

ANALIZA EKSPRESIJE DIVALENTNOG METALNOG TRANSPORTERA 1 I FEROPORTINA 1 U INTESTINALNOJ SLUZOKOŽI PEDIJATRIJSKIH PACIJENATA SA KRONOVOM BOLEŠĆU

UVOD

Inflamatorna bolest creva (IBC) je hronična, imunski-posredovana i progresivna bolest gastrointestinalnog sistema. Obuhvata dve velike grupe pacijenata – one sa Kronovom bolešću i one sa ulceroznim kolitisom. Iako se bolest može prezentovati u bilo kom životnom dobu, oko jedne trećine bolesnika živi sa oboljenjem od ranog detinjstva ili adolescencije (1). Pedijatrijski IBC se značajno razlikuje od adultne forme bolesti. Pedijatrijski pacijenti neretko imaju teži oblik oboljenja i češće ekstraintestinalne manifestacije praćene usporenim rastom i razvojem. Osim toga, značajno je i sociopsihološko opterećenje doživotne hronične bolesti (1). Jedna od najčešćih ekstraintestinalnih komplikacija je anemija, koja se javlja u značajnom broju pacijenata. Njena prevalencija varijabilna je u literaturi, ali određena istraživanja pokazuju da čak i do 90% pedijatrijskih pacijenata može imati znakove anemijskog sindroma u sklopu prve prezentacije bolesti (2). Glavni uzroci nastanka anemije kod pacijenata sa IBC su deficit gvožđa i anemija usled hroničnih bolesti, iako je etiologija često kombinovana (2). Kod pacijenata sa IBC deficit gvožđa javlja se usled njegovog povećanog gubitka, smanjenog unosa ili malapsorpcije (3). Klinička slika anemijskog sindroma uključuje nespecifične simptome i znake, poput: zamora, glavobolje, vrtoglavice, dispneje, tahikardije, bledila kože i sluzokože i drugih znakova, ili može biti asimptomatska. Pokazano je da anemijski sindrom, bilo simptomatski ili asimptomatski, značajno smanjuje kvalitet života pacijenata (2,4). Dijagnoza se postavlja na osnovu anamnestičkih, objektivnih i laboratorijskih parametara, a standardni laboratorijski kriterijumi za dijagnozu anemijskog sindroma uključuju analize hemoglobina i hematokrita, broja eritrocita i retikulocita, serumski feritin, transferin, CRP i druge relevantne parametre (5).

Obzirom da ne postoji adekvatan mehanizam eliminacije prekomernog gvožđa iz organizma, njegovi nivoi zavise pretežno od pažljivo regulisane intestinalne apsorpcije (3). Prosečni dnevni unos gvožđa je 10 do 15 mg, dok se samo 10-20% apsorbuje, pretežno u hem obliku. Non-hem gvožđe, koje se najčešće nalazi u trivalentnoj formi mora se prevesti u fero oblik enzimskom redukcijom u želucu pre apsorpcije. Divalentni metalni transporter 1 (DMT1), koji se nalazi pretežno na duodenalnoj sluznici, odgovoran je za transport gvožđa kroz apikalnu membranu enterocita. Tada ima dvojnu sudbinu – može preko transportera feroportina 1 (FPN1) na bazolateralnoj membrani biti dopreman do krvi ili biti deponovan u obliku feritina da bi bio ekskretovan pri eliminaciji enterocita koji se normalno dešava svakih 5 dana (6). Hepcidin, protein akutne faze, igra ključnu ulogu u regulaciji gvožđa, inhibirajući njegovu apsorpciju u digestivnom traktu i oslobađanje iz makrofaga i depoa u hepatocitima. Vezujući se za feroportin izaziva njegovu internalizaciju i degradaciju. Sinteza hepcidina regulisana je nivoom gvožđa i eritropoetskom aktivnošću. Međutim, u inflamatornim stanjima poput IBC, sinteza hepcidina je povećana usled inflamacije što može doprineti pogoršanju anemijskog sindroma pacijenata (7).

Iako je primarno mesto apsorpcije gvožđa duodenum, novija istraživanja pokazuju da i kolon igra važnu ulogu u ovom procesu (8). Zastupljenost DMT1 slična je u svim segmentima kolona kao i u duodenumu, dok je nivo feroportina tek jedna četvrtina one u duodenumu (8). Određene studije ukazuju da u IBC dolazi do ushodne regulacije ovih transportera kako u duodenumu, tako i u kolonu kao kompenzatorni mehanizam korekcije anemije (8,9).

Međutim, istraživanje *Wu* i saradnika (10) je pokazala značajno nižu ekspresiju DMT1 i ferroportina u aktivnoj IBC. Novije studije bave se ulogom DMT1 i FPN1 u patofiziologiji različitih organskih sistema, kao i novim načinima stimulacije receptora u regulaciji anemije (11-13). Stimulisanje degradacije receptora DMT1 dovodi do smanjene ferroptoze što poboljšava ishod različitih patoloških stanja (11,12). U mišjim modelima pokazano je da su manje naglašene rane povrede mozga nakon subarahnoidalne hemoragije (11) i da je povoljniji ishod akutne plućne povrede (12). Određene aminokiseline povećavaju ekspresiju DMT1 u enterocitima i samim tim apsorpciju gvožđa kod miševa sa insuficijencijom gvožđa (13).

Uprkos napretku u razumevanju inflamatornih bolesti creva kod dece, patofiziološki poremećaji homeostaze gvožđa ostaju nedovoljno istraženi. Posebno je nejasna moguća uloga terminalnog ileuma kao mesta apsorpcije gvožđa.

RADNA HIPOTEZA

Pacijenti sa Kronovom bolešću imaju izmenjenu ekspresiju transportera gvožđa DMT1 i FPN1 u intestinalnoj sluzokoži, što doprinosi poremećenom transportu gvožđa, pogoršanju sideropenijske anemije i poremećaju homeostaze metabolizma gvožđa u organizmu.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Analizirati ekspresiju membranskih transportera gvožđa DMT1 i FPN1 u intestinalnoj sluzokoži duodenuma i terminalnog ileuma pacijenata sa Kronovom bolešću u poređenju sa kontrolnom grupom.
2. Porediti ekspresiju membranskih transportera gvožđa DMT1 i FPN1 u intestinalnoj sluzokoži duodenuma i terminalnog ileuma između prvog i kontrolnog pregleda kod pacijenata sa Kronovom bolešću
3. Utvrditi povezanost između promene ekspresije membranskih transportera DMT1 i FPN1 i kliničkih, endoskopskih i laboratorijskih pokazatelja sideropenijske anemije kod pedijatrijskih pacijenata sa Kronovom bolešću.

MATERIJAL I METODE

Tip studije

Retrospektivna kohortna studija.

Mesto i period istraživanja

Iz arhive Instituta za patologiju „Prof. dr Đorđe Joannović“ Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu izdvojiće se parafinski kalupi i rutinski sečeni i obojeni histopatološki preparati obojeni hematoksilin i eozin (HE) metodom pacijenata koji pripadaju i studijskoj i kontrolnoj grupi. Za korišćenje parafinskih kalupa iz arhive dobijeno je odobrenje upravnika Instituta za patologiju (zavedeno u Institutu za patologiju pod brojem 02-260/25). Imunohistohemijsko bojenje i analiza histopatoloških preparata će se obaviti u laboratoriji Instituta za patologiju. Klinički, laboratorijski i endoskopski nalazi pacijenata

biće obezbeđeni iz medicinske dokumentacije Univerzitetske dečje klinike u Beogradu (broj dozvole Etičkog odbora Univerzitetske dečje klinike 017-16/224).

Selekcija ispitanika

Istraživanje će uključivati studijsku i kontrolnu grupu pedijatrijskih pacijenata lečenih na Univerzitetskoj dečjoj klinici u Beogradu čije su biopsije gastrointestinalnog trakta obrađene na Institutu za patologiju „Prof. dr Đorđe Joannović“ u periodu od 1.1.2019. do 31.12.2025. godine. Kriterijumi za uključivanje u studijsku grupu biće: postavljena dijagnoza Kronove bolesti na osnovu kliničkih, endoskopskih i histopatoloških kriterijuma, pedijatrijski pacijenti (uzrast <18 godina), dostupna biopsija duodenuma i terminalnog ileuma i laboratorijski podaci u trenutku uzorkovanja (hemoglobin, hematokrit, broj eritrocita, serumsko gvožđe, feritin). Kriterijumi za isključivanje iz studije biće: prisustvo drugih inflamatornih ili autoimunskih bolesti gastrointestinalnog trakta (npr. celijačna bolest) ili malignih tumora, nedostatak adekvatnog biopsijskog materijala, neadekvatni ili nepotpuni klinički i laboratorijski podaci, terapija preparatima gvožđa ili transfuzije u periodu kraćem od 3 meseca pre uzorkovanja. Kontrolnu grupu će činiti pacijenti kojima je iz drugih razloga urađena endoskopija digestivnog trakta sa biopsijom, pri čemu nije utvrđeno prisustvo IBC ili drugih inflamatornih ili autoimunskih bolesti uz uredan histopatološki nalaz u sluznici creva, sa dostupnom biopsijom duodenuma i terminalnog ileuma i koji u trenutku pregleda nisu imali laboratorijske znake anemijskog sindroma. Za svakog pacijenta biće prikupljeni demografski (pol i uzrast), klinički (simptomi i znaci bolesti), laboratorijski (krvna slika, biohemijske analize: glukoza, urea, kreatinin, AST, ALT, alkalna fosfataza, GGT, bilirubin, albumin, CRP; i laboratorijske analize za dijagnostiku anemijskog sindroma: hemoglobin, hematokrit, broj eritrocita, serumsko gvožđe, feritin, saturacija transferina, TIBC, transferin, vitamin B12, folati), endoskopski i histopatološki podaci u momentu uzorkovanja biopsije. Poređiće se nalazi inicijalnog i kontrolnog pregleda načinjenog godinu dana nakon inicijalnog pregleda.

INSTRUMENTI I MERENJA

Imunohistohemijska analiza

U cilju utvrđivanja ekspresije DMT1 i FPN1 u intestinalnoj sluzokoži pacijenata sa dijagnozom Kronove bolesti, biće sprovedena imunohistohemijska bojenja na isečcima sluznice duodenuma i terminalnog ileuma. Sa svakog odabranog parafinskog kalupa seći će se preseci debljine 4 do 5 µm. Nakon deparafinizacije i antigenskog demaskiranja, učiniće se blokiranje nespecifičnog vezivanja. Zatim će se vršiti obeležavanje primarnim antitelom isečaka na DMT1 (*Proteintech*, 20507-1-AP) i FPN1 (*Elabscience*, E-AB-17960) uz upotrebu odgovarajućih kitova za detekciju. Za detekciju bojenja, koristiće se DAB supstrat dok se ne pojavi smeđa boja na mestima ekspresije transportera. Za kontrastiranje biće korišćen hematoksilin. Imunohistohemijsko bojenje će biti sprovedeno manuelno, u skladu sa uputstvima proizvođača za svako antitelo posebno. Vizualizacija pozitivnog bojenja se zasniva na primeni streptavidin-biotin tehnike. DMT1 je membranski transporter koji je lokalizovan na apikalnoj, dok je feroportin ekspimiran na bazolateralnoj membrani enterocita. Intenzitet bojenja zavisi od količine transportera u uzorku. Za pozitivnu kontrolu koristiće se preseci jetre inkubirani sa primarnim anti-DMT1 i anti-FPN1 antitelom, dok će negativna kontrola biti izvedena izostavljanjem primarnog antitela

Kvantifikacija

Vizuelna analiza: Mikroskopijom pod velikim uveličanjem (x400) ocenjivaće se prisustvo boje i njenu lokalizaciju.

Morfometrijska analiza: Analiza slika biće izvršena u *ImageJ* programu (besplatan softver dostupan na linku <http://imagej.nih.gov/ij/>). Analiziraće se od 2 do 10 odabranih PVMU (polja sa najvećim brojem pozitivno obojenih ćelija). Nakon selekcije signala u spektru boje odgovarajućeg hromogena, izdvojiće se pozitivni signali, a zatim će se odrediti procenat površine vidnog polja sa pozitivnom imunohistohemijskom reakcijom. Kao rezultat analize izračunaće se srednja vrednost procenta pozitivne površine za sva analizirana vidna polja.

Veličina uzorka

Potrebna minimalna veličina uzorka za detekciju veličine efekta od 0.33 u analizi varijanse 2 ponovljena merenja sa međugrupnim faktorom za ekspresiju transportera DMT1 i FPN1 za nivo statističke značajnosti od 0.05, statističku snagu od 0.9, pretpostavljene korelacije ponovljenih merenja od 0,3 i korekcije za narušavanje sferičnosti od 1 iznosi 36 ispitanika. Veličina efekta dobijena je na osnovu pretpostavljenih odnosa vrednosti objašnjene i rezidualne varijanse od 0.1 prema 0.9. Izračunati minimalni broj ispitanika (36) je povećan za 20% zbog očekivanog gubitka podataka tokom trajanja studije (nedostajući ili neprimenljivi podaci) pa je konačan minimalan broj ukupnih planiranih ispitanika 44. Minimalni broj ispitanika biće ravnomerno raspoređen između ispitivane i kontrolne grupe sa približno jednakim brojem ispitanika u svakoj grupi.

STATISTIČKA ANALIZA

Zavisno od tipa varijabli i normalnosti raspodele, deskripcija podataka biće prikazana kao n (%), aritmetička sredina±standardna devijacija ili medijana (min-max). Od metoda za testiranje statističkih hipoteza koristiće se: t-test, *Mann-Whitney* test, hi-kvadrat test, *Fisherov* test tačne verovatnoće, *Wilcoxonov* test, *McNemarov* test, Analiza varijanse ponovljenih merenja sa međugrupnim faktorom. Od metoda za analizu povezanosti primeniće se *Pearsonov* koeficijent linearne korelacije ili *Spearmanov* koeficijent korelacije rangova. Za modelovanje odnosa zavisne varijable sa potencijalnim prediktorima koristiće se regresioni modeli.

Statističke hipoteze biće testirane na nivou statističke značajnosti (alfa nivo) od 0,05.

Rezultati će biti prikazani tabelarno i grafički.

Svi podaci biće obrađeni u *IBM SPSS Statistics 26 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA)* softverskom paketu ili R programskom okruženju (*R Core Team, 2025*).

PROCENA KANDIDATA O POTENCIJALNOM NAUČNOM DOPRINOSU

Anemijski sindrom česta je ekstraintestinalna manifestacija pedijatrijskih pacijenata sa inflamatornom bolešću creva. Ova doktorska disertacija ima značajan potencijal da doprinese razumevanju kompleksne patofiziologije homeostaze gvožđa u okviru Kronove bolesti. Analiza ekspresije transportera gvožđa DMT1 i FPN1 u intestinalnoj sluzokoži može pružiti nova saznanja o tome kako inflamacija utiče na funkciju ovih transportera i time na apsorpciju gvožđa u probavnom sistemu. Povezanost između promenjene ekspresije ovih transportnih sistema i razvoja sideropenijske anemije može biti klinički značajna, jer bi

omogućila preciznije postavljanje dijagnoze i blagovremeno lečenje, kao i sekundarnu prevenciju. Ovo ne samo da može poboljšati kliničku praksu, već i otvoriti put za buduća istraživanja usmerena na razvoj terapijskih strategija usmerenih na sideropenijsku anemiju kod pedijatrijskih pacijenata sa IBC, unapređujući tako kvalitet života ovih pacijenata i smanjujući dugoročne posledice povezane sa hroničnim deficitom gvožđa.

LITERATURA

1. Subedi S, Behrle Yardley AL.; Shapiro JM. Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents. *Rhode Isl. Med. J.* 2022;105, 8–13.
2. Gordon H, Burisch J, Ellul P, Karminis K, Katsanos K, Allocca M, et al. ECCO Guidelines on Extraintestinal Manifestations in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis.* 2024;18(1):1-37.
3. Mahadea D, Adamczewska E, Ratajczak AE, Rychter AM, Zawada A, Eder P et al. Iron Deficiency Anemia in Inflammatory Bowel Diseases-A Narrative Review. *Nutrients.* 2020;13(11):4008.
4. Gomollón F, Gisbert JP. Anemia and inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2009;15(37):4659-65
5. Fletcher A, Forbes A, Svenson N, Wayne Thomas D; A British Society for Haematology Good Practice Paper. Guideline for the laboratory diagnosis of iron deficiency in adults (excluding pregnancy) and children. *Br J Haematol.* 2022;196(3):523-529.
6. Nemeth E, Ganz T. Heparin and Iron in Health and Disease. *Annu Rev Med.* 2023;74:261-277.
7. Rogler G, Vavricka S. Anemia in inflammatory bowel disease: an under-estimated problem? *Front Med (Lausanne).* 2015;19;1:58.
8. Minor EA, Kupec JT, Nickerson AJ, Narayanan K, Rajendran VM. Increased DMT1 and FPN1 expression with enhanced iron absorption in ulcerative colitis human colon. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020;318(2):C263-C271.
9. Sukumaran A, James J, Janardhan HP, Amaladas A, Suresh LM, Danda D et al. Expression of iron-related proteins in the duodenum is up-regulated in patients with chronic inflammatory disorders. *Br J Nutr.* 2014;111(6):1059-68.
10. Wu W, Song Y, He C, Liu C, Wu R, Fang L, et al. Divalent metal-ion transporter 1 is decreased in intestinal epithelial cells and contributes to the anemia in inflammatory bowel disease. *Sci Rep.* 2015;5:16344.
11. Zhang H, Ostrowski R, Jiang D, Zhao Q, Liang Y, Che X, et al. Heparin Promoted Ferroptosis through Iron Metabolism which Is Associated with DMT1 Signaling Activation in Early Brain Injury following Subarachnoid Hemorrhage. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:9800794.
12. Su F, Yan X, Li X, Zeng B, Sun X, Huang C, et al. SLC38A1 Inhibits Ferroptosis of Alveolar Type II Epithelial Cells in Acute Lung Injury by Promoting Autophagic Degradation of Divalent Metal Transporter 1 (DMT1): an In Vivo and In Vitro Study. *Inflammation.* 2026;49(1):25.
13. Woloshun RR, Yu Y, Xu X, Lee JK, Zhu S, Shine JS, et al. Four AAs increase DMT1 abundance in duodenal brush-border membrane vesicles and enhance iron absorption in iron-deprived mice. *Blood Adv.* 2022;6(10):3011-3021.