

# A vasháztartást szabályzó hepcidin kimutatása és szerepe a perinatalis vasháztartásban

BALOGH ÁDÁM DR.<sup>1</sup> ■ BŐSZE SZILVIA<sup>2</sup> ■ HORVÁTI KATA<sup>2</sup> ■ MEZŐ GÁBOR<sup>2</sup>  
KÉKI SÁNDOR<sup>3</sup> ■ NAGY LAJOS<sup>3</sup> ■ BOKODI GÉZA<sup>1</sup> ■ SZABÓ MIKLÓS<sup>1</sup>  
VÁSÁRHELYI BARNA DR.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. Gyermekgyógyászati Klinika, Budapest

<sup>2</sup>Magyar Tudományos Akadémia, Peptidkémiai Kutatócsoport, Budapest

<sup>3</sup>Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Alkalmazott Kémiai Tanszék, Debrecen

<sup>4</sup>Magyar Tudományos Akadémia, Gyermekgyógyászati és Nefrológiai Kutatócsoport, Budapest

A hepcidin egy nemrégiben felfedezett, defenzin típusú peptid, amely központi szerepet játszik a vasháztartás szabályozásában. A hepcidin csökkenti a vastranszportban szerepet játszó molekulák expresszióját, így gátolja a vas gastrointestinalis rendszerből való felszívódását, makrofágokból való felszabadulását, csökkentve ezzel a szérumszintjét. A hepcidin vasháztartásban betöltött szerepének tisztázása segíthet a gyulladáshoz és krónikus betegségekhez kapcsolódó anémia pontosabb megértésében. Munkánk kezdetén a hepcidin kimutatására alkalmas, kereskedelmi forgalomban elérhető módszer nem állt rendelkezésre. Célunk volt egy, a vizelethepcidin kimutatására alkalmas módszer kidolgozása, valamint hogy ezen módszer segítségével vizsgáljuk a hepcidin jelenlétét a perinatalis vasháztartásban. Munkánk során a natív, emberi hepcidin aminosav-szekvenciájának megfelelően állítottunk elő peptidszarmazékokat, amelyek közül az 1-7 peptidszarmazékról igazoltuk, hogy alkalmas lehet a natív hepcidin standard helyettesítésére immunreakción alapuló módszerek fejlesztésekor. Kidolgoztunk egy, az emberi vizelethepcidin mennyiségi meghatározására alkalmas, lézerdesorpciós tömegspektrometriás, szemikvantitatív módszert, amelyben az általunk szintetizált acetyl-1-25 peptidszarmazékot mint hepcidinszerű belső standardot elsőként alkalmaztuk. Kidolgoztunk a vizelet tisztítására és a vizelethepcidin koncentrációjának mérésére alkalmas, szilárd fázisú extrakción alapuló módszert. Az általunk kidolgozott módszerrel elsőként mértük egészséges újszülöttek vizelethepcidin-szintjét, valamint egy kereskedelmi forgalomban elérhető módszerrel a szérumprophepcidin-szintjét. Kimutattuk, hogy az érett újszülöttek korai adaptációja során a szérumprophepcidin-szint nem változik, a vizelethepcidin viszont szignifikánsan nő. A szérumprophepcidin- és a vizelethepcidin-szintek egymással nem mutattak összefüggést. Kimutattuk, hogy az érett újszülöttek vasháztartásának korai adaptációja során a szérumprophepcidin-szintek kizárólag a vörösvérsejtek átlagos hemoglobinkoncentrációjával, míg a vizelethepcidin-szintek a szérumszinttel és teljes vaskötő kapacitással mutattak összefüggést. Kimutattuk, hogy az érett újszülöttek vasháztartásának korai adaptációja során a köldökzsinórvér-mintákban az alacsonyabb szérumprophepcidin-szintek esetén szabad vas jelenléte igazolható. Összefoglalva: Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a hepcidinnak valószínűleg szerepe van az újszülöttek korai, a vasháztartást érintő adaptációjában, azonban további vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy ezt az összefüggést biztosan megállapíthassuk.

**Kulcsszavak:** hepcidin, hepcidinszint, vas, perinatalis vasháztartás

## Role of iron metabolism-regulator hepcidin in perinatal iron homeostasis

Hepcidin is a recently recognized defensin-like peptide, which is considered to be the central regulator of iron metabolism. Hepcidin decreases the expression of iron transporting molecules. Hepcidin reduces gastrointestinal iron absorption, iron release from the macrophages, and hence it decreases serum iron levels. Clarification of hepcidin role in iron homeostasis could provide an explanation to anemia of inflammation and chronic diseases. At start of our work there was no commercially available method for measuring urine hepcidin levels. The aim of our study was to develop an easily achievable, reliable quantification method for the determination of urine hepcidin levels in human, in addition to examine a possible association of hepcidin with neonatal iron homeostasis. According to the sequence of native, human hepcidin we have synthesized peptide derivatives from which 1-7 peptide derivatives might be suitable representatives of the 25-amino-acid form of hepcidin in immune adsorption method. We presented a novel laser-desorption mass spectrometry based semi-quantitative, reproducible method for measuring hepcidin concentration in human urine first using the synthesized peptide derivative acetyl-1-25 peptide as hepcidin related internal standard. We described an easy and quickly achievable solid-phase extraction method which is suitable for purification of urine and concentration of hepcidin. In our study we have first measured serum prohepcidin and urine hepcidin in healthy human newborns. Serum prohepcidin levels showed no significant changes, however, urine hepcidin levels increased significantly during the first postnatal days. Serum prohepcidin and urine hepcidin levels showed no significant association in healthy human newborns. Associations have been demonstrated between cord blood prohepcidin values and mean corpuscular hemoglobin concentration as well as between urine hepcidin levels and serum

iron and total iron binding capacity values. We have demonstrated that neonates with detectable non-protein-bound iron levels in cord blood were presented with lower prohepcidin concentrations. In summary, our results suggest a possible link between hepcidin and early iron adaptation of newborn's, however, further investigations should be done to elucidate this issue.

**Keywords:** hepcidin, hepcidin level, iron, perinatal iron-regulatory system

(Beérkezett: 2009. november 8.; elfogadva: 2009. november 23.)

### Rövidítések

$\alpha$ -7 és  $\alpha$ -13 = nyúl-antihumanhepcidin-IgG, affinitástisztított; Acp = aminokapronsav; CRP = C-reaktív protein; ELISA = (enzyme linked immunosorbent assay) enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat; ESI-MS = (electrospray ionization mass spectrometry) elektropray-ionizációs tömegspektrometria; Fmoc = 9-fluorenil-metiloxi-karbonil; (Gly)<sub>5</sub> = pentaglicin „spacer”; HPLC = (high performance liquid chromatography) nagy teljesítményű folyadékkromatográfia; MALDI-MS = (matrix-assisted laser desorption ionization – mass spectrometry) mátrixasszisztált lézersedzorpció-ionizáció – tömegspektrométer; MCH = (mean corpuscular hemoglobin) vörösvérsejtek átlagos hemoglobintartalma; MCHC = (mean corpuscular hemoglobin concentration) vörösvérsejtek átlagos hemoglobinkoncentrációja; MCV = (mean corpuscular volume) vörösvérsejtek átlagos térfogata; NPBI = (non-protein bound iron) fehérjéhez nem kötődő vas; RP-HPLC = (reversed phase high performance liquid chromatography) fordított fázisú, nagy teljesítményű folyadékkromatográfia; SELDI-TOF-MS = (surface-enhanced laser desorption ionization – mass spectrometry) felületsegített lézersedzorpció – tömegspektrometria; SPE = szilárd fázisú extrakció; tBu = *tert*-butil; TFA = trifluoecetsav; TOF = (time of flight analysis) repülésidő-analízis

A vas nélkülözhetetlen minden élő szervezet számára, azonban potenciális veszélyforrás is, mivel elősegítheti a szabad gyökök képződését. Annak érdekében, hogy ezt a veszélyt elkerülje, a szervezet számos molekula segítségével szigorúan szabályozza a vas forgalmát. Ezen molekulák egy részének (ferritin, transzferrin, transzferrin-receptor-1) vasháztartásban betöltött szerepe pontosan ismert, a szabályozás azonban több ponton tisztázatlan. Az elmúlt évtized felfedezései során számos olyan új molekulát azonosítottak, amelynek jelentős szerepe van a vasháztartásban. Ezek közé tartozik a hepcidin is.

A hepcidin egy 2000-ben felfedezett, defenzin típusú peptid, amelyről szinte véletlenül derült ki, hogy központi szerepet játszik a gerinces élőlények vasháztartásának szabályozásában, új dimenziót nyitva ezzel a különböző, vasháztartással összefüggő betegségek patofiziológiájának megértése felé [1, 2]. Az azóta eltelt idő alatt kiderült, hogy a hepcidin csökkenti a vastranszportban szerepet játszó molekulák, elsősorban az eddig ismert egyetlen vasexporter fehérje, a ferroportin expresszióját [3]. A hepcidin így gátolja a vas gastrointestinalis rendszerből való felszívódását, makrofágokból való felszabadulását, csökkentve a szérumban vasszintjét.

A hepcidin elsősorban a májban termelődik prohepcidin formájában [4]. Klinikai vizsgálatokkal igazolták, hogy a gyulladás és a vastúlterhelés növeli, míg a hypoxia és az anémia csökkenti a hepcidinintermelést [5, 6]. A hepcidin szérumból és vizeletből is kimutatható, de az eddigi eredményekben a vizelethepcidin-szint szorosabb összefüggést mutatott a klinikai képpel, mint a szérumhepcidinszint [7]. Ennek hátterében a hepcidin viszonylag rövid plazma-féléletideje áll, ami miatt a plazmahepcidinszint rövid távon jelentősen ingadozhat. *Németh és munkatársainak* eredményei azt mutatják, hogy a vizelet hepcidinszintje haemocromatosisos és gyulladáshoz kapcsolódó anémiában szenvedő betegekben nagyságrendekkel emelkedik az egészségesekéhez képest. A kezelt haemocromatosisban szenvedő betegek vizelethepcidin-szintje minimálisan emelkedett az egészségesekéhez képest. A legmagasabb értékeket vastúlterhelt betegeknél mérték. Akut gyulladás során a vizelet hepcidinszintje szintén szignifikánsan nő. A vasháztartás paraméterei közül ezekben a vizsgálatokban csak a szérumferritinszint mutatott összefüggést a vizelet hepcidinszintjével [8].

A hepcidin vasháztartásban betöltött szerepének tisztázása segíthet a gyulladáshoz és krónikus betegségekben bekövetkező anémia jobb megértésében, emellett új diagnosztikus és terápiás célpontokat teremthet a vasanyagcsere-zavarokban, így haemocromatosisban és gyulladáshoz kapcsolódó anémiában.

### A vasháztartás gyors változásai a születés után

Felnőtteknél, illetve idősebb gyermekeknél a vasanyagcsere már elég jól ismert, és ilyenkor drasztikus változások csak ritkán, kóros esetekben fordulnak elő. A kisdetekortól az adolescens korig a vasháztartást elsősorban a növekedés és a fejlődés miatt jelentősen megnövekedett vasigény és -felszívódás jellemzi. Ezzel ellentétben a korai perinatalis időszakban hirtelen nagy vasszintes következik be, aminek az oka egyelőre ismeretlen. Ezért különösen érdekes lehet ebben az időszakban a vasszint-csökkentő hepcidin vizsgálata.

A születés után gyors dinamikájú, szélsőséges, a vasháztartás-változás mellett az antioxidáns rendszert érintő változások is zajlanak [9]. Erről azonban jelenleg igen kevés adat áll rendelkezésre. *Vahlquist és munkatársai* már 1941-ben leírták, hogy a születés pillanatában, a köldökzsinórvérben mérhető szérumvaszint magasabb a felnőttkori értékekhez képest, és később hirtelen, szélsőségesen mély szintre csökken közvetlenül a születés után (olyan alacsony szintre, amely szintén nem tapasztalható a későbbi élet során) [10]. Ezzel egyidejűleg a szérumtranszferrinszint nem változik, ami a transferrin szabadvas-kötő kapacitásának jelentős emelkedését eredményezi. Ezt néhány évvel később *Sturgeon és munkacsoportja* is megerősítette [11].

Kutatócsoportunk egyik korábbi munkájában a 48. életórán vett vérmintákban extrém alacsony szérumvaszinteket észlelt a köldökzsinórvérhez képest [12]. A jelenség magyarázata egyelőre pontosan nem ismert. Ugyanebben a vizsgálatban az újszülöttek negyedénél megszületéskor toxikus szabad vas jelent meg a szérumban, illetve az antioxidánskapacitás hirtelen megnőtt. Ez a megfigyelés hasonló *Lindemann és munkatársai* eredményeihez, amely szerint a megszületéskor gyakran detektálható szabad vas a 3. életnapra eltűnik a keringésből [13, 14]. Ezzel egyidejűleg a szérumtranszferrinszint nem változott, ami a transferrin szabadvas-kötő kapacitásának jelentős emelkedését eredményezte. A jelenség átmeneti: pár nap elteltével a szérumvaszint normalizálódik és lényegében nem változik az élet első 3 hónapja során.

Arra vonatkozóan, hogy a korai perinatalis időszakban a gyors vasszintcsökkenés és az antioxidánskapacitás gyors növekedésének hátterében pontosan mi áll, illetve hogy a nemrégiben felfedezett, a vasháztartásban szerepet játszó molekuláknak, például a hepcidinnek lehet-e szerepe ezekben a változásokban, illetve a vasraktárakból késő vasszintcsökkenésnek, egyelőre nem áll adat rendelkezésre.

## Célkitűzések

Munkánk kezdetén a hepcidin kimutatására alkalmas, kereskedelmi forgalomban elérhető módszer nem állt rendelkezésre. Elsődleges célunk az volt, hogy a hepcidin kimutatására alkalmas, könnyen kivitelezhető módszert dolgozzunk ki, valamint hogy ezen módszer segítségével vizsgáljuk a hepcidin jelentőségét a perinatalis vasháztartásban. Munkánk során egy, a vizelethepcidin-szint rutinszerű mérésére alkalmas, reprodukálható módszert kívántunk kifejleszteni. Ezzel kívántunk adatokat gyűjteni egészséges újszülöttek korai postnatalis adaptációja során a vizelethepcidin és előanyagának, a prohepcidin szérumszintjének a változásairól.

Elsődleges célunk volt molekulárisan jól jellemzett, egyszerűsített szerkezetű hepcidinszármazékok előállítása, amelyekre standardként van szükség a vizelethepcidin-szint mérésére alkalmas módszerek kidolgozá-

sához. Ennek során az alábbi kérdéseket kellett megoldani:

- 25 aminosavas lineáris, redukált hepcidinszármazék szintézise;
- biotinnal módosított hepcidinszármazékok szintézise immunabszorpciós módszerek fejlesztéséhez;
- a tömegspektrometriás mérésekhez belső standard szintézise: acetilcsoporttal módosított, lineáris, redukált 25 aminosavas hepcidinszármazék szintézise.

Ezt követően terveztük a vizelethepcidin kimutatására és szintjének mérésére alkalmas módszer kidolgozását:

- *immunalapú módszerekkel*: ennek során a kereskedelmi forgalomban elérhető hepcidinellenes antitestek, valamint a szintetizálni kívánt standard hepcidinszármazékok használatával, ELISA, dot blot, illetve Western-blot technikák alkalmazásával a vizelethepcidin-szint mérésére alkalmas eljárás kidolgozása;
- *tömegspektrométeres módszerrel*: a szintetizált standard hepcidinszármazék használatával, MALDI-TOF technika alkalmazásával a vizelethepcidin-szint mérésére alkalmas eljárás kidolgozása.

Egészséges, érett újszülöttek vizelethepcidin- és a szérumprohepcidin-szint vizsgálata megszületéskor, majd a születést követő első 48 órában. Ennek során a következő kérdésekre kerestünk választ:

- Változik-e a vizelethepcidin-, illetve a szérumprohepcidin-szint érett, egészséges újszülöttekben a születés utáni 48 órában a köldökzsinórvérhez képest?
- Összefügg-e a vizelethepcidin-, illetve a szérumprohepcidin-szint érett, egészséges újszülötteknél a születés utáni 48 órában bekövetkező vasszintváltozással?
- Összefügg-e a vizelethepcidin-, illetve a szérumprohepcidin-szint érett, egészséges újszülötteknél a születés utáni 48 órában bekövetkező antioxidánskapacitás-változással?
- Mutat-e összefüggést a vizelethepcidin-, illetve a szérumprohepcidin-szint érett, egészséges újszülötteknél a vörösvérsejtképzésre jellemző paraméterekkel?

## Módszerek és vizsgálati csoportok

### *Hepcidin és hepcidinszármazékok szintézise és kémiai jellemzése*

Munkánk során a natív hepcidin szekvenciájának [1, 2] megfelelően különböző aminosav-tagszámú, nyílt láncú peptidszármazékokat állítottunk elő: hepcidin-25 (1-25), C-terminális szegmens (13-25), N-terminális szegmens (1-7), valamint az N-terminális szegmens 5 glicinnel hosszabbított változata [(Gly)<sub>5</sub>-1-7]. Előállítottuk továbbá a fent említett nyílt láncú származékok N-terminálison módosított változatait: az 1-25 peptid acetilezett származékát (Ac1-25), a (Gly)<sub>5</sub>-1-7 peptid biotinnal módosított származékát [biotin-(Gly)<sub>5</sub>-1-7], valamint az 1-25, 1-7 és 13-25 peptid biotinil-Acp-vel módosított származékait: biotin-Acp-25, biotin-Acp-13-25, biotin-Acp-1-7.

A peptidek szintézise az *Fmoc/tBu* szilárd fázisú módszerrel történt [15, 16]. A szilárd hordozóról hasított peptidek és módosított származékok tisztítását, valamint a homogenitásuk ellenőrzését félpreparatív, fordított fázisú nagy nyomású folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) végeztük. A peptidek és származékok kémiai jellemzése és elsődleges szerkezetének bizonyítása tömegspektrometriával (ESI-MS, MALDI-TOF), valamint aminosav-analízissel történt. Az előállított peptidek szekvenciáját és jelöléseit az 1. táblázat mutatja.

### A hepcidin és származékainak funkcionális jellemzése immunmódszerekkel

A dot blot és a direkt, valamint a kompetitív ELISA vizsgálatokat a kereskedelmi forgalomban kapható antitestekkel és oxidált standard hepcidinmolekulával, továbbá az általunk szintetizált peptidszármazékokkal végeztük. A kereskedelmi forgalomban két nyúl-antihumanhepcidin-IgG-antitest volt elérhető munkánk kezdetén ( $\alpha$ -7,  $\alpha$ -13). Az  $\alpha$ -7 jelű antitest a 25 aminosavas hepcidin N-terminálison lévő 7, míg az  $\alpha$ -13 jelű a C-terminálison lévő 13 aminosavat ismeri fel (Alpha Diagnostic Inc.).

### Hepcidin kvantitatív kimutatása vizeletből

#### A vizelet szilárd fázisú extrakciója

A vizeletminták szilárd fázisú extrakcióját egyrészt a nemzetközi irodalomban már leírt módszerekkel (Macroprep gyanta [2, 17], NP20 Proteinchip [18, 19]), valamint többféle, gyors elválasztásra alkalmas SUPELCO típusú töltet segítségével végeztük. Teszteltük a Macroprep CM gyanta, valamint a tömegspektrometriás módszerek (elsősorban SELDI-TOF) során alkalmazott

1. táblázat | Az előállított peptidek szekvenciája. [A betűk az aminosavak egybetűs kódjai (IUPAC-nomenklatura, www.iupac.org), a számok az egyes aminosavak pozícióját jelzik a natív 25 aminosavat tartalmazó hepcidin aminosavsorrendje alapján]

A peptid jelölése és/ vagy neve	A peptid szekvenciája
Hepcidin-25 (1-25)	<sup>1</sup> DTHFPICIFCCGCCHRSKCGMCKCT <sup>25</sup>
N-terminális-szegmens (1-7)	<sup>1</sup> DTHFPIC <sup>7</sup>
C-terminális-szegmens (13-25)	<sup>13</sup> CCHRSKCGMCKCT <sup>25</sup>
(Gly) <sub>5</sub> -1-7	(Gly) <sub>5</sub> - <sup>1</sup> DTHFPIC <sup>7</sup>
Biotin-(Gly) <sub>5</sub> -1-7	Biotin-(Gly) <sub>5</sub> - <sup>1</sup> DTHFPIC <sup>7</sup>
Ac-1-25	Ac- <sup>1</sup> DTHFPICIFCCGCCHRSKCGMCKCT <sup>25</sup>
Biotin-Acp-25	Biotin-Acp- <sup>1</sup> DTHFPICIFCCGCCHRSKCGMCKCT <sup>25</sup>
Biotin-Acp-13-25	Biotin-Acp- <sup>13</sup> CCHRSKCGMCKCT <sup>25</sup>
Biotin-Acp-1-7	Biotin-Acp- <sup>1</sup> DTHFPIC <sup>7</sup>

NP20 proteinchip alkalmaságát a vizelet tisztítására és a vizelethepcidin koncentrációjára. Ezek mellett teszteltünk 7, gyors elválasztásra alkalmas SUPELCO típusú töltetet is (DSC-8, DSC-Ph, DSC-CN, DSC-18Lt, DSC-SAX, DSC-WCX és NH2).

#### A vizelethepcidin-szint mérése

##### MALDI-TOF tömegspektrometriás módszerrel

A MALDI-TOF tömegspektrometriás méréseket Bruker BIFLEX III típusú tömegspektrometriás készülékkel végeztük.

#### Egészséges újszülöttek

A vizsgálatba olyan egészséges, időre született újszülötteket vontunk be, akiknél a születést követő 72 órában betegség gyanúja miatt vérvételre volt szükség, azonban a laboratóriumi vizsgálatok eredményei nem igazolták patológias állapot fennállását. A vizsgálatba végül 20 egészséges, érett újszülöttet vontunk be. Az újszülöttektől köldökzsinórvér-mintát, majd betegségekre való gyanú esetén az első 72 óra során perifériás vérmintát vettünk. Ezekkel egy időben vizeletminták gyűjtésére is sor került.

A Mann-Whitney-féle U-tesztel hasonlítottuk össze a megszületéskor és a postnatalisan vett mintákban mért értékeket. Lineáris regresszióval, illetve logisztikus regresszióval határoztuk meg az erythropoiesis/vasházartás és a szérumprophepcidin-, valamint vizelethepcidin-szintek közötti összefüggéseket.

### Eredmények és megbeszélésük

#### Hepcidin és hepcidinszármazékok szintézise és kémiai jellemzése

A biotinnal módosított peptidszármazékokat antitest-antigén alapú, míg az acetilcsoporttal módosított peptidszármazékokat tömegspektrometriás alapú, vizelethepcidin mennyiségi meghatározására alkalmas módszer kidolgozására állítottuk elő. A szintetizált peptidszármazékok homogenitását RP-HPLC-vel ellenőriztük, a peptidek tisztasága a kromatogramok alapján 95% volt. Aminosav-analízissel bizonyítottuk a peptidek aminosav-összetételét. A számított és tömegspektrométerrel mért tömegadatok hibahatáron belüli egyezésével bizonyítottuk, hogy a kívánt peptideket állítottuk elő. A peptidek vízben jól oldódnak, oldhatóságuk a biológiai vizsgálatokhoz megfelelő koncentrációjú törzsoldatok (1–5 mg/ml) előállítását lehetővé tette. Peptidszármazékaink szabad ciszteint tartalmaznak, ezért ellenőriztük és igazoltuk a peptidek stabilitását szilárd, liofilizált állapotban, illetve 0,1% TFA-t tartalmazó vizes oldatban 4 °C-on történő tárolást követően. A liofilizátumok esetében ~5-6%, az oldatok esetében ~15% dimerizáció volt megfigyelhető 1 év alatt.

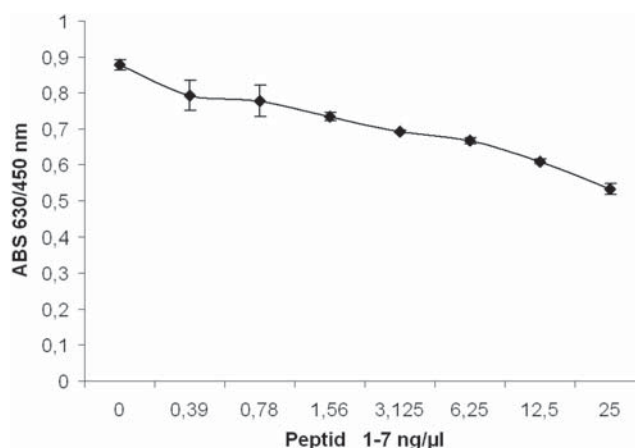


### A hepcidin és származékainak funkcionális jellemzése immunmódszerekkel

Dot blot kísérleteinket egy későbbi vizelethepcidin-szint mennyiségi meghatározására alkalmas módszer kidolgozásának a reményében végeztük. Ezek során az általunk szintetizált 1-25, 13-25 és 1-7 peptidszármazékokat, az antitesteket gyártó cég standardját, valamint egészséges felnőttek vizeletmintáit vizsgáltuk. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy az általunk szintetizált 1-25, 13-25 és 1-7 peptidszármazékok reagálnak a kereskedelmi forgalomban elérhető antitestekkel, az 1-25 peptidszármazék mindkét antitesttel. Az általunk szintetizált 1-25 peptidszármazék megegyező intenzitású foltokat adott az ugyanakkora koncentrációjú, kereskedelmi forgalomban elérhető standard peptiddel. Eredményeink alapján feltételeztük, hogy az általunk alkalmazott dot blot körülmények között, valamint az általunk használt antitestekkel és standardokkal nem tudunk megfelelően alacsony koncentrációtartományt elérni, amely szükséges lenne egy, a vizelethepcidin mennyiségi meghatározására alkalmas módszer kidolgozásához, ezért kísérleteink során a foltok intenzitását nem objektivizáltuk.

ELISA-kísérleteinket is egy későbbi vizelethepcidin-szint mennyiségi meghatározására alkalmas módszer kidolgozásának a reményében végeztük. A direkt ELISA-kísérleteket az N-terminálison biotincsoporttal módosított peptidszármazékokkal végeztük [biotin-Acp-1-25, biotin-Acp-13-25, biotin-Acp-1-7 és biotin-(Gly)<sub>5</sub>-1-7]. A mérések alapján megállapítottuk, hogy az N-terminálison módosított peptidszármazékokat felismerik a kereskedelmi forgalomban elérhető antitestek, a biotin-Acp-1-25 peptidet mindkét antitest felismeri. A kompetitív ELISA-eredmények alapján az 1-7 és biotin-Acp-1-7, valamint a (Gly)<sub>5</sub>-1-7 és biotin-(Gly)<sub>5</sub>-1-7 peptidpár esetében az  $\alpha$ -7 antitesttel mind az antitest-peptid reakció, mind a kompetíció megfelelően működik (1. ábra), amely 12,5 ng/ $\mu$ l-es biotinnal jelölt peptidkoncentráció esetében a legjobb. A 13-25 és biotin-Acp-13-25 peptidpár esetében az  $\alpha$ -13, valamint az 1-25 és biotin-Acp-1-25 peptidpár esetében az  $\alpha$ -7 és az  $\alpha$ -13 antitesttel nem sikerült megfelelő kompetíciót elérni, annak ellenére, hogy az antigén-antitest kapcsolat kialakult. Ezt az ELISA-körülmények között kialakuló dimerek, esetleg oligomerek magyarázhatják.

Az általunk szintetizált peptidszármazékok egy vagy több ciszteint tartalmaznak. A ciszteinek között intramolekuláris és intermolekuláris diszulfidhidak alakulhatnak ki. Az antitestalapú módszerek eredményeit befolyásolhatják a diszulfidhid-képződések, ezért vizsgáltuk az általunk szintetizált peptidszármazékoknál az általunk használt ELISA-körülmény között a diszulfidhidak képződését. Két módszerrel igazoltuk, hogy az általunk szintetizált rövid peptidszármazékok [1-7, biotin-Acp-1-7, (Gly)<sub>5</sub>-1-7 és biotin-(Gly)<sub>5</sub>-1-7] nem képeznek dimereket. A hosszabb peptidszármazékok (1-25, biotin-



1. ábra | A biotin-Acp-1-7 és az 1-7 peptidok kompetitív ELISA-reakciója. Jelölt peptidkoncentráció: 12,5 ng/ $\mu$ l

Acp-1-25, 13-25 és biotin-Acp-13-25) esetében intramolekuláris diszulfidhid és dimerek képződését is detektáltuk.

### A hepcidinszármazékok szintézisének és jellemzésének összegzése

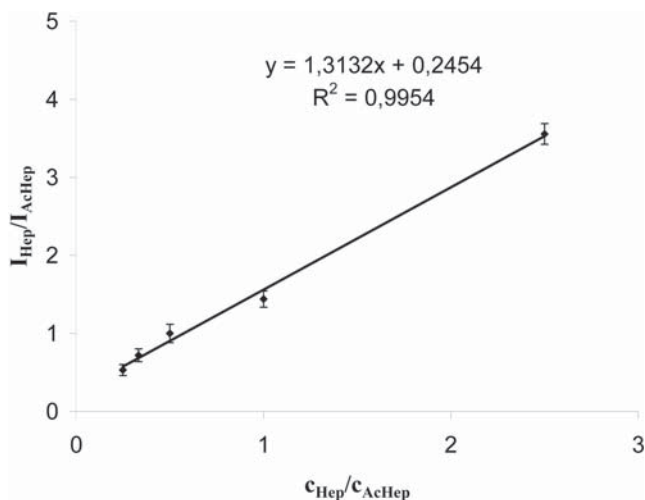
A natív hepcidin szintézise vagy izolálása összetett és technikailag nagy kihívást jelentő folyamat. Egy általánosan használható, akár a klinikai gyakorlatban, széles körben is elérhető vizelethepcidin-szint mennyiségi meghatározására alkalmas módszer kidolgozását nehezíti, hogy nincsen általánosan elérhető standard molekula. Az általunk szintetizált peptidszármazékok közül az egyszerűsített változatok [1-7 peptid, (Gly)<sub>5</sub>-1-7-származék] reagálnak a kereskedelmi forgalomban kapható antitestekkel, illetve a peptidpárokkal megfelelő kompetíciós reakció létrehozható. Ezek az egyszerűsített származékok akár helyettesíthetők a standardként használt 25 aminosavas vagy esetleg a natív formákat immunabszorpció módszerek kidolgozása, fejlesztése során, hiszen ezeknek az előállítására lényegesen egyszerűbb és olcsóbb.

### Hepcidin kvantitatív kimutatása vizeletből MALDI-TOF módszerrel

#### A vizelet szilárd fázisú extrakciója

Az irodalmi adatok alapján a vizelet hepcidinkoncentrációja többnyire alacsony, az alkalmazott módszerek kimutathatósági határához közelít, illetve a vizeletben több, a hepcidinnél nagyobb koncentrációban előforduló egyéb anyag és ion zavarhatja a kvantitatív méréseket. A vizelet direkt, tisztítás nélküli mérése MALDI-TOF módszerrel nem alkalmas a vizelethepcidin kvantitatív meghatározására. A vizeletminták direkt mérése eredményeink alapján nem volt megfelelően reprodukálható.

Teszteltük az irodalomban korábban közölt, a vizelet tisztítására és koncentrálására alkalmas módszereket (Macroprep [2, 17], NP20 Proteinchip [18, 19]).



2. ábra Az 1-25 és Ac-1-25 peptidek MALDI-spektrumán mért intenzitás aránya a koncentrációarányok függvényében

Macroprep gyantát a vizelethepcidin kimutatására és mérésére kidolgozott HPLC, illetve dot blot módszerek során használtak. A kationcserélő gyanta alkalmas a vizelet tisztítására és a hepcidin koncentrálására, azonban az előkészítési folyamat rendkívül időigényes és nehezen

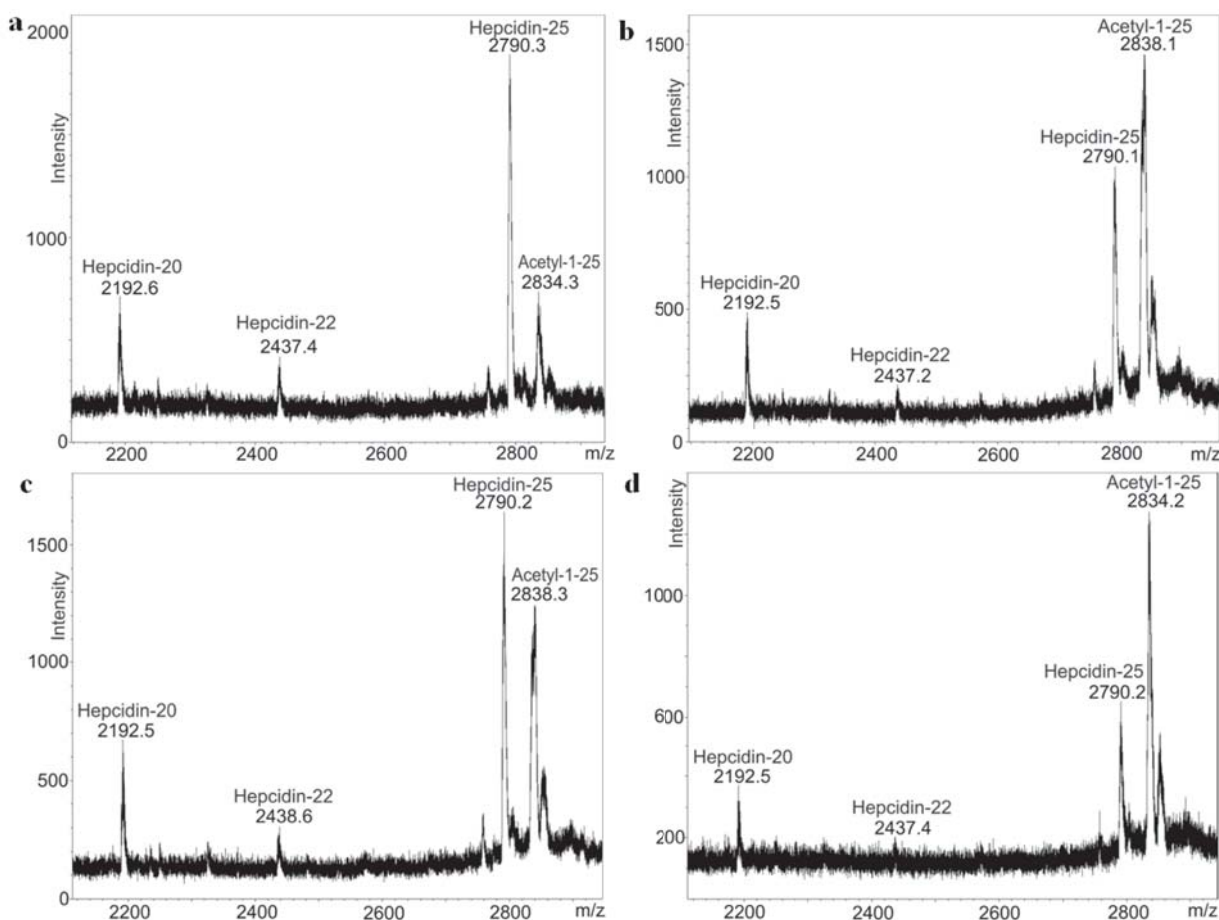
reprodukálható. Az NP20 proteinchipet SELDI-TOF-alapú, szemikvantitatív módszerek során használták korábban vizelet tisztítására [18, 19]. Előkísérleteink alapján a MALDI-TOF-mérések során hepcidin meghatározásához az NP20 proteinchip nem alkalmas a vizelet tisztítására. A fenti megállapítások miatt más, szilárdfázis-extrakcióra alkalmas módszert teszteltünk.

A könnyen kivitelezhető, jól reprodukálható, vizelet tisztítására és a hepcidin koncentrálására alkalmas eszköz megtalálása érdekében több szilárd fázisú extrakcióra (SPE) alkalmas töltetet próbáltunk ki. A hepcidin kémiai tulajdonságainak megfelelően 7 SPE töltetet választottunk és próbáltunk ki MALDI-TOF-körülmények között. Az eredményeink azt mutatták, hogy ezek alkalmasak a vizelet tisztítására és a hepcidin koncentrálására, valamint jól reprodukálhatók. A DSC-C8 típusú töltetet az abszolút és a relatív intenzitások alapján választottuk a további mérések elvégzéséhez.

### A vizelethepcidin-szint mérése

#### MALDI-TOF tömegspektrometriás módszerrel

A MALDI-TOF módszer során az általunk szintetizált Ac-1-25 hepcidinszármazékot hepcidinszerű belső stan-



3. ábra Egészséges önkéntes vizelethepcidin-koncentrációjának meghatározása különböző koncentrációjú belső standard peptid segítségével (a: 0,6; b: 3; c: 6; d: 18 mg/L)

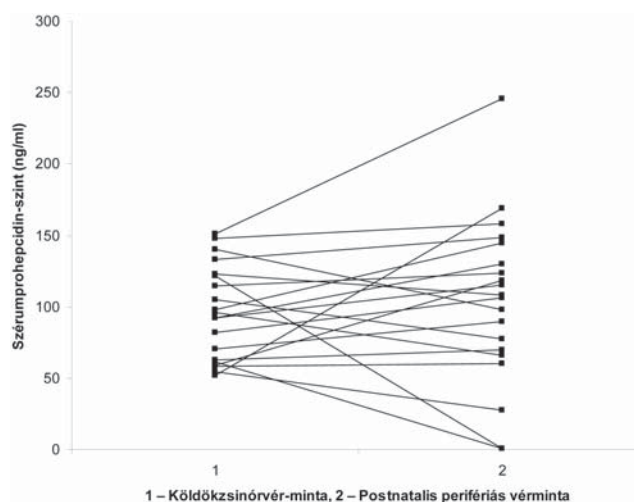
dardként használtuk. Az 1-25 (25 aminosavas, redukált hepcidinszármazék) és Ac-1-25 peptidszármazékok mátrixszal jól kristályosodtak és jól ionizálódtak a MALDI-TOF-mérések során. A mért molekulatömeg 2797,0 és 2839,9 Da volt az 1-25, illetve az Ac-1-25 peptidszármazékok esetében, emiatt a két származék a MALDI-spektrumokban teljesen elkülönülő csúcsokat adott. A két származék azonban nem teljesen azonos mértékben ionizálódott, ezért összehasonlítottuk azok ionizációs kapacitásukat. Az említett peptidszármazékokat különböző koncentrációarányokban elegyítettük, majd ezt követően egyenként vettük fel a MALDI-spektrumot. A peptidek koncentrációjának ( $c_{\text{Hep}}/c_{\text{AcHep}}$ ) és csúcsaik intenzitásának arányát ( $I_{\text{Hep}}/I_{\text{AcHep}}$ ) a 2. ábra mutatja. Az egyenes jól illeszkedik a mért pontokra ( $R^2 = 0,9954$ ). Az  $I_{\text{Hep}}/I_{\text{AcHep}}$  hányados egyenesen arányos a  $c_{\text{Hep}}/c_{\text{AcHep}}$  hányadossal. (A peptidek tisztasága és peptidtartalma nem különbözött hibahatáron belül egymástól.) Az egyenes meredeksége 1,31-nak adódott. Ezen eredmények alapján az 1-25 peptid némileg jobban ionizálódik MALDI-TOF-körülmények között, mint az Ac-1-25 peptid, illetve a peptidek közötti ionizációs hatékonyságbeli különbség 0,2-2,5 koncentrációarányú ( $c_{\text{Hep}}/c_{\text{AcHep}}$ ) tartományon belül nem változott szignifikánsan.

Vizsgáltuk azt is, hogy az ugyanolyan arányban elegyített peptidek intenzitásaránya változik-e a különböző abszolút koncentrációk függvényében. A két peptidet 1:1 arányban, de különböző koncentrációban elegyítettük, majd az elegykről MALDI-TOF-spektrumot készítettünk. A peptidek mért intenzitásaránya ( $I_{\text{Hep}}/I_{\text{AcHep}}$ ) nem különbözött szignifikánsan a kalibrációs egyenes függvényéből számolt ( $y = 1,3132$ ) intenzitásaránytól (átlag: 1,412; SD: 0,123;  $p = 0,147$ ). Vizsgáltuk továbbá a belső standard peptid koncentrációjának a számított vizelethepcidin-koncentrációra gyakorolt hatását.

Egészséges önkéntes vizeletmintáját hat különböző koncentrációjú belső standard oldattal elegyítettük, majd a tisztítást követően készítettük a MALDI-TOF-spektrumokat (ezek közül négy spektrumot a 3. ábra mutat). A vizelethepcidin-koncentrációt a korábban megállapított kalibrációs függvény segítségével számoltuk ki. Ezekből megállapítottuk, hogy a vizeletmintához adott belső standard peptid koncentrációjának minimális hatása van a számított vizelethepcidin-koncentrációra, ezért az újszülöttek vizeletmintájának hepcidinkoncentrációját két ponton határoztuk meg.

#### A vizelethepcidin-szint szemikvantitatív mérésének összegzése

Kidolgoztunk a vizelet tisztítására és a vizelethepcidin koncentrálására alkalmas, a korábban ismert módszerekhez képest könnyen és gyorsan kivitelezhető, szilárd fázisú extrakción alapuló módszert, valamint elsőként dolgoztunk ki és írtunk le egy vizelethepcidin-koncentráció meghatározására alkalmas MALDI-TOF-alapú szemikvantitatív módszert, hepcidinszerű belső standard peptidszármazék segítségével. Ez az új módszer alternatívája



4. ábra | A szérumprophepcidin-szint megszületéskor és a korai postnatalis időszakban. Postnatalis mintavétel ideje (óra; medián; tartomány): 39; 18-114

lehet a korábban már leírt SELDI-TOF-alapú módszereknek.

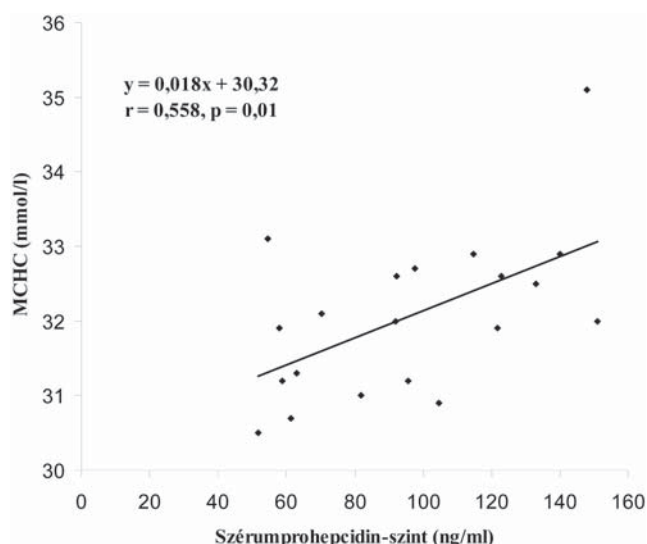
#### Egészséges újszülöttek

Vizsgálatunkban az egészséges újszülöttek vérképzést és vasháztartást jellemző szérumbiológiai paraméterei megfelelnek az irodalomban leírt korszpecifikus értékeknek. Postnatalisan a vörösvérsejtképzést és a vasháztartást jellemző laboratóriumi paraméterek is az irodalomban eddig közöltekhez hasonló változásokat mutattak [10, 12, 20]. A vörösvértestszám, a hemoglobin, a hematokrit, a vörösvértestek átlagos hemoglobinkoncentrációja (mean corpuscular hemoglobin concentration – MCHC) és a ferritinszintek szignifikánsan magasabbak, míg a vas- és a transferrinszintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a postnatalis szérumbiológiai mintákban, mint a köldökzsinórmintákban.

#### Prohepcidin

Méréseink során minden újszülött szérumbiológiai mintájában, mind a köldökzsinór, mind a postnatalis perifériás mintákban kimutattunk prohepcidint. Több újszülött esetében megfigyeltünk szérumprophepcidinszint-emelkedést a vizsgált időszak alatt, ami jelzi, hogy az újszülöttek is termelnek prohepcidint (állatkísérletes adatok szerint a magzat is képes hepcidin termelésére). Szignifikáns különbséget azonban nem találtunk a két csoport között [medián, tartomány; köldökzsinórvér: 93,92 (51,81–150,93); postnatalis minta 107,15 (0,32–245,44 ng/ml)], annak ellenére, hogy az újszülöttek nagyobbik részében (13/20) a szérumprophepcidin-szintek postnatalisan növekedtek (4. ábra). A köldökzsinórvérben kimutatott szérumprophepcidin eredete azonban egyelőre kérdéses, nem tudhatjuk biztosan, hogy magzati vagy anyai eredetű, amely átjutott a placentán. A szérumprophepcidin





5. ábra | A szérumphepcidin-szint és az MCHC közötti összefüggés köldökzsinórvérben

hepcidin-szintek nem mutattak összefüggést a vérképzést és a vasháztartást jellemző paraméterekkel, kivéve az MCHC-t (5. ábra), amely a köldökzsinórvér-mintákban mutatott összefüggést a szérumphepcidinnel ( $r = 0,56$ ,  $p = 0,013$ ).

A korábbi tanulmányok szerint a prohepcidin felnőttekben sem mutat összefüggést a vasháztartással, bár hereditár haemochromatosisos betegekben szignifikánsan alacsonyabb a szérumphepcidin-szint az egészséges felnőttekhez képest [21, 22]. Az általunk kimutatott összefüggés a szérumphepcidin és az MCHC között kizárólag a köldökzsinórvér-mintákra áll fenn. Ez az eredmény azért lehet fontos, mert az általában használt paraméterek nem tükrözik megfelelően a magzati vasraktárakat. Néhány paraméter a gesztációs kortól [mint a vörösvértestek átlagos térfogata (MCV) és a vörösvértestek átlagos hemoglobintartalma (MCH)] függ, míg más paramétereket (szérumvas, -ferritin, -hemoglobin, -hematokrit) a fiziológias stressz és a köldökzsinór leszorításának az ideje is befolyásol. Az oxidatív stressz okozta hemolízisnek szintén hatása van az MCV-re az első életnapon. Az MCHC független ezektől a faktoroktól és akár megfelelően mutathatja a magzat utolsó trimeszterének vasellátottságát, mint ahogy ezt korábban *Nicolas és munkatársai* is felvetették [23]. A prohepcidin és az MCHC közötti összefüggés felveti, hogy a prohepcidin a magzat vasellátottságát jelezheti és talán szerepe is lehet abban.

A fehérjéhez nem kötött vas (non-protein bound iron – NPBI) a köldökzsinórvér és a postnatalis minták mintegy harmadában volt kimutatható. A köldökzsinórvér-mintákban szignifikánsan alacsonyabb volt azon újszülöttek ( $n = 6$ ) szérumphepcidin-szintje, akiknél kimutatható NPBI volt a szérumban, mint akiknél nem (64,51; 81–121,81 vs. 101,14; 54,43–150,93 ng/ml,  $p = 0,047$ ). Az NPBI nem mutat összefüggést a vasszin-

tekkal, elképzelhető azonban, hogy a prohepcidin összefügg az antioxidáns védekezőképességgel.

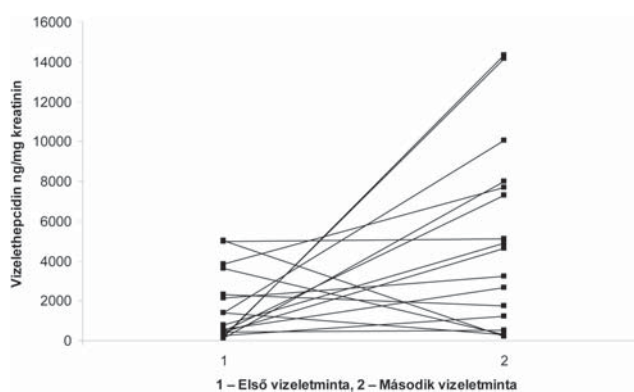
### Hepcidin

Az általunk kidolgozott vizelethepcidin-szint mennyiségi meghatározására alkalmas szemikvantitatív módszerrel határoztuk meg a kiválasztott újszülöttek vizelethepcidin-szintjét. Szérumphepcidin-szinteket vizsgálatainkkal egy időben mértek újszülöttekben [24], arról azonban, hogy vizelethepcidin-szinteket mértek volna, még nem jelent meg közlemény.

Tizenhét újszülött esetében határoztuk meg a megszületéskor és a postnatalisan vett vizeletben a hepcidinszintet. Méréseink során néhány mintában a vizelethepcidin a kimutathatósági határ alatt maradt, ez vonatkozik mind a születés utáni első, mind a második vizeletminta-csoportra. Az újszülöttek vizelethepcidin-szintjei számos esetben az egészséges felnőttekben közzölt értékek egészséges referenciatartományának többszörösét érték el [25, 26].

A vizelethepcidin-szintek postnatalisan növekedtek 11/17 gyermeknél [medián, tartomány; megszületéskor: 0 (0–5016), postnatalisan: 3647 (0–14359) ng/mg kreatinin;  $p = 0,013$ ; lásd az alábbi ábrát]. A különbség a két csoport között szignifikáns volt, a vizelet hepcidin-szintje növekedett postnatalisan. Az összefüggés a mintavétel időpontjára vonatkozó korrekció után is fennáll (6. ábra).

A vizelethepcidin-szint összefüggött a szérumvasszinttel és a teljes vaskötő kapacitás értékeivel, viszont független volt a vérképzést jellemző paraméterektől, valamint a CRP-, az NPBI-, illetve a szérumphepcidin-szintektől. (Az irodalomban felnőttvizsgálatok is mutattak ki összefüggést a vizelethepcidin és a vérképzést, valamint a vasháztartást jellemző paraméterek között mind egészséges, mind betegcsoportokban [7, 27, 28, 29].) A szérumphepcidin- és a vizelethepcidin-szintek mintacsoportunkban egymással nem mutatnak összefüggést. A korábbi felnőttvizsgálatok sem mutattak ki összefüggést a vizelethepcidin, valamint a szérumphepcidin között. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a prohepcidin



6. ábra | A szérumphepcidin-szint és az MCHC közötti összefüggés köldökzsinórvérben



valóban egy prekursor molekula, amely nem mutat hep-  
cidinszerű hatásokat.

A vizelethepcidin-szint emelkedésével újszülöttekben  
csökken a szérumsavas, valamint a teljes vaskötő kapacitás  
szintje is. A hepcidin emelkedésével bekövetkező  
szérumsavszint-csökkenés megfelel a hepcidin fiziológiai  
hatásaival kapcsolatos eddigi eredményeknek, azonban a  
teljes vaskötő kapacitás csökkenését nem magyarázza. Az  
általunk vizsgált csoportban, valamint a korábbi vizsgá-  
lati csoportban [12] a szérumsavas teljes vaskötő kapacitása  
nem mutatott szignifikáns változást a születést követő  
néhány napban. Nem volt összefüggés a vizelethepcidin-  
szintek és az NPBI megjelenése között sem. Ennek elle-  
nére elképzelhető, hogy a hepcidin és a teljes vaskötő  
kapacitás között fennálló szoros összefüggés az újszülöt-  
tek születés után hirtelen emelkedő szabadgyök-terhe-  
lésével, valamint az ezzel párhuzamosan emelkedő anti-  
oxidáns védekezéssel hozható kapcsolatba.

### Az egészséges újszülöttek eredményeinek összegzése

Eredményeink alapján összefoglalásként elmondhatjuk,  
hogy a hepcidinnek szerepe lehet az újszülöttek korai,  
a vasháztartást érintő adaptációjában, mivel a szérumsavas  
szintjének hirtelen csökkenésével egyidejűleg a vizelet-  
hepcidin-szint szignifikáns növekedést mutatott a szüle-  
tést követő néhány napban az általunk vizsgált csoport-  
ban.

### Irodalom

- [1] Krause, A., Neitz, S., Magert, H. J. és mtsai: LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.*, 2000, 480, 147–150.
- [2] Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J. és mtsai: Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 7806–7810.
- [3] Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J. és mtsai: Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 2004, 306, 2090–2093.
- [4] Kulaksiz, H., Gehrke, S. D., Janetzko, A. és mtsai: 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.
- [5] Roy, C. N., Andrews, N. C.: Anemia of inflammation: the hepcidin link. *Curr. Opin. Hematol.*, 2005, 12, 107–111.
- [6] Lee, P., Peng, H., Gelbart, T. és mtsai: Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, 1906–1910.
- [7] Kearney, S. L., Nemeth, E., Neufeld, E. J. és mtsai: Urinary hepcidin in congenital chronic anemias. *Pediatr. Blood Cancer*, 2007, 48, 57–63.
- [8] Nemeth, E., Valore, E. V., Territo, M. és mtsai: Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*, 2003, 101, 2461–2463.
- [9] Oski, N.: Hematologic problems in the newborn. WB Saunders, New York, 1982.
- [10] Vahlquist, B.: Das Serumeisen: eine paediatrisch-klinische und experimentelle Studie. *Acta Paediatr.*, 1941, 28, 171–189.
- [11] Sturgeon, P.: Studies on iron requirements in infants and children. *Pediatrics*, 1954, 13, 107–124.
- [12] Szabo, M., Vasarhelyi, B., Balla, G. és mtsai: Acute postnatal increase of extracellular antioxidant defence of neonates: the role of iron metabolism. *Acta Paediatr.*, 2001, 90, 1167–1170.
- [13] Lindeman, J. H. N., Houdkamp, E., Lentjes, E. G. és mtsai: Limited protection against iron-induced lipid peroxidation by cord blood plasma. *Free Radic. Res.*, 1992, 16, 285–294.
- [14] Lindeman, J. H., van Zoeren-Grobbe, D., Schrijver, J. és mtsai: The total free radical trapping ability of cord blood plasma in preterm and term babies. *Pediatr. Res.*, 1989, 26, 20–24.
- [15] Atherton, E., Fox, H., Harkiss, D. és mtsai: A mild procedure for solid phase peptide synthesis: Use fluorenylmethoxy-carbonyl-amino-acids. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1978, 537–540.
- [16] Carpino, L. A., Han, G. Y.: The fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J. Org. Chem.*, 1972, 37, 3404–3409.
- [17] Zhang, Y., Lewis, K.: Fabatins: new antimicrobial plant peptides. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1997, 149, 59–64.
- [18] Kemna, E., Tjalsma, H., Laarakkers, C. és mtsai: Novel urine hepcidin assay by mass spectrometry. *Blood*, 2005, 106, 3268–3270.
- [19] Tomosugi, N., Kawabata, H., Wakatabe, R. és mtsai: Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using Protein Chip System. *Blood*, 2006, 108, 1381–1387.
- [20] Martin, M. E., Nicolas, G., Hetet, G. és mtsai: Transferrin receptor 1 mRNA is downregulated in placenta of hepcidin transgenic embryos. *FEBS Lett.*, 2004, 574, 187–191.
- [21] Taes, Y. E., Wuyts, B., Boelaert, J. R. és mtsai: Prohepcidin accumulates in renal insufficiency. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2004, 42, 387–389.
- [22] Hsu, S. P., Chiang, C. K., Chien, C. T. és mtsai: Plasma prohepcidin positively correlates with hematocrit in chronic hemodialysis patients. *Blood Purif.*, 2006, 24, 311–316.
- [23] Nicolas, G., Bennoun, N., Porteu, A. és mtsai: Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 4596–4601.
- [24] Tiker, F., Celik, B., Tarcan, A. és mtsai: Serum pro-hepcidin levels and relationships with iron parameters in healthy preterm and term newborns. *Pediatr. Hematol. Oncol.*, 2006, 23, 293–297.
- [25] Kemna, E., Pickkers, P., Nemeth, E. és mtsai: Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood*, 2005, 106, 1864–1866.
- [26] Roecker, L., Meier-Buttermilch, R., Brechtel, L. és mtsai: Iron-regulatory protein hepcidin is increased in female athletes after a marathon. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 2005, 95, 569–571.
- [27] Papanikolaou, G., Tzilianos, M., Christakis, J. I. és mtsai: Heparin in iron overload disorders. *Blood*, 2005, 105, 4103–4105.
- [28] Detivaud, L., Nemeth, E., Boudjema, K. és mtsai: Heparin levels in humans are correlated with hepatic iron stores, hemoglobin levels, and hepatic function. *Blood*, 2005, 106, 746–748.
- [29] Nemeth, E., Roetto, A., Garrozo, G. és mtsai: Heparin is decreased in TFR2 hemochromatosis. *Blood*, 2005, 105, 1803–1806.

(Balogh Ádám dr.,  
Budapest, Bókay J. u. 53., 1083  
e-mail: balad@gyerl.sote.hu)