

# Stężenia pro-hepcydyny w surowicy kobiet ciężarnych oraz krwi pępowinowej

## Concentrations of pro-hepcidin in serum of pregnant women and in umbilical cord blood

Chełchowska Magdalena<sup>1</sup>, Świątek Ewa<sup>2</sup>, Ambroszkiewicz Jadwiga<sup>1</sup>,  
Gajewska Joanna<sup>1</sup>, Laskowska-Klita Teresa<sup>1</sup>, Leibschang Jerzy<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Zakład Badań Przesiewowych Instytutu Matki i Dziecka

<sup>2</sup> Klinika Położnictwa i Ginekologii, Instytut Matki i Dziecka

<sup>3</sup> Klinika Położnictwa Wydziału Nauki o Zdrowiu Akademii Medycznej w Warszawie

### Streszczenie

**Cel pracy:** Celem pracy było wykazanie obecności pro-hepcydyny w surowicy kobiet ciężarnych oraz we krwi pępowinowej. Oprócz tego podjęta została próba znalezienia korelacji pomiędzy pro-hepcydyną a innymi parametrami gospodarki żelaza.

**Materiał i metody:** Badaniami objęto 32 zdrowe kobiety ciężarne, będące pod opieką Poradni Ginekologiczno-Położniczej Instytutu Matki i Dziecka (IMiD). Stężenia pro-hepcydyny we krwi matek i krwi pępowinowej oznaczano metodą immunoenzymatyczną, stężenie ferrytyny i transferyny metodą turbidymetryczną, a żelaza fotometrycznie. Wartość hemoglobiny i hematokrytu określano na analizatorze hematologicznym Pentra 60. Badania wykonano w Zakładzie Biochemii IMiD.

**Wyniki:** Średnie stężenie pro-hepcydyny w surowicy krwi rodzących wynosiło  $102,0 \pm 30,7$  ng/ml i mieściło się w zakresie od 51,5 do 181,1 ng/ml. Poziom pro-hepcydyny w surowicy krwi pępowinowej wynosił  $77,05 \pm 21,2$  ng/ml (zakres: 41,9-125,9 ng/ml), co stanowiło 75% wartości obserwowanych u matki, a różnica ta była znamienna ( $p < 0,01$ ). Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy stężeniami tego prohormonu we krwi matki i krwi pępowinowej ( $r = 0,60$ ;  $p < 0,01$ ). Nie wykazano natomiast powiązań pomiędzy stężeniem pro-hepcydyny a pozostałymi parametrami statusu żelaza zarówno w grupie kobiet ciężarnych jak i ich dzieci.

**Wnioski:** Uzyskane wyniki wskazują, że stężenia pro-hepcydyny są wykrywalne zarówno we krwi matki jak i we krwi pępowinowej, a ich wartości dodatnio korelują ze sobą.

Brak powiązań z innymi markerami statusu żelaza może wynikać z faktu, iż u żadnej z pacjentek nie obserwowaliśmy niedokrwistości czy nawet subklinicznych niedoborów żelaza.

Słowa kluczowe: **pro-hepcydyna / kobiety ciężarne / krew pępowinowa /**

### Adres do korespondencji:

Magdalena Chełchowska  
Zakład Badań Przesiewowych Instytut Matki i Dziecka,  
01-211 Warszawa, ul. Kasprzaka 17A,  
tel./fax 022 3277260  
e-mail: mchelchowska@yahoo.com

Otrzymano: 03.03.2008

Zaakceptowano do druku: 01.10.2008

Chelchowska M, et al.

**Abstract**

**Objectives:** The aim of the study was to detect the presence of pro-hepcidin in the serum of pregnant women and in umbilical cord blood. Additionally, correlations between pro-hepcidin and other iron parameters were analyzed.

**Material and methods:** Our study consisted of 32 healthy, pregnant women, patients of Clinical Department of Obstetrics and Gynaecology, Institute of Mother and Child (IMC). Serum concentrations of pro-hepcidin were determined with the use of immunoenzymatic method, levels of ferritin and transferrin with immunoturbidimetric method and iron with photometric test. Hemoglobin and hematocrite were determined on hematological analyzer Pentra 60. The study was conducted at the Department of Biochemistry IMC.

**Results:** The mean concentration of pro-hepcidin in the serum of pregnant women was  $102.0 \pm 30.7$  ng/ml and ranged from 51.5 to 181.1 ng/ml. Level of pro-hepcidin in the serum of the umbilical cord blood was  $77.05 \pm 21.2$  ng/ml (range: 41.9 – 125.9 ng/ml), which amounted up to about 75% of that found in mothers, thus making the differences were statistically significant ( $p < 0.01$ ). We observed a positive correlation between concentrations of that prohormone in the serum of mothers and cord blood ( $r = 0.60$ ;  $p < 0.01$ ).

Our analysis revealed no correlations between the serum pro-hepcidin levels and other studied parameters of iron status, both in the mothers and children groups.

**Conclusions:** Our results indicate that concentrations of pro-hepcidin are detectable in the serum of mothers, as well as in the umbilical cord blood, and positively correlate with each other.

No anemia or subclinical iron deficiency that could explain no correlation with others parameters of iron status was observed.

Key words: **pro-hepcidin / pregnant women / umbilical cord blood /**

**Wstęp**

Zachowanie homeostazy żelaza związane jest zarówno z zabezpieczeniem potrzeb metabolicznych ustroju jak i koniecznością zapobiegania przeciążeniom tym pierwiastkiem. W procesach tych biorą udział współpracujące ze sobą białka transportujące i magazynujące żelazo oraz białka regulatorowe i sygnalizacyjne. W złożony system regulacji homeostazy żelaza wpisuje się również odkryta w 2001 roku hepcydyna (HAMP – *hepcidin antimicrobial peptide*) – białkowy hormon o aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej hamujący absorpcję jelitową żelaza i jego uwalnianie z makrofagów układu siateczkowo-śródbłonkowego [1, 2].

Gen hepcydyny u ludzi znajduje się na długim ramieniu chromosomu 19, a jego produktem jest pro-hepcydyna, będąca 84-aminokwasowym peptydem prekursorowym. Pro-hepcydyna zawiera sekwencję sygnałną niezbędną do jej ekspresji na retikulum endoplazmatycznym i sekwencję rozszczepiania prohormonu przez konwertazy. W związku z tym we krwi obecna jest dojrzała postać hepcydyny – peptyd złożony z 20, 22 lub 25 aminokwasów jak również pro-hepcydyna [3, 4]. Zgromadzona dotychczas wiedza dotycząca zarówno pro-hepcydyny jak i hepcydyny opiera się głównie na badaniach przeprowadzonych na zwierzętach, w tym na myszach genetycznie zmodyfikowanych z nieczynnym genem hepcydyny i myszach transgenicznym z nadekspresją genu [5, 6].

Udział hepcydyny w regulacji statusu żelaza u ludzi potwierdzono jedynie w przypadkach hemochromatozy (mutacje w regionie kodującym genu HAMP) oraz u pacjentów z gruczolakami wątroby współistniejącym z niedokrwistością [7, 8]. Nadekspresję hepcydyny sugeruje się u pacjentów z niedokrwistością śródinfekcyjną, w przebiegu której hiperferrytynemii towarzyszy hipoferrmia [9-12].

Taes i wsp. [13] w badaniach przeprowadzonych u ludzi, wykazali istnienie korelacji pomiędzy stężeniem pro-hepcydyny i narastaniem niewydolności nerek przy jednoczesnym braku związku ze wskaźnikami układu czerwono-krwinkowego. Natomiast Małyszko i wsp. [14] wykazali możliwość powiązania niedokrwistości, zapalenia oraz wydolności wątroby u pacjentów z chorobami nerek.

Najliczniejszą grupę ryzyka wystąpienia niedoborów żelaza stanowią kobiety w wieku reprodukcyjnym w tym kobiety ciężarne, u których zasoby tego pierwiastka przed ciążą mogą być niewystarczające na pokrycie zapotrzebowania (900-1200mg) rosnącego płodu [15, 16]. Nieznane są powiązania pomiędzy hepcydyną i jej prohormonem a metabolizmem żelaza w przebiegu ciąży. Nicolas i wsp. [5] na podstawie badań myszy transgenicznym postulują udział hepcydyny w regulacji maczyno-płodowego transportu żelaza poprzez komórki syncytiotrofoblastu łożyska. Przypuszcza się, że hormon ten hamuje przechodzenie żelaza z komórek transportujących ten pierwiastek poprzez wiązanie się w nich z ferroportyną – białkiem przenoszącym żelazo i indukcję degradacji tego białka. W przebiegu ciąży przechodzenie żelaza od matki do płodu wzrasta znacząco z wiekiem ciążowym. Wraz z wyczerpywaniem zasobów maczynych zapotrzebowanie może być wyrównywane poprzez wzrost absorpcji.

**Cel pracy**

Celem pracy było wykazanie obecności pro-hepcydyny w surowicy kobiet ciężarnych oraz we krwi pępowinowej. Oprócz tego podjęta została próba znalezienia korelacji pomiędzy pro-hepcydyną a innymi parametrami gospodarki żelaza.

Stężenia pro-hepcydyny w surowicy kobiet ciężarnych oraz krwi pępowinowej.

## Materiał i metody

Badaniami objęto 32 kobiety ciężarne, będące pod opieką Poradni Ginekologiczno-Położniczej Instytutu Matki i Dziecka. Do grupy włączono jedynie kobiety z ciążą o fizjologicznym przebiegu, u których występowały prawidłowe cykle miesięczne przed ciążą i będące w dobrym stanie zdrowia w chwili badania.

Zakwalifikowane pacjentki pozostawały na diecie mieszanej i były suplementowane standardowo preparatami multiwitaminowymi zawierającymi mikroelementy (Fe 30-60mg/dzień) oraz w ramach prowadzenia programu prewencji wad cewy nerwowej kwasem foliowym. Wszystkie badane niegowały palenie tytoniu i spożywanie alkoholu podczas ciąży. Średnia wieku ciążowego wynosiła  $38,6 \pm 1,9$  t.c. (mediana: 39; zakres 36-42 tydzień ciąży). U wszystkich badanych kobiet porody przebiegały drogami natury bez cech patologii. Badania prowadzono po wyrażeniu zgody przez pacjentki i po akceptacji Komisji Bioetycznej IMiD (Opinia nr 14/2005).

Materiałem do badań była krew żylna kobiet ciężarnych oraz krew pępowinowa. Próbkę krwi żyłnej pobierano z żyły łokciowej w dniu porodu przy okazji wykonywania badań podstawowych. Krew pępowinową mieszaną (tętniczą i żylną) pobierano bezpośrednio po urodzeniu dziecka i jego odpięciu, z zaklewanego fragmentu pępowiny przed urodzeniem łożyska. Surowica bez śladów hemolizy była przygotowywana jak najszybciej po pobraniu krwi, zamrażana i przechowywana w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania analiz.

Stężenie pro-hepcydyny badano metodą immunoenzymatyczną (ELISA) przy użyciu gotowych zestawów firmy DRG (Niemcy). Stężenie ferrytyny i transferyny oznaczano metodą turbidymetryczną wzmocnioną lateksem, a stężenie Fe niezwiązanego z transferyną metodą fotometryczną z użyciem ferenu, przy użyciu gotowych zestawów firmy HORIBA ABX (Francja) na analizatorze biochemicznym Cobas Mira (Roche, Szwajcaria). Wartość hemoglobiny i hematokrytu określano gotowymi zestawami firmy HORIBA ABX (Francja) na analizatorze hematologicznym Pentra 60 (ABX, Francja). Badania wykonano w Zakładzie Biochemii IMiD.

Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem pakietu Statistica 6.0 (StatSoft, Polska). Za poziom istotny statystycznie przyjęto wartość  $p < 0,05$ .

## Wyniki

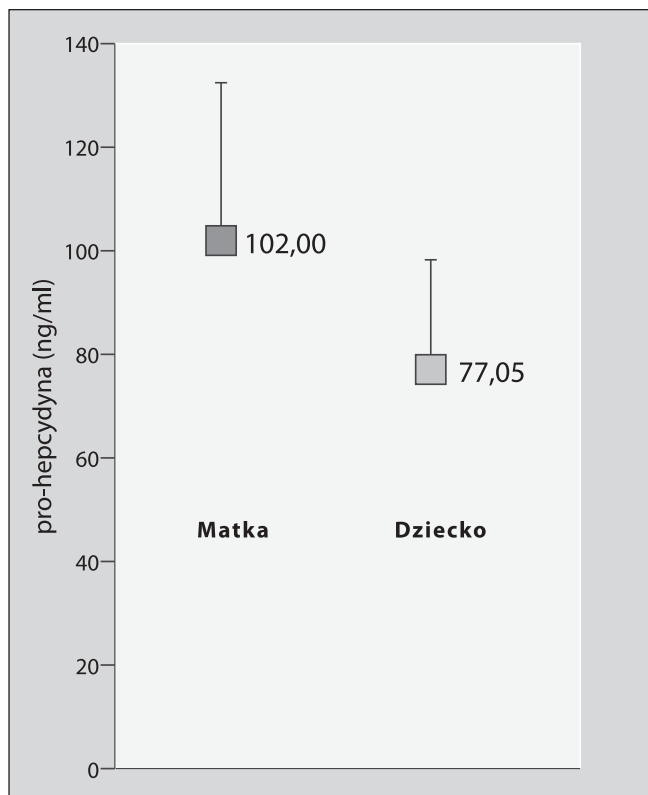
W badanej grupie kobiet stężenia żelaza, ferrytyny i transferyny oraz wartości hemoglobiny i hematokrytu mieściły się w granicach referencyjnych. (Tabela I).

Średnie stężenie pro-hepcydyny w surowicy krwi rodzających wynosiło  $102,0 \pm 30,7$  ng/ml i mieściło się w zakresie od 51,5 do 181,1 ng/ml. Poziom pro-hepcydyny w surowicy krwi pępowinowej był niższy o 25% niż obserwowany u matek i wynosił  $77,05 \pm 21,2$  ng/ml (zakres: 41,9-125,9 ng/ml). Różnica ta była istotna statystycznie ( $p < 0,01$ ). (Rycina 1).

Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy stężeniami tego prohormonu we krwi matki i krwi pępowinowej ( $r = 0,60$ ;  $p < 0,01$ ). Nie wykazano natomiast powiązań pomiędzy stężeniem pro-hepcydyny a pozostałymi parametrami statusu żelaza zarówno w grupie kobiet ciężarnych jak i ich dzieci.

Tabela I. Stężenia żelaza, ferrytyny, transferyny oraz wartość hemoglobiny i hematokrytu we krwi badanych kobiet ciężarnych.

	Hemoglobina (g/dl)	Hematokryt %	Żelazo ( $\mu\text{mol/l}$ )	Ferrytyna (ng/ml)	Transferyna (mg/dl)
Grupa badana	$12,9 \pm 1,0$	$38,6 \pm 2,7$	$15,6 \pm 8,1$	$28,0 \pm 21,7$	$411,0 \pm 66,7$
Wartości referencyjne	$>11$	$>36,0$	6,6-26,0	15,0-120,0	200,0-400,0



Rycina 1. Stężenia pro-hepcydyny we krwi matek i krwi pępowinowej ich potomstwa (średnia  $\pm$  SD); \* $p < 0,01$ .

## Dyskusja

Dane literaturowe oceniające fizjologiczny poziom pro-hepcydyny u zdrowych ludzi są nieliczne i niejednoznaczne. Z badań Hadley i wsp. [17] prowadzonych w grupie zdrowych kobiet w wieku przed menopauzą wynika, że poziom pro-hepcydyny we krwi mieści się w zakresie od 99 do 376 mg/l (średnio 196 mg/l). Podobne wyniki, ale w grupie zdrowych mężczyzn w wieku 40 lat i powyżej otrzymali Roe i wsp. [18] (średnio 214 ng/ml; zakres 56-902 ng/ml). Natomiast niższe wartości w grupach mieszanych otrzymali Kulaksiz i wsp. [7] (średnio 106 ng/ml; zakres 52-153 ng/ml) oraz Ezeh i wsp. [19] (średnio  $84 \pm 40$  ng/ml).

Chelchowska M, et al.

Autorzy ci nie stwierdzili powiązań pomiędzy stężeniem pro-hepcydyny a innymi markerami statusu żelaza, z wyjątkiem Hadley i wsp. [17], którzy wprawdzie wykazali dodatnią korelację z poziomem ferrytyny, ale stwierdzili brak powiązań z wchłanianiem żelaza.

Udział hepcydyny w regulacji matczyno-płodowego transportu żelaza postulują, na podstawie badań prowadzonych na zwierzętach, Nicolas i wsp. [5] Millard i wsp. [20].

W naszych poprzednich, wstępnych badaniach przeprowadzonych w grupie kobiet ciężarnych nie stwierdziliśmy istotnych zmian w stężeniu tego peptydu w przebiegu ciąży, pomimo istotnego spadku stężenia ferrytyny w poszczególnych trymestrach [21]. Podobne wyniki uzyskali Roe i wsp. [18]. Autorzy ci wykazali, że poziom pro-hepcydyny u kobiet ciężarnych nie różnił się istotnie od obserwowanego u zdrowych mężczyzn oraz u pacjentów z dziedziczną hemochromatozą. W przedstawionej pracy zakres stężeń pro-hepcydyny w III trymestrze ciąży był podobny do obserwowanego przez Roe i wsp. [18]. Podobnie jak ci autorzy nie stwierdziliśmy powiązań pomiędzy pro-hepcydyną a innymi markerami statusu żelaza. Być może wynika to z faktu iż, u żadnej z naszych pacjentek nie obserwowaliśmy niedokrwistości czy nawet subklinicznych niedoborów żelaza.

W literaturze brak jest danych dotyczących powiązań pomiędzy poziomem pro-hepcydyny u matki i noworodka. Obecność tego peptydu we krwi pępowinowej stwierdzili jedynie Balogh i wsp. [21]. Autorzy ci oznaczając poziom pro-hepcydyny we krwi pępowinowej, a następnie we krwi żyłnej tych samych noworodków stwierdzili, że stężenie pro-hepcydyny wzrastało po urodzeniu o połowę, co może wskazywać na aktywną syntezę tej molekuly u dziecka. Z naszych badań wynika, że stężenia tego prohormonu we krwi pępowinowej stanowiły zaledwie 75% wartości obserwowanych u matek. Stężenia pro-hepcydyny we krwi żyłnej matki i we krwi pępowinowej były ze sobą pozytywnie skorelowane. Natomiast podobnie jak Balogh i wsp. [21] nie stwierdziliśmy we krwi pępowinowej powiązań pro-hepcydyny z innymi markerami homeostazy żelaza.

Brak korelacji pomiędzy pro-hepcydyną a pozostałymi markerami homeostazy żelaza w badanej przez nas grupie może potwierdzać sugestię innych autorów [17, 18, 23], że określenie funkcji hepcydyny w gospodarce żelazowej u ludzi zdrowych wymaga dalszych badań.

## Wnioski

1. Pro-hepcydyna występuje w ilościach wykrywalnych zarówno w surowicy krwi kobiet ciężarnych jak i we krwi pępowinowej. Stężenia tego białka we krwi matki dodatnio korelują ze stężeniami występującymi u dziecka.
2. Nie stwierdzono powiązań pomiędzy stężeniem pro-hepcydyny a innymi markerami homeostazy żelaza.

## Piśmiennictwo

1. Park C, Valore E, Waring A, [et al.]. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*. 2001, 276, 7806-7810.
2. Nemeth E, Tuttle M, Powelson J, [et al.]. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004, 306, 2090-2093.
3. Lipiński P, Starzyński R. Regulacja ogólnoustrojowej homeostazy żelaza przez hepcydynę. *Postępy Hig Med Dośw*. 2004, 58, 65-73.
4. Rogalska M, Flisiak R. Hepcydyna – współczesny stan wiedzy. *Diag Lab*. 2007, 43, 295-301.
5. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, [et al.]. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002, 99, 4596-4601.
6. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, [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, 7811-7819.
7. Kulaksiz H, Gehrke S, Janetzko A, [et al.]. Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut*. 2004, 53, 735-743.
8. Detivaud L, Nemeth E, Boudjema K, [et al.]. Hepcidin levels in humans are correlated with hepatic iron stores, hemoglobin levels, and hepatic function. *Blood*. 2005, 106, 746-748.
9. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, [et al.]. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*. 2004, 113, 1271-1276.
10. Andrews N. Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link. *J Clin Invest*. 2004, 113, 1251-1253.
11. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, [et al.]. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*. 2002, 110, 1037-1044.
12. Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*. 2003, 102, 783-788.
13. Taes Y, Wuys B, Boelaert J, [et al.]. Prohepcidin accumulates in renal insufficiency. *Clin Chem Lab Med*. 2004, 42, 387-389.
14. Małyško J, Małyško J, Hryszko T, [et al.]. Is hepcidin a link between anemia, inflammation and liver function in hemodialyzed patients? *Am J Nephrol*. 2005, 25, 586-590.
15. Zdziennicki A, Ludański T. Iron deficiency as a risk factor during the perinatal period. *Ginekol Pol*. 1996, 67, 301-303.
16. Ciok J, Leibschan J. The report of UNICEF/WHO joint consultation on iron deficiency anemia, Genewa 3-5 lutego 1999. *Ginekol Pol*. 1999, 70, 573-577.
17. Hadley K, Johnson K, Hunt J. Iron absorption by healthy women is not associated with either serum or urinary prohepcidin. *Am J Clin Nutr*. 2006, 84, 150-155.
18. Roe M, Spinks C, Heath A, [et al.]. Serum prohepcidin concentration: no association with iron absorption in healthy men; and no relationship with iron status in man carrying HFE mutations, hereditary haemochromatosis patients undergoing phlebotomy treatment, or pregnant women. *Br J Nutr*. 2007, 97, 544-549.
19. Ezeh C, Ugochukwu C, Weinstein J, [et al.]. Hepcidin, haemoglobin and ferritin levels in sickle cell anaemia. *Eur J Haematol*. 2005, 74, 86-88.
20. Millard K, Frazer D, Wilkins S, [et al.]. Changes in the expression of intestinal iron transport and hepatic regulatory molecules explain the enhanced iron absorption associated with pregnancy in the rat. *Gut*. 2004, 53, 665-660.
21. Laskowska-Klita T, Chelchowska M., Ambroszkiewicz J, [et al.]. Serum pro-hepcidin and iron markers during uncomplicated pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2007, 130, 273-274.
22. Balogh A, Szabo M, Kelen D, [et al.]. Prohepcidin levels during human perinatal adaptation. *Pediatr Hematol Oncol*. 2007, 24, 361-368.
23. Brookes M, Sharma N, Tselepis C, [et al.]. Serum pro-hepcidin: measuring active hepcidin or a non-functional precursor? *Gut*. 2005, 54, 169-170.