35 (71)	36 (77)
sore throat	9 (18)	8 (17)
dyspnea	0 (0)	35 (74)
fatigue	19 (39)	32 (68)
myalgia	18 (37)	17 (36)
pneumonia on X-ray imaging	16 (33)	47 (100)

The results are presented as absolute number *n* (percentage, %).

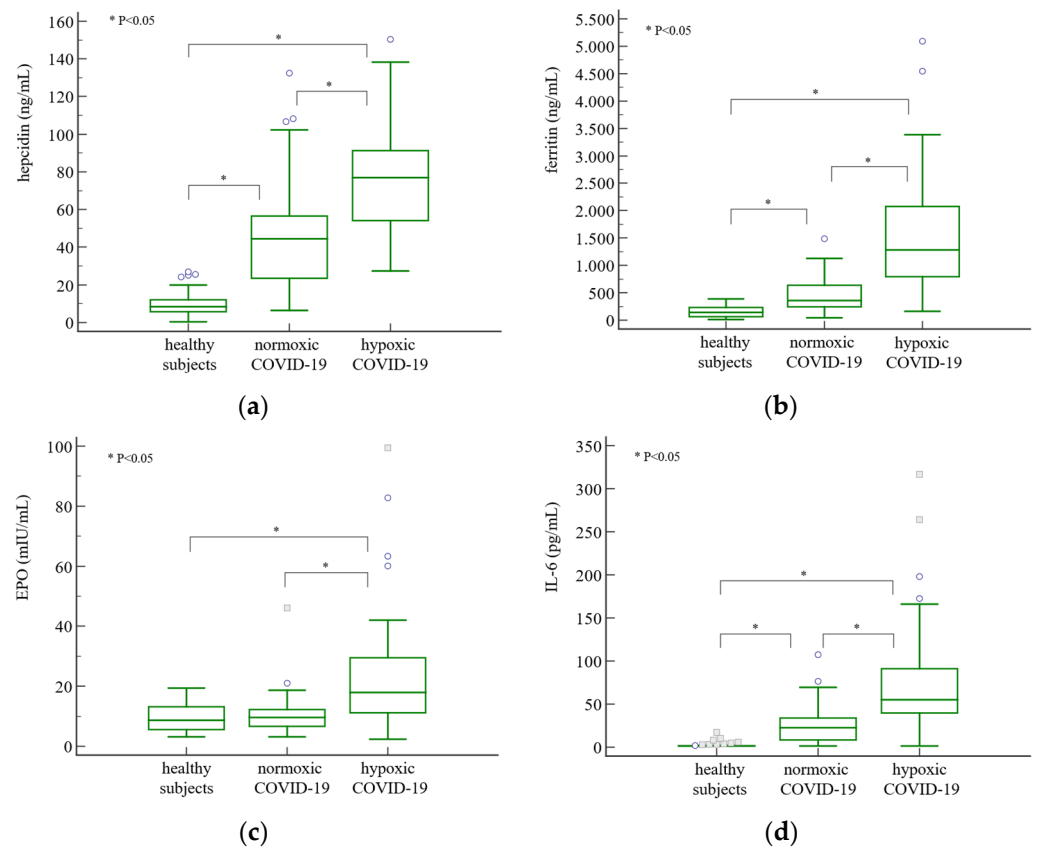


Figure 1. Hepcidin (a), ferritin (b), EPO (c), and IL-6 (d) plasma concentrations in healthy subjects and in normoxic and hypoxic COVID-19 patients. Results are shown as the median with Q1–Q3 range. The difference between groups was tested using the Kruskal–Wallis test with post hoc analysis (Conover). Connectors on the graphs show between which groups a statistically significant difference was observed in post hoc analysis with $p < 0.05$. EPO, erythropoietin; IL-6, interleukin 6.

Iron, TIBC, TSAT, RET-He, RTC, and IRF were decreased, and sTfR was higher in both normoxic and hypoxic patients compared to healthy individuals, while UIBC and TIBC were lower, and IRF was higher in the hypoxic group compared to the normoxic group (Table 3). EPO was increased only in the hypoxic group compared to controls and normoxic patients (Figure 1c).

Table 3. Parameters of iron homeostasis, erythropoietic activity, and inflammation in total, normoxic and hypoxic COVID-19 patients, as well as in healthy subjects.

Parameter	Healthy Subjects (n = 47)	Total COVID-19 Patients (n = 96)	Normoxic COVID-19 Patients (n = 49)	Hypoxic COVID-19 Patients (n = 47)	P ₁	P ₂
haemoglobin (g/dL)	15.0 (13.7–15.4)	14.5 (13.5–15.4)	14.4 (13.5–15.6)	14.6 (13.6–15.4)	0.48	0.75
iron (µmol/L)	17.0 (13.3–21.0)	6.0 (5.0–8.5)	6.0 (5.0–8.3) ^a	5.0 (4.3–8.8) ^a	<0.001	<0.001
UIBC (µmol/L)	42 (35–49)	39 (32–45)	44 (37–47)	33 (29–40) ^{a,b}	0.06	<0.001
TIBC (µmol/L)	59 (54–68)	46 (40–51)	50 (45–54) ^a	42 (37–46) ^{a,b}	<0.001	<0.001
TSAT (%)	28 (23–36)	13 (10–18)	12 (10–16) ^a	15 (10–20) ^a	<0.001	<0.001
sTfR (mg/L)	1.09 (1.00–1.25)	1.26 (1.07–1.45)	1.30 (1.12–1.49) ^a	1.23 (1.02–1.41) ^a	0.002	0.002
RET-He (pg)	33.0 (32.4–33.7)	30.1 (28.6–31.5)	30.2 (28.8–31.0) ^a	30.1 (28.4–31.9) ^a	<0.001	<0.001
RTC (‰)	13.20 (11.70–15.58)	5.25 (4.40–6.85)	5.00 (4.18–6.98) ^a	5.30 (4.43–6.80) ^a	<0.001	<0.001
RTC (×10 ⁹ /L)	67.60 (56.05–82.05)	26.10 (20.90–34.80)	25.60 (19.45–35.05) ^a	26.20 (21.80–34.63) ^a	<0.001	<0.001
IRF (%)	8.9 (7.5–10.3)	4.6 (3.4–7.9)	3.6 (3.0–4.9) ^a	6.2 (4.1–10.7) ^{a,b}	<0.001	<0.001
CRP (mg/L)	1.2 (0.7–2.3)	37.1 (12.7–100.0)	13.1 (5.2–33.2) ^a	85.5 (39.7–120.7) ^{a,b}	<0.001	<0.001
ferritin/hepcidin	15.17 (9.84–25.09)	13.55 (7.06–20.91)	7.72 (6.24–13.98) ^a	19.02 (12.98–29.64) ^b	0.10	<0.001
hepcidin/iron	0.49 (0.34–0.84)	10.24 (5.04–14.05)	7.37 (3.44–12.00) ^a	13.04 (8.06–16.04) ^{a,b}	<0.001	<0.001
hepcidin /CRP	7.14 (2.70–12.16)	1.67 (0.77–3.25)	2.58 (1.39–6.42) ^a	0.93 (0.53–1.80) ^{a,b}	<0.001	<0.001
hepcidin/IL-6	4.54 (2.50–7.02)	1.57 (1.00–2.45)	1.94 (1.42–3.69) ^a	1.33 (0.61–1.92) ^{a,b}	<0.001	<0.001
hepcidin/EPO	1.13 (0.57–2.14)	4.09 (2.32–7.60)	4.23 (2.36–7.81) ^a	4.08 (2.26–7.37) ^a	<0.001	<0.001

UIBC, unsaturated iron-binding capacity; TIBC, total iron-binding capacity; TSAT, transferrin saturation; sTfR, soluble transferrin receptors; RET-He, reticulocyte haemoglobin equivalent; RTC, reticulocytes; IRF, immature reticulocyte fraction; CRP, C-reactive protein; IL-6, interleukin 6; EPO, erythropoietin. P₁—statistical significance of differences between healthy subjects and total COVID-19 patients. P₂—statistical significance of differences between healthy subjects, normoxic COVID-19 patients and hypoxic COVID-19 patients; afterwards, post hoc analysis was performed. ^a statistically significant difference between normoxic or hypoxic COVID-19 patients and healthy subjects. ^b statistically significant difference between normoxic and hypoxic COVID-19 patients. Results are presented as median with Q1–Q3 range. Data were considered significant if *p* < 0.05.

Both CRP and IL-6 were higher in patients with COVID-19 disease, especially in those with hypoxia (Table 3 and Figure 1d). Finally, values for ferritin/hepcidin and hepcidin/iron ratios were elevated, while values for hepcidin/CRP and hepcidin/IL-6 ratios were lower in the hypoxic compared to the normoxic group (Table 3).

Later on, patients infected with SARS-CoV-2 were also classified by disease severity based on following up their medical history. Only two patients with hypoxia were classified

in the mild and moderate group ($n = 49$), while 26 of 28 patients in the severe group were hypoxic, and all 19 patients in the critical group were hypoxic on admission.

Hepcidin concentrations were significantly increased in patients with mild and moderate [44.25 (23.49–54.97) ng/mL], severe [75.95 (54.40–90.91) ng/mL], and critical disease course compared to healthy subjects ($p < 0.001$) and were higher in severe and critical patients compared with patients in mild and moderate COVID-19 groups (Figure 2a). Concentrations of ferritin were also the highest in severe and critical patients (Figure 2b), as well as concentrations of EPO (Figure 2c), IL-6 (Figure 1d), and CRP (Table 4) compared to patients with mild or moderate disease severities.

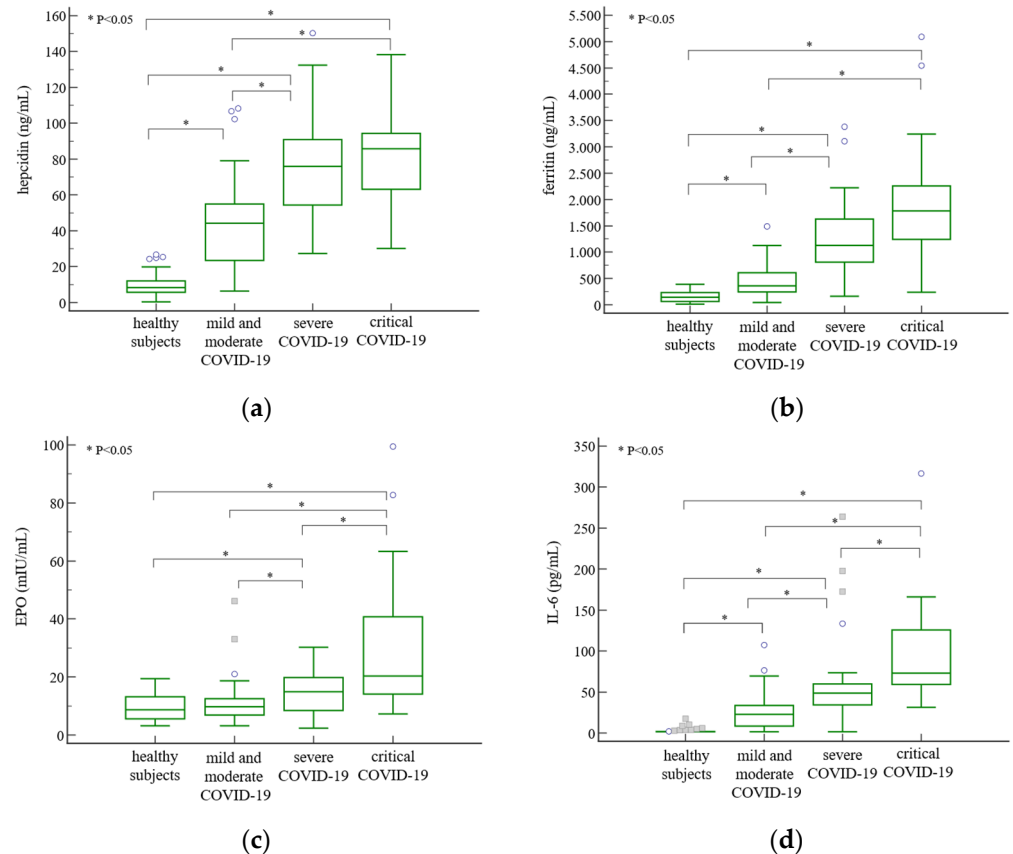


Figure 2. Hepcidin (a), ferritin (b), EPO (c), and IL-6 (d) plasma concentrations in healthy subjects and in COVID-19 patients subdivided by disease severity by prospective follow-up. Results are shown as the median with Q1–Q3 range. The difference between groups was tested using the Kruskal–Wallis test with post hoc analysis (Conover). Connectors on the graphs show between which groups a statistically significant difference was observed in post hoc analysis with $p < 0.05$. EPO, erythropoietin; IL-6, interleukin 6.

No significant differences between disease severity groups were observed for iron concentration, TSAT, sTfR, RET-He, and RTC. UIBC, TIBC, hepcidin/CRP, and hepcidin/IL-6 were lower, and IRF, ferritin/hepcidin, and hepcidin/iron were higher in severe and critical COVID-19 than in mild and moderate COVID-19 (Table 4). Only EPO, IL-6, and hepcidin/EPO differentiated patients with critical COVID-19 from those with severe disease course.

Table 4. Parameters of iron homeostasis, erythropoietic activity and inflammation in healthy subjects and COVID-19 patients subdivided prospectively by disease severity into groups of mild and moderate, severe, and critical COVID-19 disease.

Parameter	Healthy Subjects (n = 47)	Mild and Moderate COVID-19 (n = 49)	Severe COVID-19 (n = 28)	Critical COVID-19 (n = 19)	p
haemoglobin (g/dL)	15.0 (13.7–15.4)	14.3 (13.4–15.6)	14.5 (13.8–15.4)	14.7 (13.6–15.2)	0.87
iron (µmol/L)	17.0 (13.3–21.0)	6.0 (5.0–8.0) ^a	6.0 (5.0–9.0) ^a	5.0 (4.3–8.8) ^a	<0.001
UIBC (µmol/L)	42 (35–49)	44 (36–47)	34 (29–39) ^{a,b}	33 (29–41) ^{a,b}	<0.001
TIBC (µmol/L)	59 (54–68)	49 (44–53) ^a	43 (38–47) ^{a,b}	41 (37–47) ^{a,b}	<0.001
TSAT (%)	28 (23–36)	12 (10–15) ^a	15 (11–19) ^a	16 (10–21) ^a	<0.001
sTfR (mg/L)	1.09 (1.00–1.25)	1.29 (1.12–1.48) ^a	1.23 (1.06–1.45) ^a	1.23 (1.01–1.40)	0.010
RET-He (pg)	33.0 (32.4–33.7)	30.2 (28.6–31.0) ^a	30.1 (28.5–31.8) ^a	30.1 (28.7–31.6) ^a	<0.001
RTC (‰)	13.20 (11.70–15.58)	5.20 (4.18–6.98) ^a	5.45 (4.50–6.80) ^a	4.90 (4.40–6.63) ^a	<0.001
RTC (×10 ⁹ /L)	67.60 (56.05–82.05)	25.60 (19.45–35.58) ^a	26.75 (22.05–35.05) ^a	26.10 (20.90–33.38) ^a	<0.001
IRF (%)	8.9 (7.5–10.3)	3.6 (3.1–5.4) ^a	6.5 (4.4–11.0) ^{a,b}	4.9 (3.5–10.0) ^{a,b}	<0.001
CRP (mg/L)	1.2 (0.7–2.3)	14.3 (5.2–35.2) ^a	84.0 (38.1–120.7) ^{a,b}	86.7 (42.1–129.9) ^{a,b}	<0.001
ferritin/hepcidin	15.17 (9.84–25.09)	7.72 (6.26–14.19) ^a	16.78 (11.94–24.23) ^b	23.16 (13.83–33.23) ^b	<0.001
hepcidin/iron	0.49 (0.34–0.84)	7.37 (3.44–12.00) ^a	12.40 (8.08–15.50) ^{a,b}	13.04 (9.86–16.92) ^{a,b}	<0.001
hepcidin /CRP	7.14 (2.70–12.16)	2.49 (1.34–6.42) ^a	1.03 (0.61–1.76) ^{a,b}	0.87 (0.43–1.98) ^{a,b}	<0.001
hepcidin/IL-6	4.54 (2.50–7.02)	1.85 (1.33–3.27) ^a	1.47 (0.75–2.07) ^{a,b}	1.39 (0.59–1.64) ^{a,b}	<0.001
hepcidin/EPO	1.13 (0.57–2.14)	4.07 (2.13–6.89) ^a	5.40 (3.21–7.86) ^a	3.29 (1.51–6.42) ^{a,c}	<0.001

UIBC, unsaturated iron-binding capacity; TIBC, total iron-binding capacity; TSAT, transferrin saturation; sTfR, soluble transferrin receptors; RET-He, reticulocyte haemoglobin equivalent; RTC, reticulocytes; IRF, immature reticulocyte fraction; CRP, C-reactive protein; IL-6, interleukin 6; EPO, erythropoietin. *p*—statistical significance of differences between healthy subjects and COVID-19 patients with different disease severity; afterwards, post hoc analysis was performed. ^a statistically significant difference between mild and moderate, severe, or critical COVID-19 patients and healthy subjects. ^b statistically significant difference between severe or critical and mild and moderate COVID-19 patients. ^c statistically significant difference between severe and critical COVID-19 patients. Results are presented as median with Q1–Q3 range. Data were considered significant if *p* < 0.05.

Next, predictive values of investigated parameters for critical COVID-19 disease were assessed by univariate logistic regression analysis (Table 5). Hepcidin, ferritin, EPO, CRP, IL-6, ferritin/hepcidin, and hepcidin/iron appear to be predictors of the risk for critical disease severity, while UIBC and TIBC have reduced odds.

Table 5. Univariate logistic regression analysis of parameters of iron homeostasis, erythropoietic activity, and inflammation.

Parameter	Odds for Critical COVID-19		p
	OR	95% CI	
haemoglobin (g/L)	1.01	0.97–1.05	0.73
hepcidin (ng/mL)	1.03	1.01–1.05	0.004 *
iron (µmol/L)	0.96	0.83–1.11	0.58
UIBC (µmol/L)	0.92	0.86–0.99	0.028 *
TIBC (µmol/L)	0.91	0.85–0.98	0.013 *
TSAT (%)	1.01	0.95–1.08	0.69
ferritin (ng/mL)	1.00	1.00–1.00	<0.001 *
sTfR (mg/L)	0.93	0.16–5.50	0.94
RET-He (pg)	1.03	0.80–1.33	0.82
RTC (‰)	1.02	0.87–1.21	0.78
RTC (×10 ⁹ /L)	1.01	0.98–1.04	0.54
IRF (%)	1.07	0.97–1.18	0.16
EPO (mIU/mL)	1.10	1.04–1.16	<0.001 *
CRP (mg/L)	1.01	1.00–1.03	0.005 *
IL-6 (pg/mL)	1.02	1.01–1.03	0.001 *
ferritin/hepcidin	1.08	1.03–1.13	0.001 *
hepcidin/iron	1.07	1.00–1.15	0.037 *
hepcidin /CRP	0.80	0.61–1.06	0.12
hepcidin/IL-6	0.63	0.37–1.08	0.10
hepcidin/EPO	0.94	0.83–1.07	0.34

OR, odds ratio; CI, confidence interval; UIBC, unsaturated iron-binding capacity; TIBC, total iron-binding capacity; TSAT, transferrin saturation; sTfR, soluble transferrin receptors; RET-He, reticulocyte haemoglobin equivalent; RTC, reticulocytes; IRF, immature reticulocyte fraction; EPO, erythropoietin; CRP, C-reactive protein; IL-6, interleukin 6. * statistically significant results.

Finally, we performed a multivariate logistic regression analysis, and we tested the multiparameter model that included the best predictors of the risk for critical COVID-19 (Table 6).

Table 6. Multiparameter model assessed by multivariable logistic regression analysis.

Parameter	Odds for Critical COVID-19		p
	OR	95% CI	
EPO	1.10	1.04–1.16	<0.001
ferritin/hepcidin	1.08	1.02–1.14	0.004

The analysis gave results with 88% of correctly classified cases and AUC of 0.838 (0.749–0.905).

OR, odds ratio; CI, confidence interval; EPO, erythropoietin. Data were considered significant if $p < 0.05$.

4. Discussion

This study assessed the influence of hypoxia, inflammation, and erythropoietic activity on hepcidin and other iron homeostasis-related parameters in COVID-19 patients. In addition, in an attempt to identify representative surrogates that could detect dysregulation of iron homeostasis as well as differentiate between various disease subgroups, we included combinations of parameters (ratios) that might take advantage of the relationships between different phenomena (iron status, inflammation, erythropoiesis).

The ratio between hepcidin and ferritin was used in only two studies that compared COVID-19 patients with patients with other infectious and non-infectious conditions, and those studies recruited only 40 COVID-19 patients in total [35,36]. In addition, ferritin-to-hepcidin or hepcidin-to-ferritin ratios were used to investigate other diseases as well [37–39]. Regarding hepcidin/iron and hepcidin/EPO ratios, they have not been explored in COVID-19 so far but in some other diseases [39–42]. Hepcidin/CRP was applied in only one study with subjects infected with SARS-CoV-2 [36]. We also introduced for the first time hepcidin/IL-6, as IL-6 is the main cytokine inducer of hepcidin expression, and we wanted to test this ratio and compare it to hepcidin/CRP in the context of normalisation of hepcidin concentration with existing inflammation.

Our results show that hepcidin, as well as ferritin, IRF, EPO, CRP, IL-6, ferritin/hepcidin, and hepcidin/iron, were significantly increased, while UIBC, TIBC, hepcidin/CRP, and hepcidin/IL-6 were significantly decreased in hypoxic compared to normoxic patients as well as in patients with severe or critical disease compared to those with mild and moderate COVID-19. In addition, EPO, IL-6, and hepcidin/EPO ratio were able to differentiate subjects with critical and severe disease courses.

Our results are in line with previously reported studies, which found elevated hepcidin concentration in COVID-19 patients. In the study of Zhou et al. [23], hepcidin and ferritin concentrations were higher in severe than mild group, and authors suggested that they could be, therefore, used as markers of disease severity. However, no information was available on the degree of hypoxemia in these patient groups, and they did not measure CRP or IL-6 inflammatory markers. In a prospective study by Chakurkar et al. [15], concentrations of hepcidin, ferritin, and CRP, yet not IL-6, were dependent on disease severity and were the highest in severe compared to mild and moderate COVID-19 groups. In addition, baseline levels of hepcidin and ferritin were found to be associated with negative outcomes of disease, such as in-hospital mortality and the need for mechanical ventilation and kidney replacement therapy. In the study of Nai et al. [22], hepcidin showed a positive correlation with CRP and a negative correlation with the severity of respiratory failure as reflected by the $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio, and hepcidin was proposed as a predictor of mortality of critical patients in the intensive care unit. Similarly to our results, they also found that hepcidin and CRP concentrations were higher in the hypoxemic group ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ mm Hg) compared to the normoxemic group ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 > 300$ mm Hg); however, IL-6 level did not differ between those two groups.

Lower hepcidin concentration was reported in critically ill COVID-19 patients than in healthy controls [26]. In the same research, lower concentrations of EPO in critical and deceased patients were found, and the critical patient group had significantly lower haemoglobin values than other study groups. No information about inflammatory markers was provided. The authors proposed that low hepcidin concentration could be explained by the hepcidin mimetic action of the SARS-CoV-2 virus that could cause suppression of hepcidin expression in the liver. This theory is based on sequence similarity between the hepcidin molecule and the SARS-CoV-2 spike glycoprotein cytoplasmic tail, which was found in structural models [43]. Contrary to our results, in a study by Maira et al. [44] involving hospitalised COVID-19 patients, when patients were categorised by severity of hypoxemia on admission ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 150$ mmHg vs. $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \geq 150$ mmHg), no difference in hepcidin and EPO was observed between groups at admission to the ward or after 7 days of hospitalisation, although the hypoxemic group had a higher level of inflammatory markers. The authors stated that the possible reason for the inadequate rise in EPO could be due to the inflammatory inhibition of EPO production by kidneys. In conclusion, the authors suggested that hypoxic stimuli suppressed the effect of the inflammatory signal on hepcidin expression and led to lower hepcidin values in patients with a higher disease burden. It is also worth mentioning that a large proportion of study participants was anaemic.

The design of studies might have a significant effect on the results obtained. A possible reason for lower hepcidin levels could also be the presence of anaemia. In our study,

all anaemic patients were excluded to eliminate the possible effect of pre-existing iron deficiency and anaemia on hepcidin expression since our aim was to study only the simultaneous effects of inflammation and hypoxemia caused by respiratory failure. Therefore, in the hypoxic group of patients, the effect of inflammation on hepcidin level might be somewhat attenuated by the simultaneous presence of hypoxia as an opposing signal.

In that light, we aimed to express the hepcidin level relative to the level of inflammation by calculating the ratio of hepcidin with IL-6 as the main proinflammatory cytokine involved in the direct stimulation of hepcidin expression. We suggest this ratio may be applied in diseases and/or conditions where inflammation is present and not in those without inflammation accompanied by synthesis of IL-6 (e.g., in healthy subjects). In our study, the hepcidin/IL-6 ratio was lower in the hypoxic than in the normoxic group, as well as in severe and critical COVID-19 (where all patients except two were hypoxic), which could further indicate that hepcidin level was not proportional to the level of inflammation in the hypoxic patient group probably due to downregulating effect of hypoxia. When IL-6 was replaced with CRP as a routinely measured inflammatory marker, the same result was obtained with the hepcidin/CRP ratio.

In our hypoxic group of patients, a significantly higher concentration of EPO was found, which reflects the normal response to hypoxia. Nevertheless, no simultaneous reduction in hepcidin level was observed. Studies on animal models have shown that erythropoiesis itself, rather than EPO alone, is needed to suppress hepcidin expression [45]. In our study groups, erythropoietic activity was equally suppressed in both hypoxic and normoxic patients compared to healthy subjects, as shown by lower reticulocyte numbers. More pronounced inflammation observed in the hypoxic group might have led to an inadequate EPO response, consequently resulting in the absence of an increase in reticulocyte count. Since we did not measure erythroferrone concentration, we cannot speculate whether the rise in EPO concentration was followed by an adequate rise in the concentration of this hormone. During maturation, reticulocytes gradually lose their RNA and become RNA-free cells, while a small proportion of reticulocytes containing higher levels of RNA represent IRF. IRF is proposed to be a marker of erythropoiesis acceleration since immature reticulocytes become more prevalent when red cell production increases, and an increase in IRF typically occurs several days before the rise in RTC count as a quantitative measure of erythropoiesis [46]. In our study, we observed decreased IRF values in COVID-19 patient groups compared to healthy controls. Interestingly, despite this decrease, values were higher in hypoxic compared to normoxic COVID-19 patients. This observation suggests a potential counteracting effect of EPO on erythropoietic activity already compromised by the presence of severe inflammation.

Moreover, given the nature of our study, information regarding the duration of hypoxia in our patients is unknown, which could be one of the reasons why suppression in hepcidin level was not observed. The time delay in hepcidin suppression following exposure to hypoxia highlights the significance of indirect mechanisms in mediating hepcidin expression under hypoxic conditions. In a study conducted on healthy volunteers exposed to acute and chronic high-altitude conditions, a rapid increase in EPO concentration was noted. However, suppression of hepcidin began a few hours after initial exposure to acute hypoxia and reached its lowest points during the following week of high-altitude exposure [28]. Likewise, in a study on healthy volunteers, hepcidin suppression was observed 24 h after EPO administration [47]. Studies on animal models with experimentally induced anaemia have indicated that suppression of hepcidin expression is dependent on erythropoiesis and not directly mediated by hypoxia, anaemia, or EPO [48].

In our study, high ferritin concentration was found in all COVID-19 patients, with significantly higher values in the hypoxic compared to the normoxic group. High ferritin concentration was also found in severe and critical COVID-19 compared to mild and moderate COVID-19 groups. Higher ferritin concentration in more severe COVID-19 disease was confirmed in a number of studies [23,26,49]. High ferritin concentration is considered to be not only a marker of disease but also a prognostic factor in COVID-19

disease [15]. In a study by Sonnweber and colleagues [17], ferritin concentration was elevated even 2 months after critical COVID-19 and was associated with persisting lung pathologies and decreased physical performance. Ferritin concentration increases as a result of cellular iron accumulation influenced by the effects of hepcidin [30]. In addition, both hepcidin and ferritin are not only regulated by iron status but are significantly influenced by inflammatory stimuli [2,5]. In our study, ferritin concentration positively correlated with hepcidin concentration, as already observed in COVID-19 patients [35]. Therefore, we applied the ferritin/hepcidin ratio to simultaneously follow their dynamics in different COVID-19 contexts (regarding oxygen saturation and disease severity). This ratio was increased in hypoxic compared to normoxic patients as well as in patients with severe and critical compared to mild and moderate diseases.

In this research, in order to evaluate the predictive potential of examined parameters, we performed univariate logistic regression analysis. This analysis indicated increased odds for critical COVID-19 severity for hepcidin, ferritin, EPO, CRP, IL-6, ferritin/hepcidin, and hepcidin/iron, while UIBC and TIBC had the OR of less than 1.

Next, we performed a multivariable logistic regression analysis that included only parameters that showed to be the best predictors for the risk of developing critical disease. The combination of EPO and ferritin/hepcidin ratio showed very good diagnostic performances and correctly classified 88% of cases, with an AUC of 0.838 (0.749–0.906). Implementation of EPO and ferritin/hepcidin in clinical practice might help to identify on-admission COVID-19 patients who are at risk of developing critical forms of disease.

The limitation of our study was the unstandardised time of blood withdrawal, which was inevitable because samples were taken immediately upon admission to the emergency unit, and this could influence concentrations of some parameters with diurnal variation. However, we also consider this to be one of the strengths of our study because samples taken on admission provide us with real concentrations of the investigated parameters before the introduction of oxygen therapy and other interventions or in-hospital complications, which could confound our results. Despite the majority of samples being collected during the prevalence of the Delta genotype of the SARS-CoV-2 virus, we believe that this should not impact the study results. Our focus was not on immune mechanisms but rather on using COVID-19 as a model of disease where hypoxia and inflammation coexist as opposing factors influencing hepcidin concentration.

5. Conclusions

To the best of our knowledge, this is the first study that investigated the simultaneous presence of inflammation and hypoxia in non-anaemic COVID-19 patients selected based on rigorous exclusion criteria in order to eliminate comorbidities and conditions that might influence concentrations of the studied parameters. In addition, hepcidin/iron and hepcidin/EPO ratios have not been previously explored in patients with SARS-CoV-2 infection, and we also introduced the hepcidin/IL-6 ratio to observe, at the same time, hepcidin concentration normalised for the level of inflammation. We can conclude that the hypoxic signal in our group of patients was not strong enough to overcome the stimulating effect of inflammation on hepcidin expression. These results imply that hepcidin targeting could be a promising therapeutic option worth exploring in order to affect the iron metabolism in these patients.

Author Contributions: Conceptualization, K.G. and L.T.; formal analysis, K.G. and G.J.; investigation, K.G., L.T. and L.R.; resources, L.T.; data curation, K.G.; writing—original draft preparation, K.G.; writing—review and editing, L.T., L.R., G.J. and M.P.I.; visualisation, K.G., L.T. and L.R.; supervision, L.T. and L.R.; project administration, L.T.; funding acquisition, L.T. and L.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported, in part, by the project FarmInova (KK.01.1.1.02.0021), funded by the European Regional Development Fund.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Split (Split, Croatia) (approval protocol number: 2181-147/01/06/M.S.-21-02; approval date: 28 May 2021) and Ethics Committee for Experimentation of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry (Zagreb, Croatia) (approval protocol number: 251-62-03-23-58; approval date: 24 October 2023).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in this study.

Data Availability Statement: Data are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of this study, the collection, analyses, or interpretation of data, the writing of this manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- De Domenico, I.; Ward, D.M.; Langelier, C.; Vaughn, M.B.; Nemeth, E.; Sundquist, W.I.; Ganz, T.; Musci, G.; Kaplan, J. The Molecular Mechanism of Heparin-Mediated Ferroportin Down-Regulation. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 2569–2578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ganz, T.; Nemeth, E. Heparin and Iron Homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Res.* **2012**, *1823*, 1434–1443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nemeth, E.; Tuttle, M.S.; Powelson, J.; Vaughn, M.B.; Donovan, A.; Ward, D.M.; Ganz, T.; Kaplan, J. Heparin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. *Science* **2004**, *306*, 2090–2093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vogt, A.-C.S.; Arsiwala, T.; Mohsen, M.; Vogel, M.; Manolova, V.; Bachmann, M.F. On Iron Metabolism and Its Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Weiss, G. Iron and Immunity: A Double-Edged Sword. *Eur. J. Clin. Investig.* **2002**, *32* (Suppl. S1), 70–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Schaible, U.E.; Kaufmann, S.H.E. Iron and Microbial Infection. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 946–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zhang, A.-S.; Enns, C.A. Molecular Mechanisms of Normal Iron Homeostasis. *Hematology* **2009**, *2009*, 207–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sangkhae, V.; Nemeth, E. Regulation of the Iron Homeostatic Hormone Heparin. *Adv. Nutr.* **2017**, *8*, 126–136. [[CrossRef](#)]
- Hennigar, S.R.; McClung, J.P. Nutritional Immunity: Starving Pathogens of Trace Minerals. *Am. J. Lifestyle Med.* **2016**, *10*, 170–173. [[CrossRef](#)]
- Shah, M.D.; Sumeh, A.S.; Sheraz, M.; Kavitha, M.S.; Venmathi Maran, B.A.; Rodrigues, K.F. A Mini-Review on the Impact of COVID 19 on Vital Organs. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *143*, 112158. [[CrossRef](#)]
- Molina-Mora, J.A.; González, A.; Jiménez-Morgan, S.; Cordero-Laurent, E.; Brenes, H.; Soto-Garita, C.; Sequeira-Soto, J.; Duarte-Martínez, F. Clinical Profiles at the Time of Diagnosis of SARS-CoV-2 Infection in Costa Rica during the Pre-Vaccination Period Using a Machine Learning Approach. *Phenomics* **2022**, *2*, 312–322. [[CrossRef](#)]
- Xie, J.; Covassin, N.; Fan, Z.; Singh, P.; Gao, W.; Li, G.; Kara, T.; Somers, V.K. Association between Hypoxemia and Mortality in Patients with COVID-19. *Mayo Clin. Proc.* **2020**, *95*, 1138–1147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gustine, J.N.; Jones, D. Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19. *Am. J. Pathol.* **2021**, *191*, 4–17. [[CrossRef](#)]
- Armitage, A.E.; Stacey, A.R.; Giannoulatou, E.; Marshall, E.; Sturges, P.; Chatha, K.; Smith, N.M.G.; Huang, X.; Xu, X.; Pasricha, S.-R.; et al. Distinct Patterns of Heparin and Iron Regulation during HIV-1, HBV, and HCV Infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 12187–12192. [[CrossRef](#)]
- Chakurkar, V.; Rajapurkar, M.; Lele, S.; Mukhopadhyay, B.; Lobo, V.; Injarapu, R.; Sheikh, M.; Dholu, B.; Ghosh, A.; Jha, V. Increased Serum Catalytic Iron May Mediate Tissue Injury and Death in Patients with COVID-19. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 19618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hippchen, T.; Altamura, S.; Muckenthaler, M.U.; Merle, U. Hypoferremia Is Associated with Increased Hospitalization and Oxygen Demand in COVID-19 Patients. *HemaSphere* **2020**, *4*, e492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sonnweber, T.; Boehm, A.; Sahanic, S.; Pizzini, A.; Aichner, M.; Sonnweber, B.; Kurz, K.; Koppelstätter, S.; Haschka, D.; Petzer, V.; et al. Persisting Alterations of Iron Homeostasis in COVID-19 Are Associated with Non-Resolving Lung Pathologies and Poor Patients' Performance: A Prospective Observational Cohort Study. *Respir. Res.* **2020**, *21*, 276. [[CrossRef](#)]
- Sukhomlin, T. Heparin Is a Friend Rather than a Foe in COVID19-Induced Complications. *Acta Biomed. Atenei Parm.* **2020**, *91*, e2020138. [[CrossRef](#)]
- Suriawinata, E.; Mehta, K.J. Iron and Iron-Related Proteins in COVID-19. *Clin. Exp. Med.* **2022**, *23*, 969–991. [[CrossRef](#)]
- Nemeth, E.; Rivera, S.; Gabayan, V.; Keller, C.; Taudorf, S.; Pedersen, B.K.; Ganz, T. IL-6 Mediates Hypoferremia of Inflammation by Inducing the Synthesis of the Iron Regulatory Hormone Heparin. *J. Clin. Investig.* **2004**, *113*, 1271–1276. [[CrossRef](#)]
- Huang, H.; Constante, M.; Layoun, A.; Santos, M.M. Contribution of STAT3 and SMAD4 Pathways to the Regulation of Heparin by Opposing Stimuli. *Blood* **2009**, *113*, 3593–3599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nai, A.; Lorè, N.I.; Pagani, A.; De Lorenzo, R.; Di Modica, S.; Saliu, F.; Cirillo, D.M.; Rovere-Querini, P.; Manfredi, A.A.; Silvestri, L. Heparin Levels Predict COVID-19 Severity and Mortality in a Cohort of Hospitalized Italian Patients. *Am. J. Hematol.* **2021**, *96*, E32–E35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Zhou, C.; Chen, Y.; Ji, Y.; He, X.; Xue, D. Increased Serum Levels of Hepcidin and Ferritin Are Associated with Severity of COVID-19. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2020**, *26*, e926178-1–e926178-6. [CrossRef] [PubMed]
24. Al-Janabi, G.; Al-Fahham, A.; Alsaedi, A.N.N.; Al-Amery, A.Y.K. Correlation between hepcidin and procalcitonin and their diagnostic role in patients with COVID-19. *Wiad. Lek.* **2023**, *76*, 65–70. [CrossRef] [PubMed]
25. Bayraktar, N.; Bayraktar, M.; Ozturk, A.; Ibrahim, B. Evaluation of the Relationship Between Aquaporin-1, Hepcidin, Zinc, Copper, and Iron Levels and Oxidative Stress in the Serum of Critically Ill Patients with COVID-19. *Biol. Trace Elem. Res.* **2022**, *200*, 5013–5021. [CrossRef] [PubMed]
26. Yağcı, S.; Serin, E.; Acicbe, Ö.; Zeren, M.İ.; Odabaşı, M.S. The Relationship between Serum Erythropoietin, Hepcidin, and Haptoglobin Levels with Disease Severity and Other Biochemical Values in Patients with COVID-19. *Int. J. Lab. Hematol.* **2021**, *43*, 142–151. [CrossRef] [PubMed]
27. Ciotti, M.; Nucetelli, M.; Pieri, M.; Petrangeli, C.M.; Giovannelli, A.; Cosio, T.; Rosa, L.; Valenti, P.; Leonardi, F.; Legramante, J.M.; et al. Evaluation of Hepcidin Level in COVID-19 Patients Admitted to the Intensive Care Unit. *Diagnostics* **2022**, *12*, 2665. [CrossRef]
28. Piperno, A.; Galimberti, S.; Mariani, R.; Pelucchi, S.; Ravasi, G.; Lombardi, C.; Bilo, G.; Revera, M.; Giuliano, A.; Faini, A.; et al. Modulation of Hepcidin Production during Hypoxia-Induced Erythropoiesis in Humans In Vivo: Data from the HIGHCARE Project. *Blood* **2011**, *117*, 2953–2959. [CrossRef]
29. Goetze, O.; Schmitt, J.; Spliethoff, K.; Theurl, I.; Weiss, G.; Swinkels, D.W.; Tjalsma, H.; Maggiorini, M.; Krayenbühl, P.; Rau, M.; et al. Adaptation of Iron Transport and Metabolism to Acute High-Altitude Hypoxia in Mountaineers. *Hepatology* **2013**, *58*, 2153–2162. [CrossRef]
30. Ganz, T.; Nemeth, E. Iron Balance and the Role of Hepcidin in Chronic Kidney Disease. *Semin. Nephrol.* **2016**, *36*, 87–93. [CrossRef]
31. Kowdley, K.V.; Gochanour, E.M.; Sundaram, V.; Shah, R.A.; Handa, P. Hepcidin Signaling in Health and Disease: Ironing Out the Details. *Hepatol. Commun.* **2021**, *5*, 723–735. [CrossRef] [PubMed]
32. Coffey, R.; Ganz, T. Erythroferrone: An Erythroid Regulator of Hepcidin and Iron Metabolism. *HemaSphere* **2018**, *2*, e35. [CrossRef] [PubMed]
33. Living Guidance for Clinical Management of COVID-19. Available online: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-2> (accessed on 29 August 2023).
34. Agustí, A.; Edwards, L.D.; Rennard, S.I.; MacNee, W.; Tal-Singer, R.; Miller, B.E.; Vestbo, J.; Lomas, D.A.; Calverley, P.M.A.; Wouters, E.; et al. Persistent Systemic Inflammation Is Associated with Poor Clinical Outcomes in COPD: A Novel Phenotype. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e37483. [CrossRef] [PubMed]
35. Hortová-Kohoutková, M.; Skotáková, M.; Onyango, I.G.; Slezáková, M.; Panovský, R.; Opatřil, L.; Slanina, P.; De Zuani, M.; Mrkva, O.; Andrejčinová, I.; et al. Hepcidin and Ferritin Levels as Markers of Immune Cell Activation during Septic Shock, Severe COVID-19 and Sterile Inflammation. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1110540. [CrossRef] [PubMed]
36. Hegelund, M.H.; Glenthøj, A.; Rysør, C.K.; Ritz, C.; Dungu, A.M.; Sejdic, A.; List, K.C.K.; Krogh-Madsen, R.; Lindegaard, B.; Kurtzhals, J.A.L.; et al. Biomarkers for Iron Metabolism among Patients Hospitalized with Community-Acquired Pneumonia Caused by Infection with SARS-CoV-2, Bacteria, and Influenza. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **2022**, *130*, 590–596. [CrossRef] [PubMed]
37. Elbostany, E.A.; Elghoroury, E.A.; Thabet, E.H.; Rashad, A.A.; Rasheed, E.A.; El-Saeed, G.S.M.; Abdelhalim, D.A.; Abdelfattah, S.N.; Salama, I.I.; Salama, N. Oxidative Stress and Hepcidin Expression in Pediatric Sickle Cell Anemia with Iron Overload. *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.* **2023**, *16*, 238–244. [CrossRef] [PubMed]
38. Luque-Ramírez, M.; Álvarez-Blasco, F.; Alpañés, M.; Escobar-Morreale, H.F. Role of Decreased Circulating Hepcidin Concentrations in the Iron Excess of Women with the Polycystic Ovary Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, 846–852. [CrossRef] [PubMed]
39. Heeney, M.M.; Guo, D.; De Falco, L.; Campagna, D.R.; Olbina, G.; Kao, P.P.-C.; Schmitz-Abe, K.; Rahimov, F.; Gutschow, P.; Westerman, K.; et al. Normalizing Hepcidin Predicts TMPRSS6 Mutation Status in Patients with Chronic Iron Deficiency. *Blood* **2018**, *132*, 448–452. [CrossRef] [PubMed]
40. Korenaga, M.; Nishina, S.; Korenaga, K.; Tomiyama, Y.; Yoshioka, N.; Hara, Y.; Sasaki, Y.; Shimonaka, Y.; Hino, K. Branched-Chain Amino Acids Reduce Hepatic Iron Accumulation and Oxidative Stress in Hepatitis C Virus Polyprotein-Expressing Mice. *Liver Int.* **2015**, *35*, 1303–1314. [CrossRef]
41. Evanchuk, J.L.; Kozyrskyj, A.; Hanas, N.; Goruk, S.; Vaghef-Mehrabani, E.; Archundia-Herrera, C.M.; O'Brien, K.O.; Letourneau, N.L.Z.; Giesbrecht, G.F.; Bell, R.C.; et al. Maternal Iron Status Is Dynamic Throughout Pregnancy and Might Predict Birth Outcomes in a Sex Dependent Manner: Results from the Alberta Pregnancy Outcomes and Nutrition (APrON) Cohort Study. *J. Nutr.* **2023**, *153*, 2585–2597. [CrossRef]
42. Wei, S.; Liu, W.; Qi, Y.; Guo, Y.; Zhang, S.; Wang, L.; Zhuang, T.; Zhang, N.; Liu, S. Disordered Serum Erythroferrone and Hepcidin Levels as Indicators of the Spontaneous Abortion Occurrence during Early Pregnancy in Humans. *Br. J. Haematol.* **2021**, *192*, 643–651. [CrossRef] [PubMed]
43. Ehsani, S. COVID-19 and Iron Dysregulation: Distant Sequence Similarity between Hepcidin and the Novel Coronavirus Spike Glycoprotein. *Biol. Direct* **2020**, *15*, 19. [CrossRef] [PubMed]

44. Maira, D.; Duca, L.; Busti, F.; Consonni, D.; Salvatici, M.; Vianello, A.; Milani, A.; Guzzardella, A.; Di Pierro, E.; Aliberti, S.; et al. The Role of Hypoxia and Inflammation in the Regulation of Iron Metabolism and Erythropoiesis in COVID-19: The IRONCOVID Study. *Am. J. Hematol.* **2022**, *97*, 1404–1412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Pasricha, S.-R.; McHugh, K.; Drakesmith, H. Regulation of Hepcidin by Erythropoiesis: The Story So Far. *Annu. Rev. Nutr.* **2016**, *36*, 417–434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Buttarello, M. Laboratory Diagnosis of Anemia: Are the Old and New Red Cell Parameters Useful in Classification and Treatment, How? *Int. J. Lab. Hematol.* **2016**, *38* (Suppl. S1), 123–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ashby, D.R.; Gale, D.P.; Busbridge, M.; Murphy, K.G.; Duncan, N.D.; Cairns, T.D.; Taube, D.H.; Bloom, S.R.; Tam, F.W.K.; Chapman, R.; et al. Erythropoietin Administration in Humans Causes a Marked and Prolonged Reduction in Circulating Hepcidin. *Haematologica* **2010**, *95*, 505–508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Pak, M.; Lopez, M.A.; Gabayan, V.; Ganz, T.; Rivera, S. Suppression of Hepcidin during Anemia Requires Erythropoietic Activity. *Blood* **2006**, *108*, 3730–3735. [[CrossRef](#)]
49. Ahmed, S.; Ahmed, Z.A.; Siddiqui, I.; Rashid, N.H.; Mansoor, M.; Jafri, L. Evaluation of Serum Ferritin for Prediction of Severity and Mortality in COVID-19—A Cross Sectional Study. *Ann. Med. Surg.* **2021**, *63*, 102163. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article

Effects of Moderate Consumption of Red Wine on Hepcidin Levels in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

Jurica Nazlić¹, Diana Jurić^{2,*}, Ivana Mudnić², Zvonimir Boban³, Ana Marija Dželalija², Leida Tandara^{4,5}, Daniela Šupe-Domić^{4,6}, Katarina Gugo⁴ and Mladen Boban²

¹ Department of Intensive Medicine and Clinical Pharmacology, University Hospital of Split, Šoltanska 1, 21000 Split, Croatia; jnazlic@gmail.com

² Department of Pharmacology, University of Split School of Medicine, Šoltanska 2, 21000 Split, Croatia; ivana.mudnic@mefst.hr (I.M.); ana.marija.dzelalija@mefst.hr (A.M.D.); mladen.boban@mefst.hr (M.B.)

³ Department of Medical Physics and Biophysics, University of Split School of Medicine, Šoltanska 2, 21000 Split, Croatia; zvonimir.boban@mefst.hr

⁴ Department of Medical Laboratory Diagnostics, University Hospital of Split, Šoltanska 1, 21000 Split, Croatia; leida.tandara@gmail.com (L.T.); daniela.supe.domic@ozs.unist.hr (D.Š.-D.); katarina.gugo@gmail.com (K.G.)

⁵ Department of Medical Chemistry and Biochemistry, University of Split School of Medicine, Šoltanska 2, 21000 Split, Croatia

⁶ University Department of Health Studies, University of Split, Ruđera Boškovića 35, 21000 Split, Croatia

* Correspondence: diana.juric@mefst.hr; Tel.: +385-981699321



Citation: Nazlić, J.; Jurić, D.; Mudnić, I.; Boban, Z.; Dželalija, A.M.; Tandara, L.; Šupe-Domić, D.; Gugo, K.; Boban, M. Effects of Moderate Consumption of Red Wine on Hepcidin Levels in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Foods* **2022**, *11*, 1881. <https://doi.org/10.3390/foods11131881>

Academic Editors: Irena Budić-Leto and Gajdoš Kljusurić Jasenka

Received: 17 May 2022

Accepted: 21 June 2022

Published: 25 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Iron overload is often associated with type 2 diabetes (T2D), indicating that hepcidin, the master regulator of iron homeostasis, might be involved in diabetes pathogenesis. Alcohol consumption may also result in increased body iron stores. However, the moderate consumption of wine with meals might be beneficial in T2D. This effect has been mainly attributed to both the ethanol and the polyphenolic compounds in wine. Therefore, we examined the effects of red wine on hepcidin in T2D patients and non-diabetic controls. The diabetic patients ($n = 18$) and age- and BMI-matched apparently healthy controls ($n = 13$) were men, aged 40–65 years, non-smoking, with BMI < 35 kg/m². Following a 2-week alcohol-free period, both groups consumed 300 mL of red wine for 3 weeks. The blood samples for the iron status analysis were taken at the end of each period. The red wine intake resulted in a decrease in serum hepcidin in both the diabetic subjects ($p = 0.045$) and controls ($p = 0.001$). The levels of serum ferritin also decreased after wine in both groups, reaching statistical significance only in the control subjects ($p = 0.017$). No significant alterations in serum iron, transferrin saturation, or soluble transferrin receptors were found. The suppression of hepcidin, a crucial iron-regulatory hormone and acute-phase protein, in T2D patients and healthy controls, is a novel biological effect of red wine. This may deepen our understanding of the mechanisms of the cardiometabolic effects of wine in T2D.

Keywords: type 2 diabetes; red wine; alternative-complementary therapy; iron; hepcidin; serum ferritin

1. Introduction

Diabetes is a growing global health emergency, with a prevalence in the adult population estimated to be 10.5% in 2021 worldwide [1]. Evidence associating iron overload with insulin resistance and type 2 diabetes mellitus (T2D) implies the potential role of hepcidin, the iron-regulatory hormone, in the etiopathogenesis of T2D [2]. This 25-amino-acid peptide is predominantly secreted by hepatocytes, in response to iron burden and inflammation [3,4]. Hepcidin reduces iron bioavailability by triggering the internalization and degradation of ferroportin, the only iron exporter identified so far [5]. When iron efflux from absorptive enterocytes, macrophages, and hepatocytes is repressed, serum iron levels are decreased and intracellular sequestration is enhanced [5,6]. Since iron is essential for living but also potentially toxic, its amount is precisely regulated at both cellular and

systemic levels [7]. DNA synthesis and repair, oxygen transport, and cellular respiration are all vital processes demanding iron [8]. However, excess labile cell iron can catalyze the generation of reactive oxygen species (ROS) via the Fenton reaction, causing oxidative tissue damage [9,10]. If pancreatic islet β -cells are affected, insulin secretion could be impaired, and the risk of insulin resistance increased [11,12].

Hepcidin is classified as a type II acute-phase protein [3], with IL-6 being the most dominant inducer of its production [13]. In various inflammatory states, hepcidin is found to be elevated, with the potential to cause anemia or inflammation [6]. Type 2 diabetes is typically associated with chronic low-grade inflammation [14,15], and acute-phase serum protein elevation [14,16]. However, the kinetics of hepcidin in patients with type 2 diabetes remain unclear. Recently published meta-analyses and systematic reviews found no difference [11,17] or only a slight increase in hepcidin in T2D patients compared to controls [18]. However, these inconsistent findings could be partially explained by the use of different and non-standardized assays, as well as a variable consideration of factors that may influence hepcidin expression.

It has been indicated that different food ingredients, including alcohol [19–21], might affect hepcidin expression and its levels in serum. On the other hand, the moderate consumption of wine, an important component of the Mediterranean diet [22], has been proven by both observational and interventional trials to reduce cardiometabolic risk and the incidence of type 2 diabetes [23–27]. These beneficial effects have been attributed to both ethanol and polyphenolic compounds [28], which are abundantly present in red wine.

The effect of red wine on serum hepcidin levels in humans is practically unknown. Therefore, the aim of our study was to examine the effects of the moderate consumption of red wine on hepcidin levels in patients with type 2 diabetes mellitus and their non-diabetic controls.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design

Recruitment of participants was conducted through the family medicine practices in the city of Split (Croatia) and within the Department of Endocrinology at the University Hospital of Split during their outpatient visit. Inclusion criteria for both control subjects and patients with type 2 diabetes were the following: (1) males, (2) aged between 40 and 65 years, (3) non-severely obese (BMI < 35 kg/m²), (4) non-smokers, and (5) willing to give consent and carry out all study-related procedures.

In addition, control subjects were matched for age and BMI with T2D subjects, in good general health, as determined by screening medical history and clinical examination, and with fasting plasma glucose \leq 6.9 mmol/L [29]. Diabetic subjects were eligible if they had controlled glycemia (HbA1c value \leq 7.5% (58 mmol/mol)), received treatment with metformin alone or in combination with other oral antidiabetics.

Both control and diabetic subjects were excluded in cases of: (1) atherosclerotic cardiovascular disease or venous thromboembolism in their medical history, (2) current evidence of acute or chronic inflammatory or infective disease, (3) liver disease, (4) malignancy, (5) dysregulation of iron homeostasis (anemia or hereditary hemochromatosis), (6) previous alcohol or substance abuse, and (7) introduction of new pharmacological agent during the study period.

After a drive-in period of 2 weeks, in which consumption of any alcoholic beverage was prohibited, subjects in both groups started to drink 300 mL of red wine daily for 3 weeks (Figure 1). This amount had to be split between lunch and dinner and consumed during meals [30]. At the end of the drive-in period, the participants were provided with 9 standard wine bottles of 750 mL. The participants were instructed to maintain their eating and lifestyle habits, including physical activity, during both the drive-in and intervention period. A total of 31 participants completed the study protocol: 18 with type 2 diabetes mellitus and 13 control subjects.

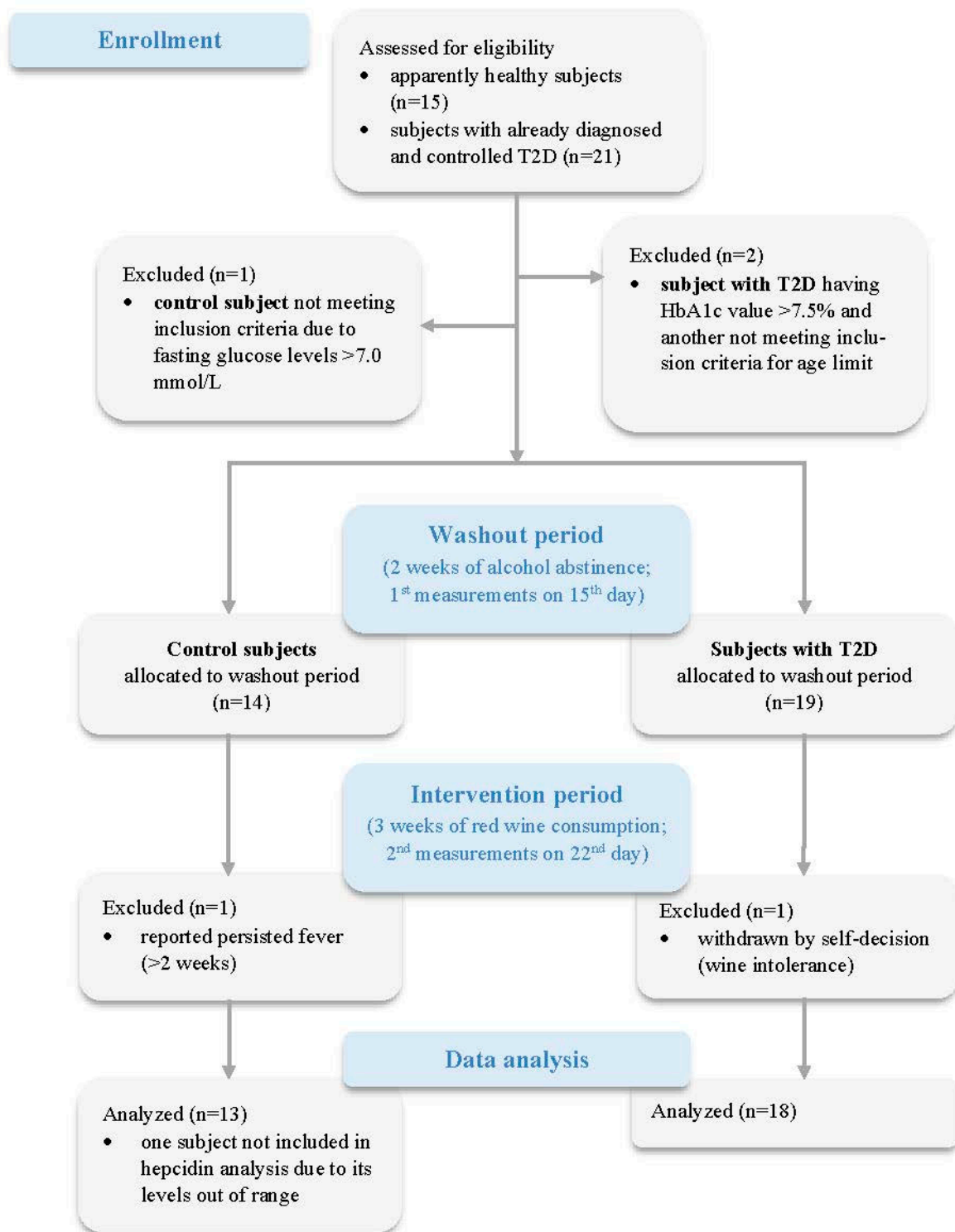


Figure 1. CONSORT flow diagram showing the recruitment processes and study protocol.

2.2. Wine Intervention

Red wine was produced from the Croatian autochthonous red cultivar Plavac mali (*Vitis vinifera* L.) at the Volarević winery, Croatia, 2016. Basic oenological parameters of the used wine are shown in Table S1. Because the composition of phenolic compounds may influence biological effects of wine [31], the results of the analysis of wine used in our study are provided in Table S2.

2.3. Anthropometric Assessments and Blood Sampling

At the end of the drive-in and intervention period, participants' weight, height, and body circumferences were measured. Body mass index (BMI) was calculated as the ratio of weight and the square of height (kg/m^2). Fasting blood samples were obtained early in the morning and, depending on the type of laboratory parameter, were analyzed the same day or stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ for later analysis. In order to prevent the possible influence of diurnal fluctuations in serum hepcidin level, blood collection time was standardized [32]. Three types of vacutainers were used: (1) with K3EDTA, to determine the complete blood count and HbA1c, (2) with fluoride/EDTA, to estimate fasting plasma glucose concentration, and (3) with silica (clot activator)/gel, to separate serum required for the analysis of liver function, inflammation, and serum-based indicators of iron status (UIBC, TIBC, iron, hepcidin, ferritin, soluble transferrin receptors) and glycemic control (fructosamine). Levels of soluble transferrin receptors (sTfR), which reflect the availability of functional iron, were measured using a nephelometric method on a BN ProSpec analyzer (Siemens, ProSpec, Erlangen, Germany). Serum hepcidin was quantified according to the manufacturers' instructions in a commercially available competitive ELISA kit (Hepcidin 25 (bioactive) HS, DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany). All measurements were performed in the Laboratory for Experimental Pharmacology at the University of Split School of Medicine and the Department of Medical Laboratory Diagnostics at the University Hospital of Split.

2.4. Statistical Analysis

The data were presented as a mean \pm standard deviation (SD) or a median with 95% confidence interval (CI), depending on the data distribution; the normality of distribution was checked using the Shapiro–Wilk test. The significance of differences was assessed using the t-test for normally distributed data or the Mann–Whitney test for deviations from normality. Welch's correction was used if the assumption of homogeneity of variance was violated. Pearson correlation coefficient was calculated to evaluate the relationship between the BMI value and hepcidin level change. *p*-values less than 0.05 were considered statistically significant. The R programming language for statistical computing version 4.0.2 was used for all statistical analyses.

2.5. Ethics Approval

This study complied with the Declaration of Helsinki and its amendments, and was approved by the Ethics Committee of the University of Split School of Medicine, Croatia (no. 2181-198-03-04-13-0042). All subjects gave written informed consent to the sample collection, analysis, and use of the data for publication.

3. Results

General characteristics of all participants, along with glucose levels and metabolic parameters related to liver function and the grade of inflammation at the baseline, are shown in Table 1. The mean age of the participants was 52.8 ± 6.3 years, and there was no significant difference between the groups ($p = 0.075$). Subjects with type 2 diabetes and control subjects were also comparable regarding the weight, height, BMI value, waist, and hip circumference.

As expected, T2D subjects showed higher fasting glucose levels in comparison to controls ($p < 0.0001$). Average values of hepatic function parameters, including liver enzymes, albumin, and total bilirubin, were within the reference range in both groups. Similarly, the groups did not differ in hsCRP levels ($p = 0.317$, Table 1).

Hematological and biochemical markers of iron status in the diabetic and control group, at the baseline and post-intervention, are presented in Table 2.

After 3 weeks of red wine consumption, a significant decrease in hepcidin levels occurred within both groups ($p = 0.045$ and $p = 0.001$ for control and diabetic group, respectively, Table 2, Figure 2). No significant linear relationship between BMI and hepcidin change was observed (Pearson's $r = 0.382$, $p = 0.220$ for C; $r = 0.037$, $p = 0.883$ for diabetic

subjects). The decline in serum hepcidin was not mirrored in serum iron, since its levels were not altered following the wine consumption within both groups ($p = 0.328$ and $p = 0.177$ for control and diabetic group, respectively, Table 2). Furthermore, the other standard Fe-related parameters remained largely unchanged after the intervention, except for the ferritin in the control group.

Table 1. Anthropometrical and biochemical data of participants with type 2 diabetes mellitus and control subjects at the baseline.

Parameter	Control Group ($n = 13$)	T2D Group ($n = 18$)	p -Value
Age (years)	50.5 \pm 5.9	54.6 \pm 6.2	0.075
Age at T2D onset (years)	N/A	50.6 \pm 6.7	N/A
Weight (kg)	100.3 (84.7–105.5)	98.5 (87.2–107.0)	0.617
Height (cm)	186.8 \pm 5.6	184.5 \pm 10.1	0.427
Waist circumference (cm)	106.0 (95.8–109.5)	107.0 (98.8–112.4)	0.458
Hip circumference (cm)	108.0 \pm 5.6	105.0 \pm 7.5	0.237
Upper arm circumference (cm)	35.2 \pm 2.9	32.2 \pm 3.4	0.015
Neck circumference (cm)	42.0 (40.3–44.0)	38.5 (37.0–41.2)	0.051
BMI (kg/m ²)	27.2 \pm 2.7	29.8 \pm 4.1	0.062
Fasting glucose (mmol/L)	5.3 \pm 0.4	7.5 \pm 1.4	<0.0001
AST (IU/L)	27.1 \pm 7.1	22.1 \pm 4.9	0.029
ALT (IU/L)	25.0 (19.5–39.2)	25.5 (16.4–29.6)	0.674
GGT (IU/L)	28.0 (23.5–43.7)	25.5 (20.0–32.2)	0.307
Albumin (g/L)	45.0 (45.0–46.0) *	43.0 (41.4–44.0)	0.002
Total bilirubin (μ mol/L)	13.8 \pm 4.0 †	12.4 \pm 4.6	0.388
Urates (μ mol/L)	328.9 \pm 43.8	359.6 \pm 81.2	0.188
hsCRP (mg/L)	1.3 (0.7–1.9)	1.5 (0.8–2.9)	0.317

Abbreviations: AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, gamma-glutamyl transferase; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; N/A, not applicable; T2D, type 2 diabetes. Normally distributed variables are presented as mean \pm SD, whilst non-normally distributed variables are presented as median with 95% CIs. * One control participant was excluded from the albumin analysis due to a lack of data for second measurement. † Two control participants were excluded from the total bilirubin analysis due to a lack of data for second measurement.

Table 2. Laboratory indicators of the iron status of participants with type 2 diabetes mellitus and control subjects and at pre- and post-intervention.

Laboratory Parameter	Control Group ($n = 13$)			T2D Group ($n = 18$)		
	After Drive-In	After Red Wine	p -Value	After Drive-In	After Red Wine	p -Value
RBC ($\times 10^{12}$ /L)	5.2 \pm 0.5	5.1 \pm 0.4	0.077	5.0 \pm 0.3	4.9 \pm 0.3	0.888
Hematocrit (L/L)	0.45 \pm 0.039	0.45 \pm 0.034	0.388	0.44 \pm 0.019	0.44 \pm 0.021	0.749
Hemoglobin (g/L)	154.2 \pm 12.6	153.0 \pm 10.6	0.348	151.4 \pm 6.2	151.5 \pm 6.5	0.969
RDW (%)	13.0 \pm 0.5	13.2 \pm 0.5	0.013	13.5 \pm 0.4	13.6 \pm 0.5	0.033
MCH (pg)	29.6 \pm 1.0	29.9 \pm 1.0	0.047	30.7 \pm 1.3	30.7 \pm 1.4	0.709
MCHC (g/L)	337.5 \pm 7.3	339.5 \pm 8.8	0.261	341.4 \pm 5.5	342.7 \pm 6.8	0.349

Table 2. Cont.

Laboratory Parameter	Control Group (n = 13)			T2D Group (n = 18)		
	After Drive-In	After Red Wine	p-Value	After Drive-In	After Red Wine	p-Value
MCV (fL)	87.1 (84.9–90.1)	87.2 (85.2–91.5)	0.675	89.8 ± 3.6	89.6 ± 3.5	0.495
Serum iron (µmol/L)	21.8 ± 7.1	19.6 ± 6.9	0.328	15.0 (13.8–18.7)	16.4 (14.6–20.9)	0.177
TIBC (µmol/L)	54.2 ± 9.3	53.8 ± 12.1	0.767	57.8 ± 7.2	58.2 ± 7.6	0.434
UIBC (µmol/L)	31.6 ± 11.6	34.2 ± 11.4	0.109	39.4 (37.5–45.5)	41.6 (36.8–46.5)	0.453
Transferrin saturation (%) *	40.6 ± 12.9	37.0 ± 11.3	0.307	26.7 (22.6–29.9)	29.3 (24.5–32.7)	0.265
sTfR (mg/L) †	1.20 ± 0.22	1.24 ± 0.25	0.734	1.05 ± 0.17	1.04 ± 0.20	0.830
Ferritin (ng/mL)	173.0 (126.4–259.8)	118.0 (90.5–232.6)	0.017	209.5 ± 141.5	198.8 ± 139.4	0.215
Hepcidin (ng/mL) ‡	30.0 ± 17.3	21.0 ± 12.1	0.045	17.9 (11.9–25.2)	13.2 (8.2–18.3)	0.001

Abbreviations: MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; RDW, red-cell distribution width; RBC, red blood cell; sTfR, soluble transferrin receptor; TIBC, total iron-binding capacity; T2D, type 2 diabetes; UIBC, unsaturated iron-binding capacity. Normally distributed variables are presented as mean ± SD, whilst non-normally distributed variables are presented as median with 95% CIs. * Transferrin saturation percentage calculated as $100 \times \text{serum iron}/\text{TIBC}$. † One control participant had undetectable levels of sTfR, and was thus excluded from the analysis. ‡ One control participant had undetectable levels of hepcidin, and was thus excluded from the analysis.

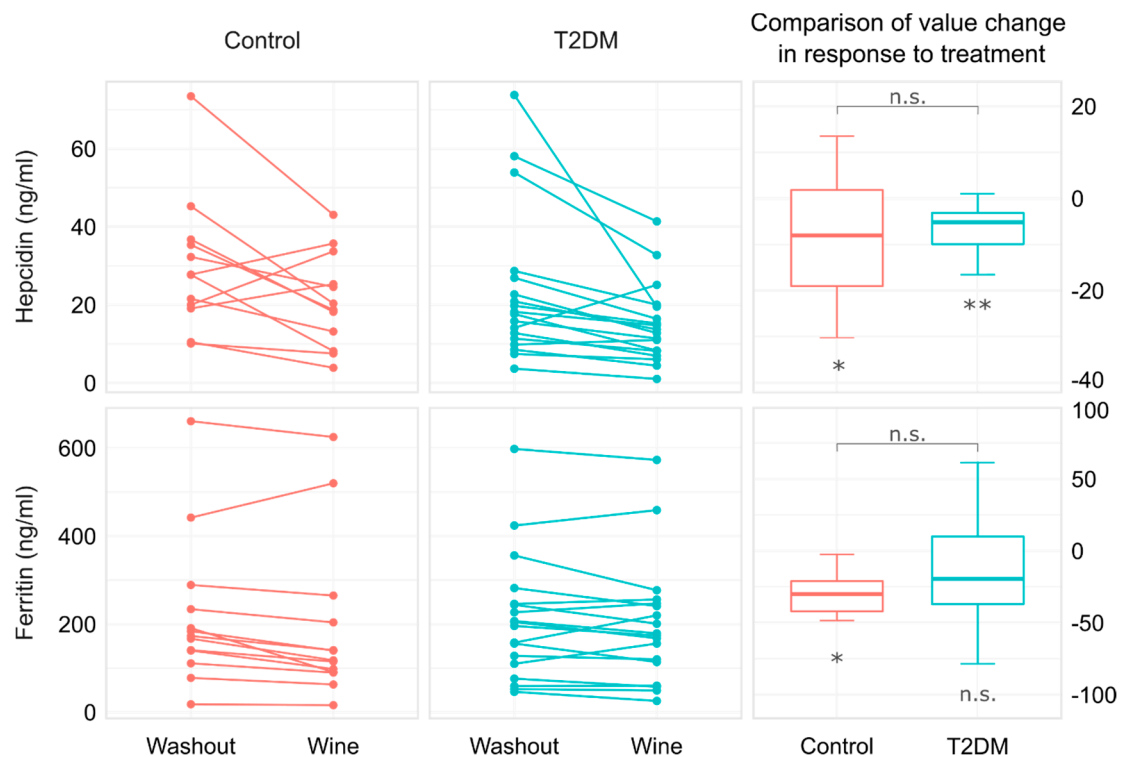


Figure 2. Value changes in hepcidin and ferritin in patients with type 2 diabetes and their age- and BMI-matched controls after 3-week moderate consumption of red wine. The abbreviation n.s. indicates $p > 0.05$, whilst symbols * and ** indicate $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

Along with the decrease in hepcidin, a significant decrease in serum ferritin was observed in the control subjects following the red wine intake ($p = 0.017$, Table 2, Figure 2). It should be noted that the hepcidin and ferritin showed the same pattern of change in the diabetic group as well, but in the diabetic patients, the ferritin values around the mean had a wider spread, and statistical significance was not reached.

Regarding the assessment of glycemic control in the diabetic subjects, neither fasting glucose (7.5 ± 1.4 vs. 7.3 ± 1.4 mmol/L, $p = 0.294$), nor HbA1c values (6.2 (5.9 to 6.7) vs. 6.4 (5.9 to 6.8) %, $p = 0.322$) were affected by the red wine intake. Moreover, the fructosamine levels, which better reflected the average blood glucose concentration over the previous 3 weeks, remained similar before and after intervention (289.0 (270.8 to 294.8) vs. 286.0 (273.0 to 294.8) $\mu\text{mol/L}$, $p = 0.524$). Glycemic control in the subjects with T2D was achieved with different antidiabetic treatment approaches, which are presented in Table S3. There was no statistical significance in the hepcidin changes in response to red wine consumption between the diabetic patients taking metformin only and those who took metformin in combination with other oral antidiabetics ($p = 0.062$, Figure 3).

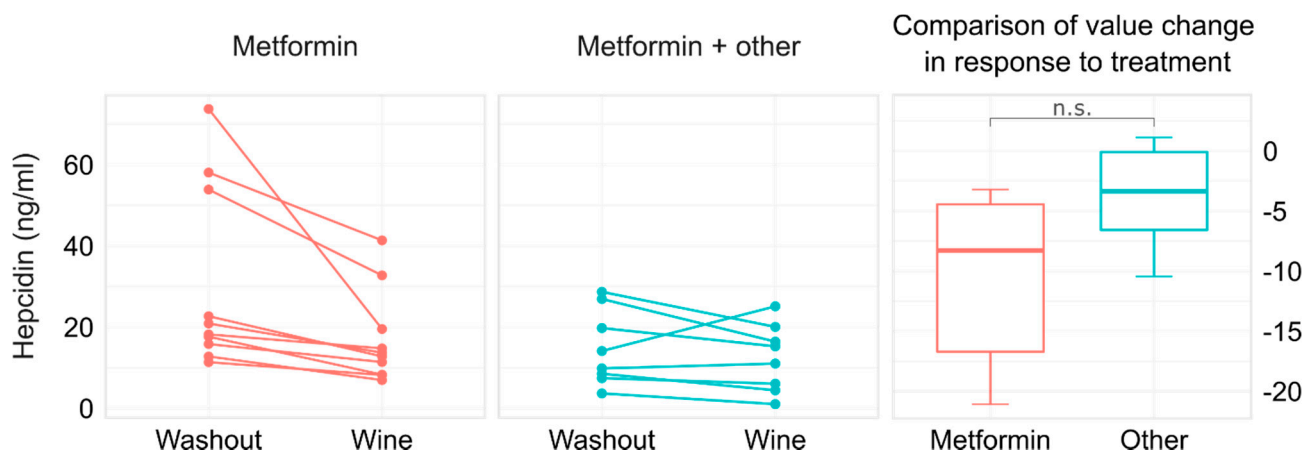


Figure 3. Value changes in hepcidin after 3-week moderate intake of red wine in the patients with type 2 diabetes taking only metformin ($n = 10$) and those taking metformin with other oral antidiabetic agents ($n = 8$). The abbreviation n.s. indicates $p > 0.05$.

4. Discussion

The key finding of our study is that a moderate consumption of red wine for 3 weeks is associated with a decrease in serum hepcidin levels in both apparently healthy and in type 2 diabetic patients. To the best of our knowledge, this is the first study to assess the effect of red wine consumption on hepcidin, the iron-regulatory hormone, in human subjects.

The effects of wine on iron status in general have been a matter of discussion. A population-based study showed that there is a dose-response relationship between the chronic daily intake of alcoholic beverages and body iron stores, as determined by serum iron, ferritin, and transferrin saturation (TS) [33]. The decrease in hepcidin levels demonstrated in our study is in line with the findings on the down-regulation of hepcidin expression in in vitro and in vivo models of ethanol ingestion [34–36]. As hepcidin falls, ferroportin-mediated iron transport is facilitated, resulting in an increased intestinal iron absorption and iron export from the storage cells. It has been hypothesized that the ethanol-mediated increase in intestinal iron uptake is responsible for elevated body iron indices [19]. However, the suppression of hepcidin levels observed in our study should not be attributed only to the ethanol. Rather, it should be interpreted in the context of the complex chemical composition of wine. Namely, wine phenolics have been shown to inhibit the absorption of dietary iron in the duodenum, presumably due to their iron-chelating ability [37]. Other regulatory pathways might be included as well. For example, the decreased expression of duodenal ferroportin was found in rats treated with quercetin, a well-known flavonoid [38]. In a study with human volunteers, polyphenol-rich red wine, similar to the wine used in our study, was 2- to 3-fold more potent at inhibiting iron absorption than white wine with low polyphenolic content and water [39]. Furthermore, the study indicated that the inhibitory effect on iron absorption could be enhanced if wine is taken with meals [39], which was the method of consumption in our study. Polyphenols were found to form a less soluble complex with iron in the presence of protein-digestion products [39,40]. However,

the understanding of the mechanisms of interaction between wine phenolics, ethanol, and iron homeostasis is still limited, and further studies are warranted. The impairment of intestinal iron absorption because of flavonoids and the facilitated export from storage cells due to hepcidin decrease could be an explanation for why changes in serum iron after wine were not found in our study. The other possibility might be that 3 weeks of wine consumption simply was not a sufficiently long period to result in potential changes in iron stores.

Despite the expected release of iron into circulation due to hepcidin decreases [41], we did not find an increase in transferrin saturation. Moreover, the TS in both groups was markedly below 70%, the most frequently considered threshold after which non-transferrin-bound iron (NTBI) could be detected [42]. This iron could induce ROS production and may be implicated in different pathologies, such as vasculotoxicity and atherosclerosis [43]. Hence, the moderate consumption of wine might play a role in maintaining the balance of hepcidin levels needed to prevent iron-induced oxidative stress.

A number of studies indicate that the health-promoting properties of wine in different pathological conditions may include the reduction in inflammation [44–46]. When interpreting the concomitant decrease in hepcidin and ferritin observed in our study, it is important to mention that both are regarded as acute-phase proteins, whose levels can rise due to various conditions. Some authors propose that ferritin arises in serum by leaking from damaged cells during inflammation [47]. Serum ferritin can also be elevated due to other pathophysiological components of T2D that are not directly related to iron overload [48], such as insulin resistance [49] and metabolic syndrome [50,51]. In our study, the mean levels of serum ferritin decreased after red wine consumption in both groups, with statistical significance reached only in the controls. This was probably due to the fact that the diabetic group was not large enough to compensate for the wider distribution of the ferritin values observed in the participants with T2D. The parallel decrease in serum hepcidin and ferritin described here is in accordance with other studies demonstrating a linear relationship between serum hepcidin and ferritin [6,41]. The increased export of iron may be associated with decreased ferritin production, which in turn results in decreased circulating ferritin [52]. However, since there is increasing evidence that serum ferritin is not an ideal indicator of body iron status, its serum levels should be cautiously interpreted [48,53,54]. As indicated by the concentration of soluble transferrin receptors (sTfR) [55], the cellular iron demands were unchanged in both groups following the red wine intake. In contrast to ferritin, circulating sTfR is considered a biochemical marker of iron status that is insensitive to inflammation [56].

It has been shown that obesity may also influence hepcidin levels [18,57,58]. Therefore, the participants in our study were matched regarding their BMI values. Our results indicated no correlation between BMI < 35 kg/m² and the hepcidin changes in either the control or the diabetic group. This is in line with the study by Vuppalanchi et al., who showed that elevated hepcidin levels were primarily observed in subjects with BMI ≥ 35 kg/m² [59]. Antidiabetic therapy could also influence the interrelation between iron metabolism and glucose homeostasis [18]. In the studies evaluating hepcidin levels in patients with T2D, information about their antidiabetic therapy is often insufficient [11,17,18]. It has been shown that metformin may suppress hepcidin production [60]. The potential influence of other oral antidiabetic agents on hepcidin levels is practically unexplored. Because we found no difference in hepcidin level changes between the diabetic patients who took metformin alone and those who took metformin in combination with other oral antidiabetics, it is suggestive that these drugs have no opposing effects on hepcidin. The fact that the hepcidin serum levels were also similarly reduced in the non-diabetic control subjects indicates that the hepcidin suppression was primarily mediated by the moderate intake of red wine.

5. Conclusions

In conclusion, our study provides experimental evidence of a novel biological effect of moderate red wine consumption that is present in both patients with type 2 diabetes and their apparently healthy controls. The understanding of the effects of red wine on hepcidin, a crucial regulator of iron metabolism and acute-phase protein, may deepen insights into and broaden the understanding of the mechanisms behind the cardiometabolic benefits of the moderate consumption of wine, particularly in diabetic patients. To bring required improvements in diabetes lifestyle guidelines another step closer, further studies assessing the long-term intake of red wine on hepcidin and iron status in larger samples are warranted.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/foods11131881/s1>. Table S1: Physicochemical properties of red wine Plavac mali. Table S2: Monomeric and oligomeric tannins (mg/L) in Plavac mali. Table S3: Antidiabetic pharmacotherapy used by 18 patients with type 2 diabetes mellitus who completed the study.

Author Contributions: J.N., I.M., L.T. and M.B. designed the study. J.N., D.J., I.M. and A.M.D. were involved in the organization of the study, including the recruitment of the participants, their follow-up, and ensuring their compliance with the study protocol, blood sampling, and anthropometric measurements. L.T., D.Š.-D. and K.G. conducted the required laboratory analyses. Z.B. undertook the statistical analyses and graphical presentation of the results. J.N. and D.J. wrote the initial draft of the paper, and M.B. critically revised the manuscript for important intellectual content. All the authors read and approved the submitted version. M.B. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the Croatian Science Foundation (“Biological effects of wine: the influence of vinification technology, dealcoholisation and aging of wine”) under project no. IP-2013-11-8652, with M.B. as the project leader. The funder had no role in the design of this study, its execution, the analyses, the interpretation of the data, or the decision to submit the results.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the University of Split School of Medicine, Croatia (no. 2181-198-03-04-13-0042, 6 December 2013).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could influence the work reported in this paper.

References

1. International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 10th ed. 2021. Available online: www.diabetesatlas.org (accessed on 23 February 2022).
2. Aregbesola, A.; Voutilainen, S.; Virtanen, J.K.; Aregbesola, A.; Tuomainen, T.P. Serum hepcidin concentrations and type 2 diabetes. *World J. Diabetes* **2015**, *6*, 978–982.
3. Nemeth, E.; Valore, E.V.; Territo, M.; Schiller, G.; Lichtenstein, A.; Ganz, T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* **2003**, *101*, 2461–2463.
4. Armitage, A.E.; Eddowes, L.A.; Gileadi, U.; Cole, S.; Spottiswoode, N.; Selvakumar, T.A.; Ho, L.P.; Townsend, A.R.; Drakesmith, H. Hepcidin regulation by innate immune and infectious stimuli. *Blood* **2011**, *118*, 4129–4139.
5. Nemeth, E.; Tuttle, M.S.; Powelson, J.; Vaughn, M.B.; Donovan, A.; Ward, D.M.V.; Ganz, T.; Kaplan, J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* **2004**, *306*, 2090–2093.
6. Ganz, T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* **2003**, *102*, 783–788.
7. Camaschella, C.; Nai, A.; Silvestri, L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. *Haematologica* **2020**, *105*, 260–272.
8. Abbaspour, N.; Hurrell, R.; Kelishadi, R. Review on iron and its importance for human health. *J. Res. Med. Sci.* **2014**, *19*, 164–174.

9. Kakhlon, O.; Cabantchik, Z.I. The labile iron pool: Characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33*, 1037–1046.
10. Cabantchik, Z.I. Labile iron in cells and body fluids: Physiology, pathology, and pharmacology. *Front. Pharmacol.* **2014**, *5*, 45.
11. Liu, J.F.; Li, Q.X.; Yang, Y.X.; Ma, L.H. Iron metabolism and type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis and systematic review. *J. Diabetes Investig.* **2020**, *11*, 946–955.
12. Lee, H.J.; Choi, J.S.; Lee, H.J.; Kim, W.H.; Park, S.I.; Song, J. Effect of excess iron on oxidative stress and gluconeogenesis through hepcidin during mitochondrial dysfunction. *J. Nutr. Biochem.* **2015**, *26*, 1414–1423.
13. Wrighting, D.M.; Andrews, N.C. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* **2006**, *108*, 3204–3209.
14. Donath, M.Y.; Shoelson, S.E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 98–107.
15. Sharif, S.; Van der Graaf, Y.; Cramer, M.J.; Kapelle, L.J.; de Borst, G.J.; Visseren, F.L.J.; Westerink, J.; SMART Study Group. Low-grade inflammation as a risk factor for cardiovascular events and all-cause mortality in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc. Diabetol.* **2021**, *20*, 220.
16. McMillan, D.E. Increased levels of acute-phase serum proteins in diabetes. *Metabolism* **1989**, *38*, 1042–1046.
17. Karamzad, N.; Eftekhari, A.; Ashrafi-Asgarabad, A.; Sullman, M.J.M.; Sahebkar, A.; Safiri, S. Serum hepcidin, the hepcidin/ferritin ratio and the risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Curr. Med. Chem.* **2021**, *28*, 1224–1233.
18. Ndehahoma, F.; Mukesi, M.; Dlodla, P.V.; Nkambule, B.B.; Nepolo, E.P.; Nyambuya, T.M. Body weight and its influence on hepcidin levels in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of clinical studies. *Heliyon* **2021**, *7*, e06429.
19. Harrison-Findik, D.D. Role of alcohol in the regulation of iron metabolism. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 4925–4930.
20. Milman, N.T. A review of nutrients and compounds, which promote or inhibit intestinal iron absorption: Making a platform for dietary measures that can reduce iron uptake in patients with genetic haemochromatosis. *J. Nutr. Metab.* **2020**, *2020*, 7373498.
21. Omena, J.; Curioni, C.; Cople-Rodrigues, C.D.; Citelli, M. The effect of food and nutrients on iron overload: What do we know so far? *Eur. J. Clin. Nutr.* **2021**, *75*, 1771–1780.
22. Eleftheriou, D.; Benetou, V.; Trichopoulou, A.; La Vecchia, C.; Bamia, C. Mediterranean diet and its components in relation to all-cause mortality: Meta-analysis. *Br. J. Nutr.* **2018**, *120*, 1081–1097.
23. Martin, M.A.; Goya, L.; Ramos, S. Protective effects of tea, red wine and cocoa in diabetes. Evidences from human studies. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *109*, 302–314.
24. Blomster, J.I.; Zoungas, S.; Chalmers, J.; Li, Q.; Chow, C.K.; Woodward, M.; Mancina, G.; Poulter, N.; Williams, B.; Harrap, S.; et al. The relationship between alcohol consumption and vascular complications and mortality in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **2014**, *37*, 1353–1359.
25. Gepner, Y.; Golan, R.; Harman-Boehm, I.; Henkin, Y.; Schwarzfuchs, D.; Shelef, I.; Durst, R.; Kovsan, J.; Bolotin, A.; Leitersdorf, E.; et al. Effects of initiating moderate alcohol intake on cardiometabolic risk in adults with type 2 diabetes: A 2-year randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.* **2015**, *163*, 569–579.
26. Golan, R.; Shelef, I.; Shemesh, E.; Henkin, Y.; Schwarzfuchs, D.; Gepner, Y.; Harman-Boehm, I.; Witkow, S.; Friger, M.; Chassidim, Y.; et al. Effects of initiating moderate wine intake on abdominal adipose tissue in adults with type 2 diabetes: A 2-year randomized controlled trial. *Public Health Nutr.* **2017**, *20*, 549–555.
27. Beulens, J.W.; van der Schouw, Y.T.; Bergmann, M.M.; Rohrmann, S.; Schulze, M.B.; Buijsse, B.; Grobbee, D.E.; Arriola, L.; Cauchi, S.; Tormo, M.J.; et al. Alcohol consumption and risk of type 2 diabetes in European men and women: Influence of beverage type and body size The EPIC-InterAct study. *J. Intern. Med.* **2012**, *272*, 358–370.
28. Golan, R.; Gepner, Y.; Shai, I. Wine and health—New evidence. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2019**, *72*, 55–59.
29. American Diabetes Association Professional Practice Care. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes—2022. *Diabetes Care* **2022**, *45* (Suppl. 1), S17–S38.
30. Boban, M.; Stockley, C.; Teissedre, P.L.; Restani, P.; Fradera, U.; Stein-Hammer, C.; Ruf, J.C. Drinking pattern of wine and effects on human health: Why should we drink moderately and with meals? *Food Funct.* **2016**, *7*, 2937–2942.
31. Mollica, A.; Scioli, G.; Della Valle, A.; Cichelli, A.; Novellino, E.; Bauer, M.; Kamysz, W.; Llorent-Martínez, E.J.; Córdova, M.L.F.-D.; Castillo-López, R.; et al. Phenolic analysis and in vitro biological activity of red wine, pomace and grape seeds oil derived from *Vitis vinifera* L. cv. Montepulciano d’Abruzzo. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1704.
32. Busbridge, M.; Griffiths, C.; Ashby, D.; Gale, D.; Jayantha, A.; Sanwaiya, A.; Chapman, R.S. Development of a novel immunoassay for the iron regulatory peptide hepcidin. *Brit. J. Biomed. Sci.* **2009**, *66*, 150–157.
33. Ioannou, G.N.; Dominitz, J.A.; Weiss, N.S.; Heagerty, P.J.; Kowdley, K.V. The effect of alcohol consumption on the prevalence of iron overload, iron deficiency, and iron deficiency anemia. *Gastroenterology* **2004**, *126*, 1293–1301.
34. Harrison-Findik, D.D.; Schafer, D.; Klein, E.; Timchenko, N.A.; Kulaksiz, H.; Clemens, D.; Fein, E.; Andriopoulos, B.; Pantopoulos, K.; Gollan, J. Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 22974–22982.
35. Harrison-Findik, D.D.; Klein, E.; Crist, C.; Evans, J.; Timchenko, N.; Gollan, J. Iron-mediated regulation of liver hepcidin expression in rats and mice is abolished by alcohol. *Hepatology* **2007**, *46*, 1979–1985.
36. Ohtake, T.; Saito, H.; Hosoki, Y.; Inoue, M.; Miyoshi, S.; Suzuki, Y.; Fujimoto, Y.; Kohgo, Y. Hepcidin is down-regulated in alcohol loading. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2007**, *31*, 2S–8S.
37. Wang, X.M.; Li, Y.; Han, L.; Li, J.; Liu, C.; Sun, C.G. Role of flavonoids in the treatment of iron overload. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 685364.

38. Lesjak, M.; Hoque, R.; Balesaria, S.; Skinner, V.; Debnam, E.S.; Srai, S.K.S.; Sharp, P.A. Quercetin inhibits intestinal iron absorption and ferroportin transporter expression in vivo and in vitro. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e102900.
39. Cook, J.D.; Reddy, M.B.; Hurrell, R.F. The effect of red and white wines on nonheme-iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *61*, 800–804.
40. Arfaoui, L. Dietary plant polyphenols: Effects of food processing on their content and bioavailability. *Molecules* **2021**, *26*, 2959.
41. Galesloot, T.E.; Vermeulen, S.H.; Geurts-Moespot, A.J.; Klaver, S.M.; Kroot, J.J.; Van Tienoven, D.; Wetzels, J.F.M.; Kiemeneij, L.A.L.M.; Sweep, F.C.; Heijer, M.D.; et al. Serum hepcidin: Reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood* **2011**, *117*, e218–e225.
42. Sugiura, T.; Dohi, Y.; Takase, H.; Fujii, S.; Seo, Y.; Ohte, N. Analytical evaluation of serum non-transferrin-bound iron and its relationships with oxidative stress and cardiac load in the general population. *Medicine* **2021**, *100*, e24722.
43. Vinchi, F. Non-transferrin-bound iron in the spotlight: Novel mechanistic insights into the vasculotoxic and atherosclerotic effect of iron. *Antioxid. Redox Signal.* **2021**, *35*, 387–414.
44. Van Bussel, B.C.T.; Henry, R.M.A.; Schalkwijk, C.G.; Dekker, J.M.; Nijpels, G.; Feskens, E.J.M.; Stehouwer, C.D.A. Alcohol and red wine consumption, but not fruit, vegetables, fish or dairy products, are associated with less endothelial dysfunction and less low-grade inflammation: The Hoorn Study. *Eur. J. Nutr.* **2018**, *57*, 1409–1419.
45. Imhof, A.; Woodward, M.; Doering, A.; Helbecque, N.; Loewel, H.; Amouyel, P.; Lowe, G.; Koenig, W. Overall alcohol intake, beer, wine, and systemic markers of inflammation in western Europe: Results from three MONICA samples (Augsburg, Glasgow, Lille). *Eur. Heart J.* **2004**, *25*, 2092–2100.
46. Li, J.; Lee, D.H.; Hu, J.; Tabung, F.K.; Li, Y.; Bhupathiraju, S.N.; Rimm, E.B.; Rexrode, K.M.; Manson, J.E.; Willett, W.C.; et al. Dietary inflammatory potential and risk of cardiovascular disease among men and women in the US. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2020**, *76*, 2181–2193.
47. Kell, D.B.; Pretorius, E. Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells. *Metallomics* **2014**, *6*, 748–773.
48. Adams, P.C. Diabetes: Serum ferritin levels and T2DM—Are body iron stores elevated? *Nat. Rev. Endocrinol.* **2012**, *8*, 573–575.
49. Pham, N.M.; Nanri, A.; Yi, S.; Kurotani, K.; Akter, S.; Foo, L.H.; Nishi, N.; Sato, M.; Hayabuchi, H.; Mizoue, T. Serum ferritin is associated with markers of insulin resistance in Japanese men but not in women. *Metabolism* **2013**, *62*, 561–567.
50. Vari, I.S.; Balkau, B.; Kettaneh, A.; André, P.; Tichet, J.; Fumeron, F.; Caces, E.; Marre, M.; Grandchamp, B.; Ducimetière, P.; et al. Ferritin and transferrin are associated with metabolic syndrome abnormalities and their change over time in a general population—Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR). *Diabetes Care* **2007**, *30*, 1795–1801.
51. Park, S.K.; Kim, M.G.; Ryoo, J.H.; Shin, J.Y. Association of serum ferritin and the development of metabolic syndrome in middle-aged Korean men: A 5-year follow-up study. *Diabetes Care* **2012**, *35*, 2521–2526.
52. Peng, Y.Y.; Uprichard, J. Ferritin and iron studies in anaemia and chronic disease. *Ann. Clin. Biochem.* **2017**, *54*, 43–48.
53. Justin, C.L.; Stevic, I.; Chan, A.; Lau, K.K.H.; Chan, H.H.W. Serum ferritin is not sensitive or specific for the diagnosis of iron deficiency in patients with normocytic anemia. *Blood* **2015**, *126*, 955.
54. Garcia-Casal, M.N.; Pena-Rosas, J.P.; Pasricha, S.R. Rethinking ferritin cutoffs for iron deficiency and overload. *Lancet Haematol.* **2014**, *1*, E92–E94.
55. Speeckaert, M.M.; Speeckaert, R.; Delanghe, J.R. Biological and clinical aspects of soluble transferrin receptor. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2010**, *47*, 213–228.
56. Skikne, B.S.; Punnonen, K.; Caldron, P.H.; Bennett, M.T.; Rehu, M.; Gasior, G.H.; Chamberlin, J.S.; Sullivan, L.A.; Bray, K.R.; Southwick, P.C. Improved differential diagnosis of anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: A prospective multicenter evaluation of soluble transferrin receptor and the sTfR/log ferritin index. *Am. J. Hematol.* **2011**, *86*, 923–927.
57. Andrews, M.; Soto, N.; Arredondo-Olguin, M. Association between ferritin and hepcidin levels and inflammatory status in patients with type 2 diabetes mellitus and obesity. *Nutrition* **2015**, *31*, 51–57.
58. Coimbra, S.; Catarino, C.; Santos-Silva, A. The role of adipocytes in the modulation of iron metabolism in obesity. *Obes. Rev.* **2013**, *14*, 771–779.
59. Vuppalanchi, R.; Troutt, J.S.; Konrad, R.J.; Ghabril, M.; Saxena, R.; Bell, L.N.; Kowdley, K.V.; Chalasani, N. Serum hepcidin levels are associated with obesity but not liver disease. *Obesity* **2014**, *22*, 836–841.
60. Hawula, Z.J.; Wallace, D.F.; Subramaniam, V.N.; Rishi, G. Therapeutic advances in regulating the hepcidin/ferroportin axis. *Pharmaceuticals* **2019**, *12*, 170.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

UTJECAJ UPALE I HIPOKSIJE NA KONCENTRACIJU HEPCIDINA U BOLESNIKA S COVID-19

Katarina Gugo

Kod bolesnika s COVID-19 istovremeno su prisutni upala i hipoksija kao signali sa suprotnim učinkom na ekspresiju hepcidina. Istraživanje se temeljilo na hipotezi da je u skupini hipoksičnih bolesnika s COVID-19 koncentracija hepcidina u krvi snižena i da je razina parametara statusa željeza promijenjena u odnosu na skupinu normoksičnih bolesnika. Glavni cilj istraživanja bio je ispitati postoji li razlika u koncentraciji hepcidina i čimbenika koji reguliraju koncentraciju hepcidina kod normoksičnih i hipoksičnih bolesnika s COVID-19 te u skupini zdravih ispitanika. Također, željelo se ispitati postoji li povezanost koncentracije hepcidina i parametara statusa željeza, eritropoeze, hipoksije i sustavne upale u ispitivanim skupinama. Primijenjeni su omjeri koji su uključivali hepcidin i molekule koje su povezane s hepcidinom (hepcidin/željezo, feritin/hepcidin, hepcidin/interleukin-6 (IL-6), hepcidin/C-reaktivni protein (CRP), hepcidin/eritropoetin (EPO)) kako bi se istodobno pratio njihov suodnos i međusoban utjecaj, ali i omjeri kojima se povezuju i stavljaju u suodnos različiti upalni parametri (CRP/IL-6, omjeri CRP-a i IL-6 s leukocitnim podskupinama, omjeri neutrofila i limfocita (NLR), neutrofila i monocita (NMR) te monocita i limfocita (MLR)) kako bi se pokušalo što bolje razlikovati skupine bolesnika s COVID-19 koje imaju različit obrazac kliničke prezentacije i ishode bolesti.

U istraživanje je uključeno 96 bolesnika s COVID-19 i 47 zdravih ispitanika podudarnih po dobi i spolu. Uzorkovanje je provedeno po primitku na Hitni infektološki prijem te su bolesnici s COVID-19 podijeljeni u skupinu normoksičnih i hipoksičnih bolesnika na temelju zasićenje hemoglobina kisikom (SpO_2), a daljnjim praćenjem tijeka bolesti podijeljeni su u skupine prema težini bolesti.

Najvažniji rezultati ovog istraživanja ukazuju da su plazmatske koncentracije hepcidina, feritina, EPO-a, CRP-a i IL-6 te omjeri hepcidin/željezo i feritin/hepcidin bili značajno viši, dok su omjeri hepcidin/IL-6 i hepcidin/CRP bili značajno niži u hipoksičnih u odnosu na normoksične bolesnike te u bolesnika s teškim ili kritičnim oblikom COVID-19 u odnosu na one s blagim i umjerenim oblikom bolesti. Nađena je dobra povezanost hepcidina s CRP-om i IL-6 kod normoksičnih bolesnika, dok je u skupini hipoksičnih bolesnika povezanost s CRP-om bila slaba, a s IL-6 odsutna. Vrijednosti omjera CRP/neutrofilni granulociti, CRP/limfociti, CRP/monociti, NLR i NMR na prijemu bile su najviše kod bolesnika koji su imali teški i kritični tijek bolesti. Omjeri IL-6/neutrofilni granulociti, IL-6/limfociti, IL-6/monociti bili su statistički značajno viši u skupini ispitanika koja je imala kritični tijek bolesti u odnosu na ostale skupne bolesnika. Multiparametarski model za predviđanje razvoja kritičnog oblika COVID-19 koji je uključivao EPO i feritin/hepcidin ispravno je klasificirao 88 % slučajeva.

Prisutnost izraženije sustavne upale u skupini hipoksičnih bolesnika vjerojatno je uzrok više koncentracije hepcidina u odnosu na normoksične bolesnike s COVID-19. Uz to, razlike u vrijednostima pojedinih omjera upalnih biljega među skupinama bolesnika s COVID-19 ukazuju da bi ovi omjeri mogli biti korisni u predviđanju težine bolesti.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 115 stranica, 16 grafičkih prikaza, 9 tablica i 224 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: COVID-19, hepcidin, željezo, feritin, eritropoetin, interleukin 6, hipoksija, upala

Mentori: **Dr. sc. Leida Tandara**, *docentica Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu*

Dr. sc. Lada Rumora, *redovita profesorica u trajnom zvanju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Ocjenjivači: **Dr. sc. József Petrik**, *redoviti profesor u trajnom zvanju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Dr. sc. Dunja Rogić, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Dr. sc. Luka Bielen, *docent Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta*

Rad prihvaćen: 14. listopada 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral thesis

INFLUENCE OF INFLAMMATION AND HYPOXIA ON HEPCIDIN CONCENTRATION IN PATIENTS WITH COVID-19

Katarina Gugo

In patients with COVID-19, inflammation and hypoxia are simultaneously present, having opposite effects on hepcidin expression. This study is based on the hypothesis that hepcidin concentration is lower and concentration of iron status parameters is changed in hypoxic COVID-19 patients compared to normoxic patients. The main aim of the study was to determine the difference in hepcidin concentration and the level of parameters regulating its concentration between normoxic and hypoxic COVID-19 patients and healthy subjects. Additionally, the study investigated the association of hepcidin concentration with iron status parameters, erythropoiesis, hypoxia and systemic inflammation. Ratios involving hepcidin and molecules related to hepcidin (hepcidin/iron, ferritin/hepcidin, hepcidin/interleukin 6 (IL-6), hepcidin/C-reactive protein (CRP), hepcidin/erythropoietin (EPO)) were also examined to observe their interrelationship as well as the ratios of inflammatory parameters (CRP/IL-6, ratios of CRP and IL-6 with leukocyte subpopulations, neutrophil to lymphocyte ratio (NLR), neutrophil to monocyte ratio (NMR), monocyte to lymphocyte (MLR)) to distinguish subgroups of COVID-19 patients with different clinical presentations and disease outcomes.

The study included 96 COVID-19 patients and 47 healthy subjects matched by age and gender. Sampling was conducted on admission to the emergency unit of the Department of Infectious Diseases. COVID-19 patients were subdivided into normoxic and hypoxic groups based on haemoglobin oxygen saturation (SpO₂), and, after follow-up, into disease severity groups.

The key findings of this study indicate that concentrations of hepcidin, ferritin, EPO, CRP, IL-6, and values of hepcidin/iron and ferritin/hepcidin were significantly higher, while values of hepcidin/IL-6 and hepcidin/CRP were significantly lower in hypoxic patients compared to normoxic patients as well as in severe and critical COVID-19 patients compared to mild and moderate COVID-19 patients. Hepcidin correlated well with CRP and IL-6 in the normoxic patient group, whereas the correlation with CRP was weak and that with IL-6 was absent in hypoxic patients. The ratios of CRP/neutrophil granulocytes, CRP/lymphocytes, CRP/monocytes, NLR, and NMR on admission were the highest in patients with severe and critical disease course. The IL-6/neutrophil granulocytes, IL-6/lymphocytes, and IL-6/monocytes ratios were significantly higher in the group with a critical disease course compared to other patient groups. Multiparameter model for prediction of the risk for critical COVID-19 that included EPO and ferritin/hepcidin correctly classified 88 % cases.

The presence of more pronounced systemic inflammation in the hypoxic patient group is probably the cause of higher hepcidin concentrations found in this patient group compared to normoxic COVID-19 patients. In addition, differences in the values of inflammatory markers' ratios among COVID-19 patient groups suggest their potential value in predicting disease severity.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 115 pages, 16 figures, 9 tables and 224 references. Original is in Croatian language.

Keywords: COVID-19, hepcidin, iron, ferritin, erythropoietin, interleukin 6, hypoxia, inflammation

Mentors: **Assistant Professor Leida Tandara, Ph. D.**, *University of Split School of Medicine*
Full Professor with tenure Lada Rumora, Ph. D., *University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Reviewers: **Full Professor with tenure József Petrik, Ph. D.**, *University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Full Professor Dunja Rogić, Ph. D., *University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Assistant Professor Luka Bielen, Ph. D., *University of Zagreb Faculty of Medicine*

The thesis was accepted: 14th October 2024