

Lek. Tomasz Głogowski

GOSPODARKA ŻELAZEM U PACJENTÓW DIALIZOWANYCH OTRZEWNOWO

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Jolanta Małyszko

Promotor pomocniczy: Dr hab. n. med. Ewa Wojtaszek

Katedra i Klinika Nefrologii, Dializoterapii i Chorób Wewnętrznych,

Centralny Szpital Kliniczny Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023 r.

Słowa Kluczowe: schyłkowa niewydolność nerek, dializa otrzewnowa, niedokrwistość, biomarkery gospodarki żelazem

Key Words: end-stage renal disease, peritoneal dialysis, anemia, biomarkers of iron metabolism

Składam serdeczne podziękowania dla:

Prof. dr hab. n. med. Jolanty Małyszko – za nieocenioną pomoc, cierpliwość i wiarę we mnie,

Dr hab. n. med. Ewy Wojtaszek – za wsparcie, dzielenie się wiedzą i doświadczeniem oraz wyrozumiałość,

a także dla:

Kingi, Dominiki, Michała i Weroniki.

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską:

L. p.	Tytuł	IF	Punktacja MNISzW
1.	<p>Iron status and anemia control are related to peritoneal membrane properties in peritoneally dialyzed patients</p> <p>Głogowski T., Wojtaszek E., Małyszko J.</p> <p>Frontiers in Medicine, 2023, DOI: 10.3389/fmed.2023.1148094</p>	3,900	100
2.	<p>Głogowski T., Wojtaszek E., Małyszko J.</p> <p>International Urology and Nephrology, 2023, DOI: 10.1007/s11255-020-02663-z</p>	2,266	70
	Łączna punktacja	6,166	170

Spis treści:

Rozdział 1. Wykaz stosowanych skrótów.....	4
Rozdział 2. Streszczenie w języku polskim.....	7
Rozdział 3. Streszczenie w języku angielskim.....	9
Rozdział 4. Wstęp.....	11
4.1 Niedokrwistość u chorych z przewlekłą chorobą nerek.....	11
4.2 Dializa otrzewnowa – podstawowe informacje.....	12
4.3 Losy żelaza w ustroju.....	15
4.4 Erytropoeza u chorych z przewlekłą chorobą nerek.....	16
4.5 Rola wybranych czynników biorących udział w gospodarce żelazem.....	16
4.5.1 Hepcydyna.....	16
4.5.2 ERFE.....	19
4.5.3 GDF 15.....	20
4.5.4 sTfR.....	20
4.5.5 Zonulina.....	20
Rozdział 5. Założenia i cel pracy.....	20
5.1 Materiały i metody.....	22
5.2 Stopień nasilenia niedokrwistości w grupie badanej.....	23
5.3 Klasyczne i nowe biomarkery gospodarki żelazem.....	24
5.3.1 TSAT i ferrytyna.....	24
5.3.2 ERFE.....	25
5.3.4 Zonulina.....	25
5.3.5 Hepcydyna.....	26
5.3.6 sTfR.....	26
5.3.7 GDF 15.....	26
5.4 Wpływ transportu otrzewnowego na gospodarkę żelazem.....	27
Rozdział 6. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską.....	28
6.1 Biomarkers of iron metabolism in chronic kidney disease.....	28
6.2 Iron status and anemia control are related to peritoneal membrane properties in peritoneally dialyzed patients.....	38
Rozdział 7. Podsumowanie.....	47
Rozdział 8. Piśmiennictwo.....	48
Rozdział 9. Zgoda Komisji Bioetycznej.....	55
Rozdział 10. Oświadczenia współautorów publikacji.....	56

Rozdział 1. Wykaz stosowanych skrótów:

ADO – automatyczna dializa otrzewnowa

AID – bezwzględny niedobór żelaza (ang. absolute iron deficiency)

ARNT – jądrowy translokator receptora węglowodorowego arylu (ang. aryl hydrocarbon receptor nucleus translocator)

BMP – białkomorfogenetyczne kości (Ang. bone morphogenic protein)

CADO – ciągła ambulatoryjna dializa otrzewnowa

CCI – wskaźnik współchorobowości Charlson (and. Charlson comorbidity index)

CERA – ciągły aktywator receptora erytropoetynowego (ang. continuous erythropoietin receptor activator)

DCYTB – reduktaza cytochromu B (ang. duodenal cytochrome B reductase)

DMT1 – dwuwartościowy transporter metali 1 (ang. divalent metal transporter 1)

eGFR – szacowane przesączanie kłębuszkowe (ang. estimated glomerular filtration rate)

EPO - erytropoetyna

ERFE – erytroferron

ESA – substancja stymulująca erythropoezę (ang. erythropoiesis stimulating agent)

FID – funkcjonalny niedobór żelaza (ang. functional iron deficiency)

FPN – ferroportyna

HD – hemodializa

HDF – hemodiafiltracja

HEPH – hefastyna

HIF-2 α – czynnik indukowany niedotlenieniem 2 α (ang. hypoxia-inducible factor 2 α)

HIF-PHD – hydroksylaza prolilowa HIF (ang. HIF prolyl hydroxylase)

HIS – wysoki zapas żelaza (ang. high iron status)

HJV – hemojuwelina

kDa – kilodalton

Kt/V- tygodniowy klirens mocznika

NTBI – żelazo niezwiązane z transferyną (ang. non-transferrin bound iron)

OL-HDF – hemodiafiltracja online

PChN – przewlekła choroba nerek

PD – dializa otrzewnowa (ang. peritoneal dialysis)

PET – test równoważenia otrzewnowego (ang. peritoneal equilibrium test)
PMT – transport otrzewnowy (ang. peritoneal membrane transport)
RIS – referencyjny poziom żelaza (ang. reference iron status)
RRF – resztkowa czynność nerek (ang. residual renal function)
SD – odchylenie standardowe (ang. standard deviation)
SF – stężenie ferrytyny w surowicy (ang. serum ferritin)
sTfR – rozpuszczalny receptor dla transferyny (ang. soluble transferrin receptor)
Tf – transferyna
TSAT – wysycenie transferyny żelazem (ang. transferrin saturation with iron)

Rozdział 2. Streszczenie

Niedokrwistość jest jednym z najczęstszych powikłań przewlekłej choroby nerek, które dotyczy zdecydowanej większości pacjentów dializowanych. Niedokrwistość jest jednym z czynników odpowiedzialnych za szybszą progresję do schyłkowej niewydolności nerek, obniżoną jakość życia, zmniejszoną wydolność układu sercowo-naczyniowego, upośledzenie funkcji poznawczych, zwiększoną liczbę hospitalizacji i wyższą śmiertelność. Patomechanizm niedokrwistości związanej z PChN jest złożony i obejmuje względny niedobór erytropoetyny, niedobór żelaza (zarówno bezwzględny, jak i czynnościowy), upośledzony klirens nerkowy hepcydyny, krótszy czas przeżycia erytrocytów oraz niedobory żywieniowe. Ponadto u pacjenci dializowani są bardziej narażeni na wystąpienie przewlekłego subklinicznego stanu zapalnego, na co ma wpływ powtarzająca się ekspozycja na błonę i dreny dializatora, a także na nie do końca biogodny płyn dializacyjny. Należy się spodziewać, że obecny stan wiedzy na temat gospodarki żelazem pomoże w opracowaniu nowych metod diagnostycznych i sposobów leczenia niedokrwistości w populacji ESRD.

Celem niniejszej pracy było ustalenie przydatności nowych markerów gospodarki żelazem w diagnostyce i monitorowaniu efektów leczenia niedokrwistości, niedoboru żelaza i stanu zapalnego w grupie pacjentów dializowanych otrzewnowo. Dializa otrzewnowa pozostaje niedostatecznie wykorzystywaną metodą leczenia nerkozastępczego, a jej rozpowszechnienie w Polsce wynosi zaledwie 4% ogółu chorych dializowanych. W związku z powyższym badania prowadzone w populacji PD są zwykle niewielkie, a dane - niewystarczające.

Uzupełnianie niedoboru żelaza pozostaje pierwszym krokiem mającym na celu zwiększenie stężenia hemoglobiny u pacjentów dializowanych. Z tego względu ocena zapasów żelaza w ustroju ma kluczowe znaczenie przy wyborze właściwego leczenia. Standardowe testy diagnostyczne oceniające gospodarkę żelazem obejmują TSAT (który reprezentuje pulę żelaza dostępnego dla szpiku kostnego do erytropoezy) i ferrytynę (która odzwierciedla zapasy żelaza, ale jednocześnie jest białkiem ostrej fazy, którego stężenie wzrasta w przypadku stanu zapalnego). W naszym badaniu w grupie 58 pacjentów dializowanych otrzewnowo oceniliśmy szereg nowych markerów – hsCRP, IL-6, sTfR, hepcydynę-25, ERFE, GDF 15 i zonulinę. Oznaczenia zostały wykonane zarówno w surowicy, jak i w dializacie. Wyniki naszego badania potwierdziły obserwacje, że resztkowa czynność nerek jest najważniejszym parametrem, który koreluje z wyższym stężeniem hemoglobiny w surowicy, niższym poziomem wskaźników stanu zapalnego i lepszymi wynikami leczenia.

Transport otrzewnowy jest jedną z właściwości otrzewnej, która określa szybkość przechodzenia małych cząstek z krwi płynącej przez naczynia włosowate w błonie otrzewnej a płynem dializacyjnym znajdującym się w jamie otrzewnej. Udało nam się udowodnić, że PMT silnie koreluje ze stężeniem sTfR w dializacie, hepcydyny w dializacie, GDF15 w dializacie i zonuliny w dializacie, a także stężeniem IL6 w surowicy oraz hs-CRP w surowicy i dializacie. Nie jest do końca jasne, czy powyższe wyniki są związane z właściwościami błony otrzewnej i skutecznością usuwania tych cząsteczek poprzez transport konwekcyjny, czy też wynikają z ogólnoustrojowego i/lub miejscowego (wewnątrzotrzewnowego) stanu zapalnego. Obserwacja ta wymaga dalszych badań. Szybki transport otrzewnowy związany z wewnątrzotrzewnowym stanem zapalnym (np. w przypadku dializacyjnego zapalenia otrzewnej) skutkuje zwiększeniem przepuszczalności błony otrzewnej nie tylko dla małych cząstek, ale także dla substancji o średniej wielkości i białek. W badaniu stwierdzono również, że stężenie zonuliny w dializacie było istotnie wyższe u pacjentów ze średnio-szybkim transportem otrzewnowym, co dodatkowo korelowało ze stopniem nasilenia stanu zapalnego ocenionym za pomocą hsCRP i IL-6 w surowicy.

sTfR w porównaniu z innymi wskaźnikami metabolizmu żelaza jest mniej podatny na wahania stężenia w zależności od stanu zapalnego. Wydaje się więc, że może być użytecznym markerem do oceny niedokrwistości z niedoboru żelaza w przewlekłych chorobach przebiegających ze zwiększonym ogólnoustrojowym stanem zapalnym. W badanej populacji sTfR korelował dodatnio z hepcydyną i ferrytyną w surowicy oraz dializatem hsCRP i IL6, co było sprzeczne z innym badaniem przeprowadzonym u pacjentów z HD. Korelacja sTfR ze stężeniem hsCRP i IL6 w dializacie może być wyrazem unikalnych właściwości gospodarki żelazem w środowisku wewnątrzotrzewnowym u pacjentów PD. Wpływ ERFE na aktywność erytropoetyczną u pacjentów dializowanych otrzewnowo wymaga dalszych badań.

Rozdział 3. Summary

Anemia is one of the most common complications of chronic kidney disease, affecting the vast majority of patients on dialysis. Anemia is one of the contributing factors responsible for more rapid progression to end-stage renal disease, decreased quality of life, decreased cardiovascular performance, cognitive impairment, increased rate of hospitalizations and increased mortality. Pathophysiology of CKD-related anemia is multifaceted and encompasses relative erythropoietin deficiency, iron deficiency (both absolute and functional), impaired hepcidin clearance, shorter erythrocyte lifespan, nutritional deficiencies. Furthermore, patients on dialysis are likely to develop chronic subclinical inflammation as a result of repeated exposure to dialyzer membrane and drains, as well as non-biocompatible dialysis fluid. Current knowledge of iron metabolism and its intricacies will hopefully help develop novel diagnostic and therapeutic measures to combat the burden of anemia in ESRD population.

The aim of this manuscript was to establish usefulness of novel markers of iron metabolism in diagnosing and monitoring anemia, iron deficiency and inflammation in a unique group of peritoneal dialysis patients. PD remains an underutilized method of renal replacement therapy and its prevalence in Poland amounts to meagre 4%. Consequently, studies conducted in PD population tend to be small and consistent data on numerous anemia-related subjects are lacking.

Since iron replenishment remains the first step in improving hemoglobin levels in dialysis patients, assessment of iron stores is pivotal in choosing the correct therapeutic approach. Standard diagnostic tests of iron deficiency include TSAT (which represents the pool of circulating iron available for erythropoiesis) and ferritin (which reflects iron stores but at the same time remains an acute phase reactant, whose concentration increases in the event of inflammation). We assessed several novel markers in a group of 58 PD patients – namely hsCRP, IL-6, sTfR, hepcidin-25, ERF, GDF 15 and zonulin. The assays were performed both in serum and in dialysate. The results of our study reinforced the point that residual kidney function is the most important parameter, that corresponds with higher serum hemoglobin, decreased circulating inflammatory markers, and overall better clinical outcomes.

Peritoneal membrane transport is one of the characteristics, that determine the rate in which small solutes cross the barrier between the blood flowing through the capillaries in the peritoneal wall and the fluid that dwells inside peritoneal cavity. We managed to prove that PMT strongly correlated with dialysate sTfR, dialysate hepcidin, dialysate GDF15 and dialysate

zonulin, as well as serum IL6, serum and dialysate hs-CRP. It remains unclear whether the aforementioned findings are associated with the properties of the peritoneal membrane and effectiveness of removal of these molecules via convective transport, or they result from systemic and/or local intraperitoneal inflammation. This observation needs further studies. Fast peritoneal transport associated with intraperitoneal inflammation (e.g. in the event of dialysis-related peritonitis) results in high peritoneal membrane permeability not only for small solutes but also for middle-size molecules and proteins. Our study also determined, that concentration of zonulin in dialysate was significantly higher in fast-average transporters, which corresponded positively with the degree of inflammation as measured by serum hsCRP and IL-6.

sTfR is less influenced by inflammation than other iron metabolism indices and may be a useful tool for assessing iron deficiency anemia in chronic disorders associated with increased level of systemic inflammation. However, in our study population, sTfR correlated positively with serum hepcidin and ferritin and dialysate hsCRP and IL6, which was in opposition to another study conducted in HD patients. The correlation of sTfR with dialysate hsCRP and IL6 may be an expression of unique iron status in peritoneum in PD patients. The role of ERF in erythropoietic activity in PD patients requires further investigation.

Rozdział 4. Wstęp

4.1 Niedokrwistość u chorych z przewlekłą chorobą nerek

Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) niedokrwistość definiowana jest jako nieprawidłowe stężenie hemoglobiny poniżej 13 g/dl u dorosłych mężczyzn i poniżej 12 g/dl u nieciążarnych kobiet [1]. Najczęstszą przyczyną niedokrwistości na świecie jest niedobór żelaza, natomiast drugą co do częstości występowania postacią jest niedokrwistość towarzysząca przewlekłym stanom zapalnym. Niedokrwistość jest jednym z objawów przewlekłej choroby nerek (PChN), a częstość jej występowania wzrasta w miarę pogarszania się przesączania kłębuszkowego [2]. Patomechanizm tego zjawiska jest wieloczynnikowy, związany m. in. z niedoborem żelaza i erytropoetyny (EPO) [3]. Na przestrzeni ostatnich dekad dokonał się znaczący postęp w zrozumieniu zarówno fizjologii metabolizmu żelaza, jak i wpływu szeregu czynników regulatorowych na erytropoezę. Wiedza ta uzmysławia jak niezwykle skomplikowana jest wzajemna zależność między gospodarką żelazem a erytropoezą w warunkach przewlekłej upośledzonej czynności nerek.

Populacja chorych z przewlekłą chorobą nerek (PChN) stanowi niejednorodną grupę – pacjenci we wczesnych stadiach choroby mają zwykle mniej nasilone objawy i rzadziej występujące powikłania, zaś wiele zaburzeń na tym etapie ma subkliniczny charakter, ujawniając się dopiero wraz z obniżaniem eGFR [4,7]. Należy również podkreślić, że na charakterystykę dializowanych pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek (ESRD) ma wpływ wiele czynników, w tym rodzaj leczenia nerkozastępczego i stopień zachowania resztkowej czynności nerek. Populacja pacjentów dializowanych otrzewnowo różni się pod wieloma względami od pacjentów hemodializowanych, co ma wpływ na homeostazę żelaza i stopień nasilenia niedokrwistości. Pacjenci PD mają zazwyczaj lepiej zachowaną resztkową czynność nerek oraz mniejszą utratę żelaza, co związane jest z samą techniką dializy, która nie wymaga nakłuwania naczyń krwionośnych ani krążenia pozaustrojowego. Z drugiej strony pacjenci dializowani otrzewnowo stosunkowo często narażeni są na rozwój subklinicznego lub jawnego klinicznie stanu zapalnego, zarówno na poziomie ogólnoustrojowym, jak i miejscowym, ograniczonym do otrzewnej [5]. U podłoża patomechanizmu powstawania zapalenia w grupie pacjentów dializowanych otrzewnowo leży szereg złożonych czynników, wynikających m. in. z bezpośredniej stymulacji wytwarzania cytokin prozapalnych przez środowisko mocznicowe (ang. *uremic milieu*) i upośledzonego klirensu nerkowego cytokin, a także powtarzających się epizodów mikrouszkodzeń i dysfunkcji błony otrzewnowej [6]. Za powyższe zjawiska odpowiada m. in. ekspozycja na nie do końca biozgodny płyn dializacyjny, epizody

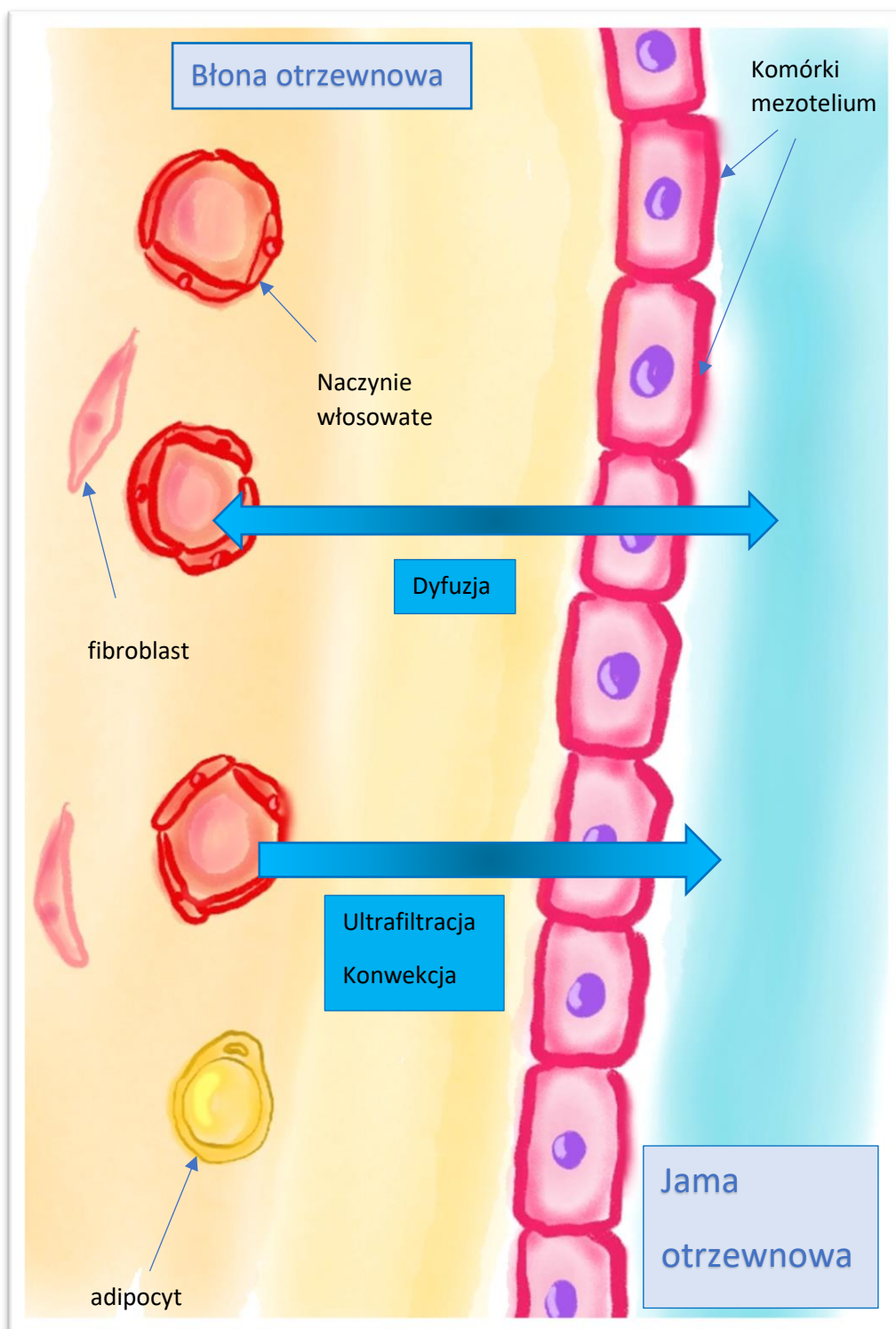
dializacyjnego zapalenia otrzewnej, powstawanie biofilmu w świetle cewnika oraz endotoksemia związana z translokacją makrocząstek ze światła przewodu pokarmowego. Dodatkowo podawanie dożylnych preparatów żelaza nasila stres oksydacyjny i stan zapalny, co również może mieć wpływ na homeostazę wewnątrztrzewnową.

Częstość występowania niedokrwistości u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek wzrasta w miarę progresji PChN i dotyczy większości chorych w stadium G4 (eGFR między 15 a 30 ml/min.) [2,4]. W tej grupie chorych do głównych czynników sprzyjających rozwojowi niedokrwistości zalicza się: względny niedobór erytropoetyny, niedobór żelaza (zarówno bezwzględny, jak i funkcjonalny), upośledzony klirens hepcydyny, skrócony czas przeżycia krwinek czerwonych, a także niedobory pokarmowe (między innymi kwasu foliowego i witaminy B12). U pacjentów hemodializowanych dodatkowym źródłem utraty żelaza (nawet do 3 g rocznie) mogą być przewlekłe krwawienia podczas nakłucia przetoki, a także utrata krwi w dializatorze i liniach [7]. Kolejnym zjawiskiem sprzyjającym rozwojowi niedokrwistości jest subkliniczny stan zapalny, który jest z jednej strony następstwem zaawansowanej niewydolności nerek i środowiska mocznicowego, a z drugiej przewlekłej ekspozycji na niewystarczająco biozgodne materiały stosowane podczas dializy. Konsekwencją niedokrwistości u pacjentów z PChN jest pogorszenie jakości życia, upośledzenie funkcji poznawczych i sprawności fizycznej, zwiększenie liczby hospitalizacji i wzrost śmiertelności [3]. Niedokrwistość może również przyspieszać progresję do schyłkowej niewydolności nerek (ESRD). Najważniejszym elementem leczenia powinno być najpierw uzupełnienie zapasów żelaza, co zwiększa skuteczność leków stymulujących erytropoezę (ESA), które uważane są za podstawę leczenia niedokrwistości u pacjentów z PChN [8]. W tej grupie chorych wyniki oznaczeń tradycyjnych biomarkerów homeostazy żelaza są często trudne do interpretacji, co komplikuje proces diagnostyczno-terapeutyczny oraz monitorowanie leczenia. U pacjentów z PChN dochodzi do zaburzenia równowagi między metabolizmem żelaza, a jego dystrybucją, prowadząc do sytuacji, w której niektóre komórki i tkanki mają za mało żelaza, a inne są nim przeładowane. W rezultacie dochodzi do zakłócenia prawidłowej wzajemnie regulowanej zależności między żelazem, utlenowaniem tkanek a erytropoezą.

4.2 Dializa otrzewnowa – podstawowe informacje

Dializa otrzewnowa jest jedną z metod leczenia nerkozastępczego, w której wykorzystywane są unikalne właściwości otrzewnej jako błony półprzepuszczalnej. W warunkach napełnienia

jamy otrzewnej płynem dializacyjnym o określonym składzie, między środowiskiem krwi krążącej w naczyniach włosowatych błony otrzewnowej a przedziałem płynu dializacyjnego zachodzą procesy fizyczne (dyfuzja, ultrafiltracja i konwekcja), umożliwiające transport cząstek (elektrolitów, zbędnych produktów przemiany materii) oraz wody [9,10]. Procesy te zależą od szeregu czynników, m. in. gradientu stężeń rozpuszczonych cząstek, ich wielkości oraz indywidualnie zmiennych właściwości otrzewnej, wpływających na tzw. transport otrzewnowy [11]. Pacjent leczony dializą otrzewnową w określonych odstępach czasu, za pomocą wszczepionego cewnika otrzewnowego, wykonuje wymiany płynu dializacyjnego, polegające na drenażu dializatu zawierającego zbędne substancje i napełnieniu jamy otrzewnej nową porcją płynu dializacyjnego. Dzięki stałej obecności płynu w jamie otrzewnej powolny proces oczyszczania krwi i usuwania nadmiaru wody zachodzi w zasadzie przez całą dobę. Ciągły i powolny charakter dializy otrzewnowej oraz wynikający z tego faktu brak gwałtownych wahań wolemii i stężeń substancji osmotycznie czynnych stanowi najważniejszą zaletę DO. W efekcie pacjenci dializowani otrzewnowo mają dłużej zachowaną resztkową czynność nerek, co przekłada się na m.in. wyższy klirens średnich cząstek, lepszą kontrolę wolemii oraz niższą śmiertelność po rozpoczęciu RRT w porównaniu z pacjentami hemodializowanymi [12,13].



Ryc, 1 Schemat przedstawiający procesy fizyczne zachodzące podczas dializy otrzewnowej

4.3 Losy żelaza w ustroju

Wchłanianie żelaza zawartego w pokarmie zachodzi przede wszystkim w dwunastnicy. Żelazo niehemowe musi ulec zredukowaniu przez reduktazę cytochromu B (DCYTB), po czym przechodzi ze światła jelita przez dwuwartościowy transporter metali 1 (DMT1), znajdujący się na powierzchni enterocyty dwunastnicy, do wnętrza komórki.

W dalszej kolejności żelazo może zostać wykorzystane przez enterocyt, zmagazynowane w postaci związanej z ferrytyną lub, po utlenieniu przez hefastynę (HEPH), przejść do krwi, co umożliwia białko transbłonowe, ferroportyna (FPN), znajdujące się w błonie podstawno-bocznej enterocyty [14]. Czynniki indukowane hipoksją-2 α (HIF-2 α) stymulują ekspresję zarówno DMT1, jak i FPN. Jednak największa pula dostępnego żelaza pochodzi z makrofagów, które odzyskują je ze starzejących się lub uszkodzonych erytrocytów, za co również odpowiada ferroportyna. Cytokiny prozapalne, podobnie jak stan przeładowania żelazem, hamują ekspresję FPN, efektem czego jest sekwestracja żelaza wewnątrz komórek. Za powyższe zjawisko odpowiada w dużej mierze hepcydyna [15].

Żelazo wchłonięte z przewodu pokarmowego lub uwolnione z makrofagów wiąże się w osoczu z białkiem nośnikowym, transferyną (Tf), której rolą jest dostarczanie żelaza do komórek docelowych, czyli erytroblastów, komórek mięśni, limfocytów B i T, hepatocytów oraz nabłonka jelit (niezależnie od jego udziału w transporcie żelaza). Za wyżej wymienione procesy odpowiada receptor transferyny 1 (TfR 1). W hepatocytach i erytroblastach obecny jest także receptor transferyny 2 (TfR 2), który ma niższe powinowactwo do wiązania Tf niż TfR 1, ale jednocześnie reguluje homeostazę żelaza. Przy wysokim stężeniu żelaza w osoczu transferyna wiąże się z TfR 2, zwiększając syntezę hepcydyny w hepatocytach, co zmniejsza wrażliwość komórek erytroidalnych na EPO. Odwrotne zjawisko zachodzi w przypadku niedoboru żelaza [16,17].

Jedna cząsteczka transferyny może wiązać do dwóch atomów żelaza, zajmując w ten sposób około 20-40% miejsc wiązania żelaza, co odpowiada wysyceniu transferyny (TSAT). Jeśli ilość żelaza w surowicy przekracza zdolność wiązania transferyny, np. w przypadku wielokrotnych transfuzji krwi lub podawania dożylnych preparatów żelaza, w osoczu może pojawić się wolne żelazo niezwiązane z transferyną (NTBI), w tym jego wysoce reaktywna postać, tzw LPI (ang. labile plasma iron). LPI może powodować uszkodzenia tkanek, zarówno w wyniku powstawania produktów utleniania, jak i poprzez niekontrolowane wnikanie do komórek, prowadząc do ich przeładowania żelazem [18,19]. Niewykorzystane przez komórki cząsteczki

żelaza wiązane są przez białko PCBP1 (ang. poly(rC)-binding protein 1) i dostarczane do ferrytyny. Ferrytyna może magazynować do 4 500 atomów żelaza, stanowiąc w ten sposób rezerwuar tego pierwiastka.

4.4 Erytropoeza u chorych z przewlekłą chorobą nerek

Żelazo i erytropoeza są ze sobą nierozdzielnie związane i wzajemnie regulowane na wielu poziomach. Żelazo wpływa na nerkową syntezę EPO, w której udział bierze czynnik indukowany hipoksją-2 α (HIF-2 α). Erytroblasty pod wpływem EPO uwalniają erytoferron (ERFE), który hamuje syntezę hepcydyny i zwiększa dostępność żelaza niezbędnego w procesie dojrzewania erytroblastów. U osób dorosłych EPO jest wytwarzana w nerkach przez fibroblasty śródmiąższowe w korze i rdzeniu zewnętrznym w odpowiedzi na ciśnienie parcjalne tlenu w tkankach i regulowane przez czynnik transkrypcyjny HIF-2 α . W warunkach prawidłowego utleniania hydroksylaza prolinowa HIF (HIF-PHD) powoduje hydroksylację HIF-2 α i jego degradację w proteasomach. W stanie niedotlenienia HIF-2 α ulega stabilizacji i translokacji do jądra komórkowego, gdzie inicjuje transkrypcję EPO [20].

U chorych z PChN mechanizm regulujący wydzielanie EPO w odpowiedzi na bodziec tlenowy pozostaje dość długo wydolny, a stężenia EPO mogą być prawidłowe lub nawet nieznacznie zwiększone, jednak nieadekwatnie niskie w stosunku do stopnia nasilenia niedokrwistości. Wraz z utratą czynnego mięszu nerek zdolność komórek do syntezy EPO stopniowo zmniejsza się, w wyniku czego jej niedobór staje się coraz bardziej wyraźny. Ponadto u pacjentów z zaawansowaną PChN dochodzi do wzrostu poziomu toksyn mocznicowych oraz do aktywacji białka ARNT (ang. aryl hydrocarbon receptor nucleus translocator – jądrowy translokator receptora węglowodorowego arylu), które konkuruje z HIF-2 α , uniemożliwiając jego wiązanie się z HIF- β , co w konsekwencji zmniejsza syntezę EPO. Dodatkowy hamujący wpływ na wytwarzanie HIF-2 α i EPO wywiera przeładowanie żelazem [21]. Powyższe zjawiska stymulują ekspresję i produkcję hepcydyny, co ma ogromny wpływ na rozregulowaniu gospodarki żelazem w PChN.

4.5 Rola wybranych czynników biorących udział w gospodarce żelazem

4.5.1 Hepcydyna

Hepcydyna, polipeptyd zbudowany z 25 aminokwasów, jest jednym z kluczowych elementów regulujących ogólnoustrojowy metabolizm żelaza [22]. Hepcydyna jest hormonem wytwarzanym głównie w hepatocytach. Jej działanie polega na wiązaniu się z ferroportyną, co powoduje jej internalizację i degradację w lizosomach. W rezultacie transport żelaza z dwunastnicy do krążenia jest zmniejszony, jednocześnie hamowane jest uwalnianie żelaza z makrofagów i hepatocytów, co prowadzi w konsekwencji do upośledzenia dystrybucji żelaza i obniżenia jego stężenia we krwi [23]. Produkcja hepcydyny wzrasta w odpowiedzi na przeładowanie żelazem, przy współistnieniu stanu zapalnego lub zakażenia, natomiast jej synteza jest zmniejszona w sytuacji niedoboru żelaza, zwiększonej erytropoezy (na przykład w odpowiedzi na podanie ESA) i niedotlenienia. Żelazo, zarówno tkankowe, jak i znajdujące się we krwi krążącej, reguluje transkrypcję hepcydyny. Sygnał do ekspresji hepcydyny inicjowany jest przez ligandy BMP wykorzystujące hemojuwelinę (HJV) jako koreceptor, który wiąże się z BMP6 i BMP2 i aktywuje szlak białkowy BMP-SMAD (ang. suppressor of mothers against decapentaplegic) w hepatocytach. Powyższe zjawisko odgrywa kluczową rolę w regulacji metabolizmu żelaza oraz wpływa na procesy związane z niedotlenieniem oraz syntezą EPO [24,25]. W środowisku niedoboru tlenu zwiększone wytwarzanie HIF-2 α stymuluje ekspresję wierzchołkowych (DMT1) i bazolateralnych (FPN) transporterów żelaza. W sytuacji niedoboru żelaza jego wchłanianie jest zwiększone w wyniku zmniejszenia syntezy hepcydyny, dzięki czemu dochodzi do stabilizacji cząsteczki HIF-2 α [26]. Odwrotną sytuacją jest przeładowanie żelazem, w wyniku czego zwiększa się wytwarzanie hepcydyny i hamowany jest wychwyt żelaza [27]. Hepcydyna w dużej mierze odpowiada za rozregulowanie metabolizmu żelaza w przewlekłej chorobie nerek. Wzrost jej stężenia zmniejsza ekspresję FPN w błonach komórkowych, a tym samym zmniejsza wchłanianie żelaza w dwunastnicy oraz jego odzyskiwanie z zapasów zgromadzonych w komórkach magazynujących. Ekspresję i syntezę hepcydyny stymuluje stosowanie dożylnych preparatów żelaza, stan zapalny, środowisko mocznicowe, a także czynnik wzrostu fibroblastów 23 (FGF23) U chorych z PChN usuwanie hepcydyny jest upośledzone z powodu zmniejszonej filtracji kłębuszkowej (eGFR). Zarówno erytropoetyna, jak i erytoferron, mają hamujący wpływ na produkcję hepcydyny [28,29].

Wzrost stężenia hepcydyny we krwi krążącej odgrywa kluczową rolę w ograniczeniu dostępności żelaza dla prawidłowej erytropoezy. U pacjentów hemodializowanych stężenie hepcydyny może być zwiększone nawet 9-krotnie [30]. Przyczyną tego zjawiska jest upośledzony klirens nerkowy, niewystarczające usuwanie hepcydyny podczas dializy,

przewlekły stan zapalny (związany z retencją toksyn mocznicowych, ekspozycją na cewniki, płyny i błony dializacyjne) i, paradoksalnie, podawanie pozajelitowych preparatów żelaza.

Stężenie hepcydyny w surowicy jest odwrotnie proporcjonalne do eGFR, aczkolwiek związek ten jest wyraźny wyłącznie w zaawansowanych stadiach PChN (G3b-5). Klirens nerkowy wydaje się być istotnym sposobem eliminacji hepcydyny u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek, ponieważ chorzy ze stosunkowo dobrze zachowaną resztkową czynnością nerek mają zwykle niższy poziom hepcydyny w surowicy, niezależnie od metody dializy [31]. Nie można jednak wykluczyć wpływu innych czynników, gdyż pacjenci z bezmoczem mają jednocześnie tendencję do bardziej nasilonego stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego, które stymulują produkcję hepcydyny.

Hepcydyna jest substancją o średniej masie cząsteczkowej (2,71 kDa), dzięki czemu ulega usuwaniu podczas dializy, jednak jej stężenie w surowicy wzrasta w ciągu kilku godzin po zakończeniu hemodializy [30,32]. Stopień usuwania hepcydyny zależy m.in. od rodzaju zastosowanej błony dializacyjnej (słaby dla dializatorów low-flux i pośredni dla dializatorów wysokoprzepływowych), rodzaju transportu (dobre usuwanie podczas hemodiafiltracji online (OL-HDF), gdzie dominuje udział transportu konwekcyjnego) oraz tempa przepływu krwi przez dializator [32,33]. Wykazano, że zastosowanie bardziej wydajnych technik pozwala nie tylko na usunięcie znacznej ilości hepcydyny, ale także na istotne obniżenie poziomu hepcydyny przed zabiegiem. Wykorzystanie technik bazujących na transporcie konwekcyjnym i wysokoprzepływowych błon dializacyjnych wydaje się być sposobem na obniżenie poziomu hepcydyny u pacjentów hemodializowanych [34,35].

Dializa otrzewnowa (PD) również wydaje się być skuteczna w usuwaniu hepcydyny, jednak niewiele jest danych na ten temat. W badaniu Małyszko i wsp. oceniono wpływ PD na poziom hepcydyny w surowicy w porównaniu z HD i HDF. Wykazano, że pacjenci dializowani otrzewnowo mają istotnie niższe stężenia hepcydyny w surowicy w porównaniu z chorymi hemodializowanymi. Stwierdzono ponadto, że podczas PD hepcydyna jest skutecznie usuwana przez otrzewną, na co wskazywało wyższe stężenie hepcydyny w dializacie niż w ultrafiltracie uzyskanym podczas HD i HDF [36]. Powyższa obserwacja wydaje się być związana z samą fizjologią dializy otrzewnowej. PD jest techniką ciągłą, wykorzystującą transport dyfuzyjny, ale też konwekcyjny, drobno- i średnicząsteczkowych substancji rozpuszczonych w wodzie. Skuteczność usuwania hepcydyny zależy m. in. od indywidualnych właściwości błony otrzewnowej. Klirens otrzewnowy hepcydyny i efektywność usuwania hepcydyny podczas PD wymagają dalszych badań.

4.5.2 ERFE

Synteza erytroferronu (ERFE) przez erytroblasty zachodzi w odpowiedzi na wzrost aktywności erytropoetycznej, np. w niedokrwistości lub po podaniu egzogennej EPO [37]. ERFE hamuje produkcję hepcydyny, co powoduje zwiększone wchłanianie żelaza i jego mobilizację z puli magazynowej. Supresja hepcydyny w odpowiedzi na EPO odbywa się za pośrednictwem szlaku sygnałowego, w którym rolę odgrywają cząsteczki SMAD (ang. suppressor of mothers against decapentaplegic). ERFE sekwestruje ligandy receptora białka morfogenetycznego kości (BMP), szczególnie BMP6, i hamuje fosforylację SMAD1/5 w komórkach Hep3b [38,39]. Niedobór ERFE w modelu mysim wiąże się z łagodną niedokrwistością hipochromiczną i opóźnieniem supresji hepcydyny, np. po nasilonym krwawieniu lub podaniu EPO [37]. W niektórych chorobach przebiegających z nieefektywną erytropoezą, takich jak β -talasemia, stężenie ERFE było znacznie zwiększone [40]. U pacjentów z PChN, u których wydzielanie endogennej EPO jest stosunkowo dobrze zachowane lub u chorych leczonych egzogennymi preparatami EPO, stężenie ERFE jest zwiększone. Wydaje się, że ERFE może mieć modulujący wpływ na gospodarkę żelazową w sytuacji zwiększonego stężenia hepcydyny [41]. Zakres prawidłowych stężeń i działanie ERFE nie są dobrze poznane u pacjentów z PChN – niewiele jest badań nad ERFE w tej populacji chorych, a ich wyniki niespójne [37,42-43]. We wszystkich badaniach wykazano dodatnią korelację między stężeniem ERFE w surowicy a poziomem EPO, a także dawką ESA, natomiast związek między ERFE a innymi biomarkerami metabolizmu żelaza nie został jednoznacznie wykazany. W jednym z badań u pacjentów hemodializowanych (HD) leczonych długo działającymi ESA (darbepoetyna- α lub ciągły aktywator receptora EPO) stężenie ERFE wzrastało w krótkim czasie po podaniu ESA, a po kilku godzinach dochodziło do obniżenia poziomu hepcydyny. Wykazana została istotna statystycznie ujemna korelacja między ERFE a stężeniem hepcydyny i ferrytyny oraz dodatnia korelacja z rozpuszczalnym receptorem dla transferyny, co sugeruje, że ERFE może stanowić kluczowy regulator mobilizacji zapasów żelaza dla erytropoezy stymulowanej przez ESA i jednocześnie może mieć zastosowanie w monitorowaniu gospodarki żelazem u pacjentów z PChN [42]. Korelacji takiej nie wykazano w innym badaniu, co może wynikać z istotnego wpływu stanu zapalnego na syntezę hepcydyny, środowiska mocznicowego lub upośledzonego klirensu hepcydyny, w wyniku czego dochodzi do osłabienia hamującego wpływu ERFE na wydzielanie hepcydyny [37]. W celu wykazania modulującego wpływu ERFE na gospodarkę żelazem, jak również użyteczności ERFE jako biomarkera aktywności erytropoetycznej w populacji z PChN, niezbędne są dalsze badania.

4.5.3 GDF 15

Czynnik różnicowania wzrostu 15 (GDF 15) należy do nadrodziny transformującego czynnika wzrostu- β (TGF β). Wykazano związek między wzrostem stężenia GDF-15 a występowaniem niektórych chorób autoimmunologicznych, m.in. cukrzycy t. 1 i toczenia rumieniowatego układu, a także otyłości, chorób sercowo-naczyniowych i niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD) [44, 45]. Zaobserwowano również, że u pacjentów z PChN wzrost stężenia GDF 15 wiązał się z istotnie wyższym ryzykiem progresji niewydolności nerek. Podwyższone stężenia GDF 15 obserwowane w wyżej wymienionych chorobach mogą odzwierciedlać mechanizm obronny i kompensacyjny, chroniący przed uszkodzeniem tkanek, a nie patomechanizm odpowiedzialny za ich wystąpienie [46].

4.5.4 sTfR

Receptor transferyny (TfR) jest białkiem transbłonowym obecnym na powierzchni praktycznie wszystkich komórek, z wyjątkiem dojrzałych erytrocytów i niektórych wysokozróżnicowanych komórek. Rozpuszczalny receptor transferyny (sTfR) stanowi zewnątrzkomórkowy fragment TfR 2, a jego stężenie w surowicy jest proporcjonalne do zawartości TfR w ustroju. TfR bierze udział w procesie pobierania żelaza związanego z transferyną przez komórki. Stężenie sTfR wrasta w stanach przebiegających ze wzmożoną erytropoezą oraz w niedokrwistości z niedoboru żelaza [16,17]. W przeciwieństwie do ferrytyny, poziom sTfR nie zależy od stopnia nasilenia stanu zapalnego.

4.5.5 Zonulina

Zonulina jest białkiem o masie cząsteczkowej 47 kDa, które reguluje przepuszczalność bariery jelitowej poprzez wpływ na ścisłe połączenia (ang. tight junctions) między komórkami nabłonka [47]. Istnieją nieliczne badania na temat zonuliny w populacji chorych z przewlekłą chorobą nerek. Wiadomo, że jej stężenie wzrasta w różnych stanach chorobowych, takich jak celiakia, cukrzyca ciążowa, nowotwory jelit, nieswoiste zapalenia jelit i astma alergiczna [47,48,53,54]. Zwiększony poziom zonuliny w osoczu obserwowano również u dzieci z zespołem nerczycowym, chociaż nie korelował on ze stopniem nasilenia białkomoczu. Według badań przeprowadzonych przez Małyszko i wsp., wydaje się, że nie ma związku między stężeniem zonuliny a gospodarką żelaza, a także zonuliną i nasileniem stanu zapalnego u pacjentów z PChN [49]. Inne badanie przeprowadzone u chorych hemodializowanych ujawniło

znacznie podwyższone stężenia zonuliny, a także markerów stanu zapalnego (hsCRP i IL-6) w grupie badanej w porównaniu z osobami zdrowymi. Jednak wynik ten nie wiązał się ze wzrostem stężenia lipopolisacharydów lub d-mleczanu, które pośrednio odzwierciedlają przepuszczalność jelit i nadmierny rozrost bakteryjny. Autorzy sugerują, że przewlekły stan zapalny u pacjentów HD nie jest wynikiem wzrostu syntezy zonuliny i związanej z nią zwiększonej przepuszczalności jelit [50].

Rozdział 5. Założenia i cel pracy

Celem pracy była ocena gospodarki żelazem i stopnia kontroli niedokrwistości u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek leczonych dializą otrzewnową w zależności od właściwości błony otrzewnowej i resztkowej czynności nerek.

5.1 Materiały i metody

Do badania zakwalifikowani zostali pacjenci dializowani otrzewnowo z naszego Ośrodka, którzy spełnili kryteria włączenia. Kryteria włączenia obejmowały: wiek ≥ 18 lat, leczenie dializą otrzewnową (CADO lub ADO) od co najmniej 3 miesięcy i wyrażenie pisemnej świadomej zgody na udział w badaniu. Kryteriami wykluczającymi z badania były: ostre zakażenie przebyte w ciągu ostatnich 4 tygodni, aktywny nowotwór złośliwy, przetoczenie krwi w ciągu ostatnich 4 tygodni, podanie dożylnego preparatu żelaza w ciągu ostatnich 4 tygodni, niewydolność wątroby i jawne bądź utajone krwawienie.

Zebrano szereg danych demograficznych i klinicznych, w tym wiek, płeć, przyczyna niewydolności nerek, współchorobowość wyrażoną jako Charlson Comorbidity Index (CCI) oraz czas trwania dializoterapii. Uwzględnione zostały również dane dotyczące leczenia niedokrwistości – dawki stosowanych doustnych preparatów żelaza i czynników stymulujących erytropoezę (ESA); w tym wypadku był to glikol metoksypolietylenowy epoetyny beta (ang. CERA – Continuous Erythropoetin Receptor Activator).

Wyniki stężenia hemoglobiny (Hb), ferrytyny w surowicy (SF), żelaza w surowicy, całkowitej zdolności wiązania żelaza (TIBC) uzyskano przy użyciu standardowych metod laboratoryjnych (zautomatyzowany system) w certyfikowanym lokalnym laboratorium centralnym. Wysycenie transferyny żelazem (TSAT) obliczono jako stosunek żelaza w surowicy do TIBC i wyrażono w procentach.

Zgodnie z definicją bezwzględnego i funkcjonalnego niedoboru żelaza pacjenci zostali podzieleni na cztery grupy w zależności od poziomu TSAT i SF: referencyjny poziom żelaza (RIS) zdefiniowany został jako TSAT 20%-30% i SF 100-500 ng/ml, bezwzględny niedobór żelaza (AID) - TSAT $< 20\%$ i SF < 100 ng / ml, funkcjonalny niedobór żelaza (FID) - TSAT $< 20\%$ i SF > 100 ng / ml. Wyróżniono także wysoki zapas żelaza (HIS) - TSAT $> 30\%$, a SF > 500 ng / ml.

W badaniu wykorzystano następujące dostępne na rynku testy:

- Białko C-reaktywne o wysokiej czułości - hsCRP (R&D Systems, Inc. Minneapolis, Stany Zjednoczone),
- Interleukina 6 - IL-6 (R&D Systems, Inc. Minneapolis, Stany Zjednoczone)
- Rozpuszczalny receptor transferyny - sTfR (R&D Systems, Inc. Minneapolis, USA)
- Hepcydyna-25 (Peninsula Laboratories International Inc., Stany Zjednoczone)
- Erytroferron - ERFE (SunRed, Szanghaj, Chiny)
- Czynniki różnicowania wzrostu 15 - GDF15 (R&D Systems, Minneapolis, Stany Zjednoczone)
- Zonulina (Immundiagnostik AG, Bernsheim, Niemcy).

Badane parametry oznaczano w surowicy i dializacie.

Test równoważenia otrzewnowego (PET), resztkowa czynność nerek (wyrażona jako współczynnik przesączania kłębuszkowego - GFR) i adekwatność dializy (wyrażoną jako Kt/V) zostały obliczone przy użyciu wersji oprogramowania Patient OnLine (Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Niemcy).

Wykorzystane do obliczeń stężenia kreatyniny, mocznika, białka i glukozy w surowicy, moczu i dializacie uzyskano przy użyciu standardowych metod laboratoryjnych (zautomatyzowany system) w certyfikowanym lokalnym laboratorium centralnym.

Pacjenci zostali podzieleni na trzy grupy pod względem transportu otrzewnowego na podstawie D/P dla kreatyniny: wolny ($\leq 0,52$), pośredni ($0,53-0,77$) oraz szybki ($\geq 0,78$). W celu dalszej analizy, w oparciu o średnią \pm SD transportu otrzewnowego w całej badanej grupie, wyróżniono dwie podgrupy - "średnio-szybką" (D/P dla kreatyniny $\geq 0,65$) i "średnio-wolną" (D/P dla kreatyniny $< 0,65$).

5.2 Stopień nasilenia niedokrwistości w grupie badanej

Większość uczestników badania miała dobrze kontrolowaną niedokrwistość. 76% miało Hb > 10 g/dl, a większość z nich (69%) miała dobrze wyrównaną gospodarkę żelazem. Średnia wartość Hb w grupie badanej wynosiła $10,91 \pm 1,27$ g/dl. Ponad połowa pacjentów (54%) miała stężenie Hb 10-11,6 g/dl, podczas gdy 24% miało Hb < 10 g/dl, a 22% $> 11,6$ g/dl. W badaniu

wykazaliśmy, że pacjenci ze średnią Hb > 11,6 g/dl mieli znamienne lepiej zachowaną resztkową czynność nerek, wyższe stężenie albuminy w surowicy i niższe stężenie ferrytyny w surowicy. Mieli również tendencję do najniższych stężeń hepcydyny, ERFE i GDF15 w surowicy, jednak różnice te nie były statystycznie znamienne.

Prawie jedna czwarta pacjentów w badanej grupie miała stężenie hemoglobiny < 10 g/dl pomimo znacznie wyższej średniej dawki CERA i lepiej wyrównanej gospodarki żelaza, wyrażonej wyższym SF i TSAT. W porównaniu z pozostałymi pacjentami grupa ta miała znacznie gorzej zachowaną resztkową czynność nerek i niższe stężenie albuminy w surowicy. Ponadto chorzy w tej grupie mieli tendencję do bardziej nasilonego ogólnoustrojowego i wewnątrztrzewnowego stanu zapalnego, co wykazano stwierdzając wyższe stężenia IL6 i hs-CRP w surowicy i dializacie.

Stężenie Hb wykazywało silną korelację z resztkową czynnością nerek ($r = 0,53$, $p < 0,0001$), adekwatnością dializy ($r = 0,4$, $p < 0,01$) i stężeniem albuminy w surowicy ($0,36$, $p < 0,01$). Spośród biomarkerów gospodarki żelazem statystycznie istotną korelację wykazano tylko z ferrytyną w surowicy (SF; $r = -0,47$, $p < 0,001$). GFR silnie korelował z Hb ($r = 0,53$, $p < 0,0001$) i dawką CERA ($r = -0,75$, $p < 0,0001$), ale spośród badanych biomarkerów gospodarki żelazowej jedynie z ferrytyną w surowicy ($r = 0,32$, $p < 0,01$) i GDF15 ($r = -0,53$, $p < 0,01$).

5.3 Klasyczne i nowe biomarkery gospodarki żelazem

5.3.1 TSAT i ferrytyna

Średni TSAT w całej grupie wynosił $33,5 \pm 13,1\%$, a średnie stężenie ferrytyny w surowicy $345 \pm 414,3$ ng/ml. Większość pacjentów (69%) miała referencyjny poziom żelaza (RIS). Bezwzględny niedobór żelaza (AID) stwierdzono jedynie u 9% pacjentów, podczas gdy wysoki poziom żelaza (HIS) u 14%. Żaden z pacjentów nie spełniał kryteriów rozpoznania funkcjonalnego niedoboru żelaza (FID). Pacjenci z grupy HIS mieli zwykle niższy poziom Hb pomimo najwyższej średniej dawki CERA, a także wyższe stężenia hepcydyny i erytroferronu w surowicy i dializacie, jednak różnice te nie były statystycznie znamienne. W grupie tej zaobserwowano również tendencję do bardziej nasilonego stanu zapalnego, co odzwierciedlały wyższe stężenia IL6 i hs-CRP w dializacie. Wykazano ponadto, że pacjenci z nieoptymalnie wyrównaną niedokrwistością (Hb < 10 g/dl) i HIS mieli tendencję do gorzej zachowanej RRF i wyższych stężeń ferrytyny, hepcydyny, hsCRP i IL6, aczkolwiek różnice te nie osiągnęły

istotności statystycznej. Silna korelacja między GFR i Hb wyraźnie wskazuje na kluczowe znaczenie resztkowej czynności nerek u pacjentów z ERSD. Lepiej zachowana RRF wiąże się z wyższą hemoglobina w surowicy, zmniejszonym stężeniem wskaźników stanu zapalnego i lepszym rokowaniem [51-53].

5.3.2 ERFE

W całej grupie średnie stężenie erytoferronu wynosiło 1,79 ng/ml. Stosunkowo wyższe stężenia obserwowano u pacjentów z wysokimi zapasami żelaza, a ERFE istotnie korelowało jedynie z hepcydyną (0,4, $p < 0,05$), natomiast nie wykazano korelacji z innymi biomarkerami gospodarki żelaza ani dawką CERA. Obserwacja ta było dość nieoczekiwana, ponieważ w warunkach fizjologicznych ERFE wytwarzany jest w odpowiedzi na nasiloną erytropoezę, zwiększając dostępność żelaza poprzez hamowanie syntezy hepcydyny. Prawidłowe stężenia ERFE i jego znaczenie kliniczne u chorych z PChN nie zostały dotąd zbyt dobrze scharakteryzowane. Niewiele jest badań dotyczących ERFE w PChN i ograniczają się one do niedializowanych pacjentów oraz chorych hemodializowanych. We wszystkich wcześniejszych badaniach wykazano dodatnią korelację między stężeniem ERFE w surowicy a poziomem EPO, a także dawką ESA, natomiast zależność między ERFE a innymi biomarkerami metabolizmu żelaza nie została jednoznacznie wykazana [42,43]. Regulatorowy wpływ ERFE na homeostazę żelaza, a także rola ERFE jako biomarkera aktywności erytropoetycznej u pacjentów dializowanych otrzewnowo wymagają dalszych badań.

5.3.3 Zonulina

Niewiele jest badań nad zonuliną w populacji chorych z PChN, szczególnie pacjentów dializowanych otrzewnowo. Jedno z wcześniejszych badań przeprowadzone u pacjentów hemodializowanych wykazało znacznie zwiększony poziom zonuliny, a także wskaźników stanu zapalnego (hsCRP i IL6) w grupie badanej w porównaniu z osobami zdrowymi, co może sugerować rolę zonuliny w rozwoju ogólnoustrojowego stanu zapalnego u pacjentów HD [49]. W naszym badaniu stężenie zonuliny w dializacie było znamienne wyższe u pacjentów ze „średnio-szybkim” transportem, co wykazywało dodatnią korelację ze stopniem nasilenia stanu zapalnego (stężenia hsCRP i IL-6 w surowicy), aczkolwiek w przypadku hsCRP nie osiągnęło istotności statystycznej. Obserwacja ta potwierdza wyniki wyżej wymienionego badania.

5.3.4 Hepcydyna

Wcześniejsze badania potwierdziły związek między hepcydyną w surowicy a gospodarką żelazową i stopniem nasilenia niedokrwistości u pacjentów dializowanych otrzewnowo. W badaniu Małyszko i wsp. stwierdzono, że dializa otrzewnowa jest skuteczniejsza w usuwaniu hepcydyny niż hemodializa czy hemodiafiltracja [36]. Jednocześnie podkreślono wpływ RRF na stężenie hepcydyny u pacjentów hemodializowanych i dializowanych otrzewnowych. W naszym badaniu stężenie hepcydyny istotnie korelowało z SF (0,67, $p < 0,001$), TSAT (0,4, $p < 0,05$), sTfR (0,46, $p < 0,05$), hs-CRP (0,51, $p < 0,05$) i dawką CERA (0,6, $p < 0,01$).

5.3.5 sTfR

Rozpuszczalny receptor transferyny (sTfR), w przeciwieństwie do ferrytyny, nie jest białkiem ostrej fazy, w związku z czym wynik jego oznaczenie nie ulega zakłóceniu w stanie zapalnym. Dzięki temu może mieć zastosowanie w diagnostyce niedokrwistości z niedoboru żelaza w przewlekłych chorobach przebiegających ze wzmożonym stanem zapalnym. W badanej populacji stężenie sTfR korelowało dodatnio z poziomem hepcydyny i ferrytyny w surowicy oraz hsCRP i IL6 w dializacie. Nasze wyniki nie są zgodne z obserwacjami z badania przeprowadzonego u pacjentów HD. Korelacja sTfR z hsCRP i IL6 w dializacie może być wyrazem szczególnych warunków w jamie otrzewnej u pacjentów dializowanych otrzewnowo. W badaniu Aldriwesh i wsp. wykazano, że transferyna otrzewnowa, w przeciwieństwie do transferyny w surowicy, jest dobrze wysycona żelazem i jednocześnie stanowi czynnik ryzyka rozwoju wewnątrzotrzewnowego zakażenia [55].

5.3.6 GDF 15

Rola GDF 15 jako biomarkera odzwierciedlającego gospodarkę żelazową nie jest jasna. Niewiele jest dostępnych badań nad GDF 15 u pacjentów z PChN, a ich wyniki nie są do końca jednoznaczne. GDF 15 nie był dotąd badany u dorosłych pacjentów dializowanych otrzewnowo. W badaniu populacji PD u dzieci wykazano wyższe stężenia GDF 15 w porównaniu osobami zdrowymi i dziećmi hemodializowanymi [56]. Autorzy powyższego badania nie oceniali GDF 15 w zależności od rodzaju dializy (CADO vs ADO) ani transportu otrzewnowego. Niniejsze badanie nie wykazało statystycznie istotnej różnicy między obiema

grupami pacjentów ze „średnio-szybkim” i „średnio-wolnym” transportem otrzewnowym. Nasze oznaczenia GDF 15 w surowicy i dializacie populacji dorosłych pacjentów dializowanych otrzewnowo przeprowadziliśmy po raz pierwszy.

5.4 Wpływ transportu otrzewnowego na gospodarkę żelazem

W niniejszym badaniu PMT silnie korelował ze stężeniami w dializacie następujących czynników: sTfR (0,38, $p < 0,05$), hepcydyny (0,46, $p < 0,05$), GDF15 (0,5, $p < 0,01$) i zonuliny (0,64, $p < 0,001$). Wykazano także zależność między transportem otrzewnowym a IL6 w surowicy (0,4, $p = 0,03$) oraz hs-CRP zarówno w surowicy (0,39, $p = 0,04$), jak i w dializacie (0,38, $p = 0,04$). Powyższe wyniki mogą mieć związek z właściwościami błony otrzewnowej i skutecznym usuwaniem tych cząstek na drodze konwekcji, ale mogą również świadczyć o nasileniu ogólnoustrojowego i/lub miejscowego (wewnątrzotrzewnowego) stanu zapalnego. Wiadomo, że konsekwencją zapalenia toczącego się w obrębie otrzewnej jest szybszy transport otrzewnowy i wzrost przepuszczalności otrzewnej dla średnich cząstek i białek.

W niniejszym badaniu wykazano, że pacjenci ze „średnio-szybkim” transportem otrzewnowym mieli wyższe stężenia sTfR, GDF15 i zonuliny w surowicy i dializacie. Grupa ta miała ponadto tendencję do wyższych stężeń hepcydyny w dializacie, co z kolei wykazywało znamienne korelacje z oznaczeniami w surowicy ferrytyny (0,38, $p < 0,05$), sTfR (0,51, $p < 0,05$) i TSAT (0,4, $p < 0,05$).

Pacjenci ze "średnio-szybkim" transportem otrzewnowym mieli tendencję do bardziej nasilonego stanu zapalnego oraz wyższych stężeń sTfR i zonuliny zarówno w surowicy, jak i w dializacie, jednak tylko poziomy IL6 w surowicy i zonuliny w dializacie osiągnęły znamienność statystyczną.

PMT silnie korelował z CCI ($r = 0,34$, $p < 0,01$) i albuminą surowicy ($r = -0,25$, $p = 0,04$), a także IL6 w surowicy (0,4, $p = 0,03$), hs-CRP w surowicy (0,39, $p = 0,04$) i w dializacie (0,38, $p = 0,04$). Wykazano również silną korelację między PMT a stężeniem następujących substancji w dializacie: sTfR (0,38, $p < 0,05$), hepcydyny (0,46, $p < 0,05$), GDF15 (0,5, $p < 0,01$) oraz zonuliny (0,64, $p < 0,001$). Ponadto stężenie hepcydyny w dializacie korelowała ze stężeniem ferrytyny (0,38, $p < 0,05$), sTfR (0,51, $p < 0,05$) i TSAT (0,4, $p < 0,05$) w surowicy.

Rozdział 6. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską

6.1 Biomarkers of iron metabolism in chronic kidney disease

International Urology and Nephrology (2021) 53:935–944
https://doi.org/10.1007/s11255-020-02663-z

NEPHROLOGY - REVIEW



Biomarkers of iron metabolism in chronic kidney disease

Glogowski Tomasz¹ · Wojtaszek Ewa¹ · Malyszko Jolanta¹

Received: 11 May 2020 / Accepted: 21 September 2020 / Published online: 6 October 2020
© The Author(s) 2020

Abstract

Iron is the most abundant transition metal in the human body and an essential element required for growth and survival. Our understanding of the molecular control of iron metabolism has increased dramatically over the past 20 years due to the discovery of hepcidin, which regulates the uptake of dietary iron and its mobilization from macrophages and hepatic stores. Anemia and iron deficiency are common in chronic kidney disease. The pathogenesis of anemia of chronic kidney disease is multifactorial. Correction of anemia requires two main treatment strategies: increased stimulation of erythropoiesis, and maintenance of an adequate iron supply to the bone marrow. However, there are still many uncertainties in regard to iron metabolism in patients with chronic kidney disease and in renal replacement therapy. The aim of this review was to summarize the current knowledge on iron metabolism in this population, including new biomarkers of iron status. There is an area of uncertainty regarding diagnostic utility of both erythroferrone (ERFE) and hepcidin in end-stage renal disease (ESRD) patients. Higher concentration of hepcidin in oligoanuric patients may reflect decreased renal clearance. Furthermore, the hepcidin-lowering effect of ERFE in ESRD patients treated with erythropoiesis-stimulating agents (ESAs) may be blunted by underlying inflammation and concomitant iron treatment. Thus, future studies should validate the use of ERFE as a biomarker of erythropoiesis and predictor of response to iron and ESA therapy in dialysis-dependent patients.

Keywords Iron metabolism · Hepcidin · Chronic kidney disease

Introduction

According to World Health Organization (WHO), anemia is defined as a hemoglobin concentration below 13 g/dl for adult males and below 12 g/dl for non-pregnant women [1]. The most common cause of anemia worldwide is iron deficiency, while anemia of inflammation is the second most prevalent type. Prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease (CKD) increases in more advanced stages of CKD, affecting the majority of stage G4 patients (eGFR of 15 to 30 ml/min) [2, 3]. There are several underlying factors contributing to anemia in this population—relative erythropoietin deficiency, iron deficiency (both absolute and functional), impaired hepcidin clearance, shorter erythrocyte lifespan, and nutritional deficiencies (folic acid and vitamin B12, among others). CKD stage G5 patients on hemodialysis

(HD) have additional iron loss (up to 3 g per year) [4] as a consequence of chronic bleeding, repeated phlebotomy (venipuncture) and blood lost in the dialyzer and the lines. Furthermore, both HD and peritoneal dialysis (PD) patients are likely to develop chronic subclinical inflammation as a result of exposure to dialyzer membrane and drains and non-biocompatible dialysis fluid, respectively. Anemia in CKD patients leads to reduced quality of life and cardiovascular performance, cognitive impairment, increased rate of hospitalizations and increased mortality [4]. Additionally, anemia may contribute to accelerated progression to end-stage renal disease (ESRD) [5].

Iron metabolism

Iron is one of the essential elements in all living organisms. Approximately 71% of total body iron is found in hemoglobin and myoglobin in ferrous state (Fe²⁺). 25% is contained in storage proteins, ferritin and hemosiderin, in ferric state (Fe³⁺). The unique properties of iron, which can serve as both acceptor and donor of electrons, are responsible for

✉ Malyszko Jolanta
jolmal@poczta.onet.pl

¹ Department of Nephrology, Dialysis and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, ul. Banacha 1a, 02-097 Warsaw, Poland

its biologic functions but at the same time determine its toxicity. Excess iron may promote formation of reactive oxygen species (ROS) and lead to oxidative stress via damage to DNA, proteins and lipid membranes (Casu C Hepcidin agonists as therapeutic tools). As a heme cofactor, hemoglobin is responsible for transport of oxygen. Furthermore, iron is one of the compounds of catalase, peroxidase, cytochromes and other enzymes [6, 7]. Daily iron requirements amount to approximately 25–30 mg [8, 9], while iron loss (resulting from, e.g. menstruation, enterocyte and epidermal desquamation, with traces of iron also found in sweat and urine) constitutes 1–2 mg per day. There is no active mechanism that enables the elimination of iron. As a result, to maintain adequate iron balance, intestinal absorption of the element must cover daily iron loss. Healthy balanced diet provides approximately 10–20 mg of iron, of which 1–4 mg is absorbed [6, 10]. Absorption of ferrous iron (Fe^{2+}) takes place in the apical enterocytes of the duodenum with the aid of the Divalent Metal Transporter 1 (DMT1), while heme can also be absorbed via Heme Carrier Protein 1 (HCP1) [4, 7]. Ferric iron (Fe^{3+}) is not easily absorbed; therefore, the reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} is required. This process is enabled by duodenal cytochrome b-like ferrireductase enzyme (Dcytb). Absorbed iron can be stored in the enterocytes in ferritin-bound form (and usually lost as a result of enterocyte desquamation) or transported to the plasma via ferroportin (FPN1; also found in macrophages, hepatocytes and the placenta), where it binds to transferrin, which requires prior iron oxidation by hephaestin, a multicopper ferroxidase present on the basolateral membrane of the enterocyte. Transferrin, the essential iron-binding protein produced in the liver, can reversibly bind two ferric ions, thus changing its conformation to holotransferrin. Usually approximately 30–40% of transferrin molecules are saturated with iron, which means that the majority of transferrin in the plasma has conformation called apotransferrin and can buffer excess iron, if necessary. Circulating holotransferrin can be taken up by cells which have increased iron demands, e.g. erythrocyte precursors, via binding to transferrin receptor 1 (TfR1). Holotransferrin enters the cytoplasm by means of endocytosis and as a result of pH-associated change in conformation, releases iron ions. Ferric iron is once again reduced to Fe^{2+} and crosses endosomal barrier via DMT1 and is ready to be incorporated into various enzymes or storage proteins (Fig. 1).

Role of hepcidin

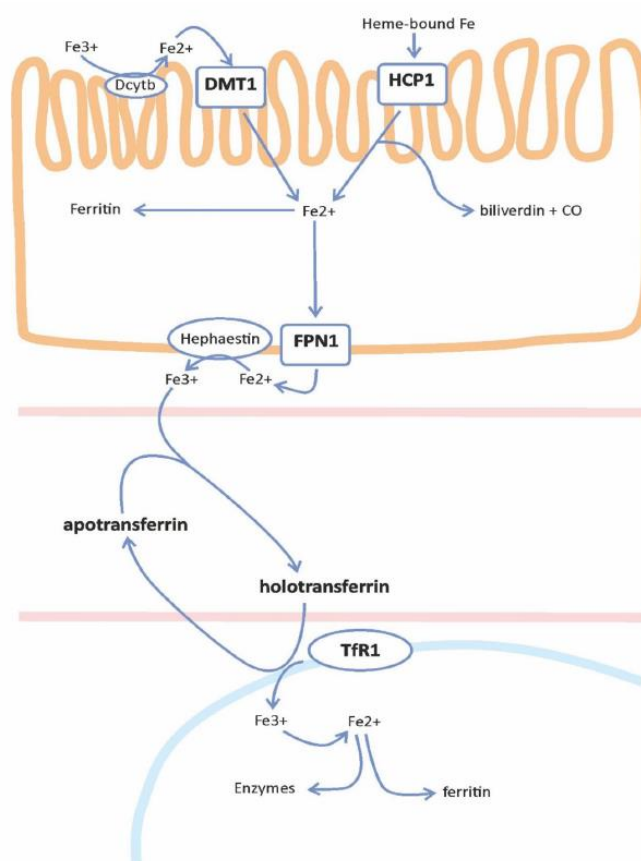
Hepcidin, a 25-amino acid polypeptide discovered in 2000, is one of the key elements of systemic iron metabolism [11]. Hepcidin is a hormone produced predominantly in the hepatocytes and released into the plasma. It binds to

ferroportin present in the cell membrane of enterocytes and macrophages and via tyrosine phosphorylation leads to internalization of ferroportin and eventually its degradation in the lysosomes. As a result, iron transport from the duodenum to the blood circulation is diminished, iron release from macrophages and hepatocytes is blocked and, consequently, iron recirculation is impaired and serum iron levels decrease [6]. Hepcidin production increases in response to iron overload, inflammation or infection, while its synthesis is diminished as a result of iron deficiency, increased erythropoiesis and hypoxia. Hepcidin expression is regulated by numerous proteins—bone morphogenetic protein-6 (BMP-6), hemojuvelin (HJV), human hemochromatosis protein (HFE), transferrin receptors TfR1 and TfR2, among others. They are influenced by both liver iron stores and circulatory iron in the form of iron-bound transferrin (holotransferrin) [12, 13]. Increased iron levels stimulate production of BMP-6, which binds to its receptor on the surface of hepatocyte and forms a complex with HJV (a membrane-bound co-receptor). This process induces SMAD (small mothers of decapentaplegic) phosphorylation pathway, leading to increased expression of hepcidin genes. HFE forms a complex with TfR and beta-2-microglobulin and TfR2, which in a not-yet-known fashion induces transcription of hepcidin genes. Mutations in the abovementioned proteins cause hereditary hemochromatosis, which manifests itself in hepcidin deficiency and iron overload [14]. Erythropoiesis stimulating factors affect hepcidin synthesis as well—for example, in the event of excessive erythropoiesis, erythropoietin (via binding with EPO receptor on the surface of hepatocytes) and growth differentiation factor 15 (GDF-15) decrease expression of hepcidin [15]. Furthermore, increased erythropoiesis is associated with elevated concentration of soluble transferrin receptor (sTfR), which is cleaved from transmembrane transferrin receptor expressed mainly in cells with high iron demands [15].

Recently, a hormone erythroferrone (ERFE) has been linked with erythropoiesis and iron balance. ERFE is synthesized in erythroblasts in response to increased erythropoiesis and it suppresses transcription of hepcidin in hepatocytes and thus increases iron availability in conditions associated with greater iron demand [16]. In murine models, ERFE deficiency is associated with mild hypochromic anemia and delayed hepcidin suppression following hemorrhage or EPO injection, while in certain conditions with ineffective erythropoiesis, such as β -thalassemia, ERFE concentrations were significantly increased [17] (Fig. 2).

Under hypoxic conditions, oxygen deficiency leads to diminished transcription of hepcidin genes (and consequently decreased production of hepcidin) via hypoxia-inducible factors (HIF-1 α , HIF-2 α) [18]. HIFs activate the expression of matrilysin-2 (also known as the transmembrane protease, serine 6; TMPRSS6), which cleaves HJV

Fig. 1 Iron absorption and metabolism. *Dcytb* duodenal cytochrome b-like ferrireductase, *DMT1* divalent metal transporter 1, *HCP1* heme carrier protein 1, *FPN1* ferroportin, *TfR1* transferrin receptor 1



from the HFE/TfR2/HJV complex, decreasing hepcidin synthesis [19]. Recently, it has been suggested that iron affects the release of fibroblast growth factor 23 (FGF-23)—a marker of increased risk of cardiovascular incidents, especially in CKD patients [20–23]. However, outcomes from clinical studies have so far been inconsistent; therefore, the impact of iron on FGF23 is unclear [24–26]. Finally, studies in humans revealed that hepcidin is one of the acute-phase proteins. It was proved that IL-1 α , IL-1 β , as well as IL-6 stimulate its expression [11, 27] via activation of the STAT3 transcription factor [28]—a mechanism responsible for iron restriction in the event of bacterial infection. Furthermore, mice with hepcidin antimicrobial peptide (HAMP) gene overexpression were affected by inflammation-related anemia of chronic diseases [29]. Conditions associated with inflammation (e.g. chronic kidney disease) lead to

hepcidin-mediated iron sequestration in the reticuloendothelial cells and, consequently, decrease iron concentration in the system. At the same time, iron distribution becomes impaired; hence, iron availability for the synthesis of hemoglobin is reduced. As a result, anemia of inflammation (anemia of chronic diseases) develops [30]. In addition, in the setting of inflammation, patients can have high ferritin levels, low TSAT, and increased iron stores but still experience restricted erythropoiesis resulting from “reticuloendothelial blockade” [5]. Moreover, functional iron deficiency, a state of inadequate delivery of iron to the bone marrow in the setting of adequate iron stores, is caused by impaired iron mobilization (from the reticuloendothelial system [RES]) and/or increased bone marrow iron demand (as might be secondary to reduced red cell life span and/or erythropoiesis-stimulating agents [ESA] use) [31]. Proinflammatory

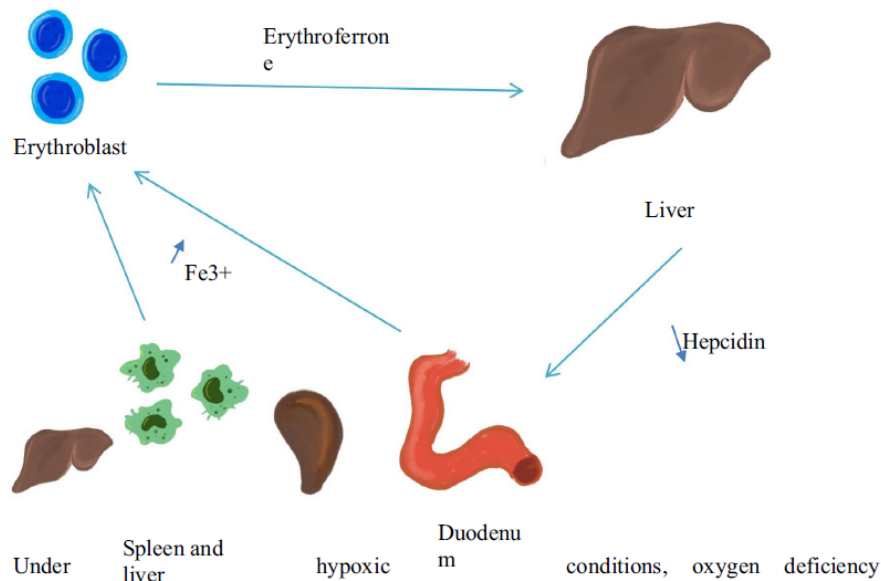


Fig. 2 Increased erythroferrone production by erythroblasts suppresses hepcidin synthesis in the liver. Low hepcidin concentration increases iron availability for erythropoiesis by enhancing iron absorption in the duodenum and iron release from macrophages in the liver and the spleen

cytokines are responsible for various processes typical of anemia of chronic diseases—they suppress erythropoiesis in the bone marrow, impair the production of erythropoietin (EPO) [31, 32] and increase the rate of erythrophagocytosis leading to shorter erythrocyte lifespan [6]. Moreover, in the event of chronic kidney disease the clearance of hepcidin is diminished and, as a result, its plasma concentration increases.

Assessment of iron status

Understanding the dysregulation of iron metabolism is essential for the precise assessment, predicting treatment response as well as effective and safe treatment of anemia of chronic kidney disease. A number of biomarkers of iron status in chronic kidney disease have been used in clinical settings. However, many of them are influenced by renal failure alone and concomitant inflammation. Due to these confounding effects on the interpretation of most of biomarkers, the assessment of iron status in chronic kidney disease is still a challenge [5, 33, 34].

Serum iron, transferrin (Tf), total iron binding capacity (TIBC, calculated as $Tf \times 1389$), transferrin saturation (TSAT, calculated as $\text{serum iron} / \text{total iron binding capacity} \times 100$) and serum ferritin are traditionally used in the

evaluation of iron status and the diagnosis of iron deficiency anemia (IDA) [35]. In general population, decreased serum ferritin ($< 15 \text{ ng/ml}$) and decreased TSAT ($< 16\%$) are used for diagnosis of iron deficiency (ID) and iron deficiency anemia (IDA) in individuals without concomitant inflammation [35]. The international guidelines for the management of IDA in CKD use the same diagnostic tests; however, they recommend different cutoff levels of serum ferritin and TSAT for the diagnosis and initiation of iron supplementation. Some guidelines recommend higher cutoff levels of TSAT ($\leq 30\%$) and serum ferritin ($\leq 200\text{--}500 \text{ ng/ml}$) [36, 37], while others, lower TSAT $< 20\%$ and serum ferritin $< 100 \text{ ng/ml}$ [38–40]. The reason for the difference remains unclear, but at least in part, it may reflect the consideration of the influence of inflammation on iron metabolism disorders in CKD and the distinct prevalence of inflammation severity between patient populations in different countries. Regardless of the values adopted, the numerous limitations of these diagnostic tools in the assessment of iron stores in the storage and functional pools, and in predicting the response to treatment should be emphasized. The traditional cutoffs of TSAT at $\leq 20\%$ and serum ferritin $\leq 100 \text{ ng/ml}$ have low sensitivity in iron deficiency detection. In Stancu et al.'s [41] study, these indices identified only 17% patients with CKD stage 3–5 as iron deficient whereas 50% prove to be iron deficient based on bone

marrow iron staining. Another limitation of these biomarkers is scant ability to differentiate between absolute and functional iron deficiency. It is assumed that low TSAT combined with normal or elevated serum ferritin level is diagnostic of functional iron deficiency [42]. However, if functional iron deficiency results of supply/demand mismatch, for example, during treatment with ESA, iron may transfer from transferrin faster than it can be mobilized from the iron stores, resulted in TSAT decrease [43].

The changes occurring in iron metabolism in CKD patients are different from those observed in iron deficiency in general population reflecting the effect of inflammation being a part of uremic state. With the progression of kidney disease, the production of transferrin in the liver is reduced, and in advanced stages of CKD, transferrin levels are reduced by 30% [44, 45]. As an acute-phase reactant, TIBC progressively decreases with kidney disease progression, and it leads to higher TSAT levels independent of iron status [13] and reduces its credibility as a measure of iron status and a threshold for initiating iron therapy in CKD patients [46]. In the meanwhile, in the majority of patients with stage 3–5 CKD, TSAT < 20% may correspond to serum iron levels below the lower limit and be indicative of iron deficiency [47]. It is postulated that more important parameter to assess iron status and prevent iron-limited erythropoiesis in CKD patients is iron concentration rather than TSAT. In recently published review, to avoid iron deficiency, target serum iron of 60 µg/dl was assumed, which corresponds to TSAT of 20% in CKD stage 3, and 22–25% in stage 4 or 5. It is established in clinical practice that serum iron is the more predictive index of iron sufficiency excluding iron-deficient erythropoiesis in hemodialysis patients [48].

Ferritin as an acute-phase reactant is frequently elevated in CKD patients irrespective of their iron stores [49]. Increased serum ferritin levels are the result of systemic inflammation and correlate positively with the severity of inflammation [50, 51]. Thus, the interpretation of serum ferritin is complicated by concomitant inflammation [35, 45]. Under minor inflammation, the specificity of low serum ferritin concentration of absolute iron deficiency diagnosis is high [35, 52], but if apparent inflammation is present, normal or elevated ferritin levels cannot exclude iron deficiency in CKD [35, 52]. Inflammation may also reduce the predictive value of serum ferritin for the response to iron supplementation. The baseline ferritin level may be predictive of the response to oral [53] and intravenous [54] iron treatment only in patients with minor inflammation expressed as low CRP level. Under concomitant inflammation, ferritin loses its predictive value of the response to iron therapy. Moreover, in highly inflamed patients, not only ferritin but also other biomarkers of iron metabolism (TSAT, CHr, or sTfR) lose their value in predicting treatment response [55–57]. In these patients, the values of CRP, but not indices of iron

status may be predictive of the response to iron supplementation [55, 57], and there is no correction factor that could be applied in estimation of iron stores depending on ferritin concentration [48].

The limitations of traditional biomarkers of iron metabolism and the response to treatment created the need to search for alternative diagnostic tools for iron management in CKD patients.

Soluble transferrin receptor (sTfR) is produced by proteolysis of the membrane transferrin receptor (TfR). Its release into circulation is increased in the setting of iron deficiency; hence, sTfR has been evaluated as a potential biomarker of iron deficiency. Soluble TfR is not an acute-phase reactant and is less influenced by inflammation than other iron metabolism indices [58]. The serum concentration of sTfR is increased in hemodialysis patients with iron deficiency and correlate inversely with iron available for erythropoiesis; however, it is not able to detect occult iron deficiency [42, 59, 60]. Unfortunately, the interpretation is confounded by the use of ESA [35, 45], and appears to represent erythropoietic activity rather than iron deficiency [42, 59, 60]. The index of sTfR to \log_{10} ferritin has better than TSAT and ferritin predictive value of iron supplementation responsiveness in hemodialysis patients [61]. The limitations of widespread measurement of sTfR include not-established standard cut-offs, costs and availability in the laboratory.

Other biomarkers of iron status include reticulocyte hemoglobin content (CHr) and percentage of hypochromic red blood cells (%Hypo). CHr provides an expression of iron availability for erythropoiesis within 3–4 days [35, 45] and CHr < 27.2 pg is diagnostic for iron deficiency [35]. %Hypo measures the concentration of hemoglobin in red blood cells (RBC), which reflects absolute amount of hemoglobin and the RBC size [35, 45] and serves as a sensitive marker of iron deficiency [35, 45] and iron status changes in the long-term assessment [35, 45]. Both these biomarkers are influenced by inflammation [62, 63]. Nevertheless, CHr and %Hypo have, compared to TSAT and serum ferritin, better sensitivity and specificity to predict iron deficiency in late stages of CKD [48]. CHr and %Hypo are predictive of iron responsiveness [64, 65] with at least similar test accuracy compared with traditional biomarkers in predicting hemoglobin increase to intravenous iron administration [66]. It needs to be highlighted that during iron supplementation the temporal changes of CHr and %Hypo differs—CHr can normalize within 2–3 days, whereas %Hypo can take even months [48]. Unfortunately, both measurements are limited by testing requirements. %Hypo must be tested on fresh blood samples (within 6 h) and CHr is time sensitive due to the maturation of erythrocytes [42].

Hepcidin, given its central role in iron metabolism regulation, has been evaluated as a biomarker of iron status and iron responsiveness in CKD patients. Many studies

have confirmed increased hepcidin levels in CKD patients [67–69]. Serum hepcidin levels have the strongest correlation with serum ferritin, TSAT and sTfR [67, 70–72] and are influenced by inflammation [67, 72, 73], iron and ESA administration [67, 71, 72, 74] and dialysis clearance [68, 69, 75]. Due to a significant intra-individual variability, the short-term measurement of serum hepcidin is not useful as a biomarker of iron status in CKD patients [76, 77]. And the interpretation of the serum hepcidin level must take into account all confounding factors. Hepcidin is not a good predictor of the response to iron supplementation in dialysis [57] and non-dialysis-dependent patients [78].

Soluble hemojuvelin (sHJV) has been explored as biomarker of iron status in patients without [79], and with chronic kidney disease [80, 81]. Opposite to cell surface HJV, soluble HJV may act as an inhibitor of BMP signaling and restrain hepcidin expression [82]. Some studies revealed that sHJV may be increased in iron deficiency and decreased during iron administration [82–84], suggesting that sHJV may be a diagnostic marker of iron status. One important concern in soluble HJV assessment is assay validity [81, 82, 85], and future studies are needed to establish sHJV value as biomarker of iron status and response to therapy.

Growth differentiation factor 15 (GDF15), secreted by matured erythroblasts, is involved in hepcidin metabolism and as such is potentially involved in iron metabolism [86]. However, available data on the role of GDF15 as the marker of iron status are scarce. In fact, one study suggested that GDF15 is increased in iron deficiency [87]; the other did not confirm it [88]. Moreover, serum GDF15 levels may be influenced by kidney disease, malnutrition and inflammation [89] complicating its usefulness as an iron status biomarker.

Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is known as a predictor of kidney disease progression and marker of inflammation [90, 91]. In addition, NGAL influences iron sequestration; however, the way that NGAL influences the iron balance depends on its form. The bound form of NGAL decreases and free form of NGAL increases the level of serum iron. Few studies evaluated the usefulness of NGAL as a biomarker of iron stores in CKD patients, suggesting its good specificity and sensitivity in the detection of decreased iron stores [92, 93]; however, future studies are needed to establish the role as a biomarker of iron status.

In summary, we conducted a search in Medline, PubMed, and Embase using the keywords: iron, biomarkers, kidney failure, CKD, dialysis, hemodialysis, peritoneal dialysis. As described in the Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses (PRISMA) group [94]. We limited our search to adult patients and publications in English and Polish till 2020. We found 541 articles, but only 102 articles were analyzed due to lack of information about full data, and availability of abstracts only or duplication. The

available data were very limited due to a high degree of heterogeneity. Taking into account the drawbacks and sometimes limited data on the utility of alternative biomarkers of iron status in chronic kidney disease, the traditional biomarkers still remain the hallmarks of the assessment of iron metabolism and responsiveness to iron therapy in this patient population.

Therapeutic strategies

Therapeutic approach should begin with diagnosis and elimination of the underlying condition responsible for iron deficiency. Iron supplementation is the next step. Initiation of iron in CKD patients with anemia should be based on preexisting iron stores and the target Hb level that is desired. Even though oral iron is generally considered sufficient in CKD patients not on dialysis and PD patients, intravenous form is the preferred route, especially in hemodialysis patients. Oral iron is associated with poor intestinal absorption and adverse event-related (mainly gastrointestinal) low adherence to therapy [94]. It needs to be emphasized that the goal of treatment with iron is not to increase Hb levels to the normal range but to reduce the risk of development of severe anemia and associated complications and to minimize the need for blood transfusions [4]. ESA therapy is generally initiated in ESRD patients with replete iron stores (i.e. TSAT > 30% and/or ferritin > 500 mcg/l) whose Hb levels are below 10 g/dl [95]. Failure to increase Hb concentration after the first month of ESA treatment is defined by KDIGO as ESA hyporesponsiveness—a poor prognostic factor in terms of patient mortality [36]. There are several factors responsible for ESA hyporesponsiveness—one of them is inflammation. A new group of oral agents known as HIF prolyl hydroxylase-inhibitors has been developed to improve CKD-associated anemia. The beneficial effect of HIF stabilizers on hemoglobin levels has been observed regardless of the patient's iron stores and inflammatory status [17]. However, the long-term safety of these novel agents, especially regarding potential risk of tumorigenesis and worsening of proliferative diabetic retinopathy, has yet to be established [17, 96]. Additionally, the increased usage of intravenous iron in hemodialysis patients during recent years has led to increasing concern over the potential development of iron overload [97, 98]. Recently, we reported that a substantial number of hemodialysis patients have positive labile plasma iron after intravenous iron administration, which positively correlated with laboratory parameters that are currently in routine clinical use for detecting iron overload and with higher intravenous iron dose [99]. Thus, we suggest to perform further studies to establish the clinical implications of labile plasma iron, a component of nontransferrin-bound

iron which may be a more accurate indicator of impending iron overload monitoring in hemodialysis patients.

Conclusion

CKD patients tend to have subclinical inflammatory-related immune activation. The pathogenesis of chronic inflammation in CKD is still not fully understood, yet the proposed underlying factors include oxidative stress, cellular senescence, hypoxia, exogenous factors (such as dialyzer membrane or central venous catheter), immune dysfunction, gut dysbiosis and retention of uremic toxins [100]. Inflammatory blockade is associated with resistance to erythropoietin despite iron availability, which is more clearly understood now that the role of hepcidin in iron metabolism has been identified. Studies conducted so far revealed that serum ERFE concentration increases in response to ESA treatment in CKD patients, while the correlation between ERFE and hepcidin remains unclear [101]. Despite having classical iron biomarkers, we still looking for new ones to improve our diagnostic and predictive tools. There is an area of uncertainty regarding diagnostic utility of both ERFE and hepcidin in ESRD patients [102]. Higher concentration of hepcidin in oligoanuric patients may reflect decreased renal clearance. Furthermore, the hepcidin-lowering effect of ERFE in ESRD patients treated with ESAs may be blunted by underlying inflammation and concomitant iron treatment. Up to date, we have no cost-effective analytical tests to assess iron metabolism in patients with CKD. Therefore, future studies should validate the use of ERFE as a biomarker of erythropoiesis and predictor of response to iron and ESA therapy in dialysis-dependent patients.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Blanc B, Finch CA, Hallberg L, Herbert V, Lawkowicz W, Layrisse M, Mollin DL, Rachmilewitz M, Ramalingaswami V, Sanchez-Medal L, Vintrobe MM (1968) Nutritional anemias. Report of a WHO Scientific Group. WHO Tech Rep Ser 405:1–40. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/40707>
- WHO_TRS_405.pdf;jsessionid=723826504327390B6E2BACE6A264BC23?sequence=1
- Astor BC, Muntner P, Levin A, Eustace JA, Coresh J (2002) Association of kidney function with anemia, the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1988–1994). *Arch Intern Med* 162(12):1401–1408
- Sofue T, Nakagawa N, Kanda E, Nagasu H, Matsushita K, Nangaku M, Maruyama S, Wada T, Terada Y, Yamagata K, Narita I, Yanagita M, Sugiyama H, Shigematsu T, Ito T, Tamura K, Isaka Y, Okada H, Tsuruya K, Yokoyama H, Nakashima N, Hiromi K, Ohe K, Okada M, Kashihara N (2020) Prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease in Japan: a nationwide, cross-sectional cohort study using data from the Japan Chronic Kidney Disease Database (J-CKD-DB). *PLoS ONE* 15(7):e0236132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236132>
- Babitt JL, Lin HY (2012) Mechanisms of anemia in CKD. *JASN* 23(10):1631–1634. <https://doi.org/10.1681/ASN.201111078>
- Fishbane S, Spinowitz B (2018) Update on anemia in ESRD and earlier Stages of CKD: core curriculum. *Am J Kidney Dis* 71(3):423–435. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2017.09.026>
- Filipiński L, Król P, Wystrychowski A (2010) Hepcidyna—hormon wątrobowy kontrolujący gospodarkę żelaza. *Forum Nefrologiczne* 3(4):233–242. https://journals.viamedica.pl/forum_nefrologiczne/article/view/10359
- Mazur G, Wróbel T, Nosol J (2005) Rola hepcydyny w regulacji homeostazy żelaza. *Acta Haematologica Polonica* 36(2):167–175. https://phtit.pl/Acta_Haematologica_Polonica.Hepcidyna_Hemochromatoza_Niedokrwistosc_w_przebiegu_chorob_przewleklych,250.html
- Andrews NC (2008) Forging a field: the golden age iron biology. *Blood* 112(2):219–230. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-077388>
- Beaumont C, Delaby C (2009) Recycling iron in normal and pathological states. *Semin Hematol* 46(4):328–338. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2009.06.004>
- Lipiński P, Starzyński R (2004) Regulacja ogólnoustrojowej homeostazy żelaza przez hepcydynę. *Postępy Hig Med Dosw (online)* 58:65–73. <https://www.phmd.pl/api/files/view/1702.pdf>
- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T (2001) Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276(11):7806–7810. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008922200>
- Camaschella C (2015) Iron-deficiency anemia. *N Engl J Med* 372:1832–1843. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1401038>
- Fleming RE, Ponka P (2012) Iron overload in human disease. *N Engl J Med* 366:348–359. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1004967>
- Casu C, Nemeth E, Rivella S (2018) Hepcidin agonists as therapeutic tools. *Blood* 131(16):1790–1794. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-11-737411>
- Zhang A-S, Enns CA (2009) Molecular mechanisms of normal iron homeostasis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009:207–214. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2009.1.207>
- Hanudel MR, Rappaport M, Chua K, Gabayan V, Qiao B, Jung G, Salusky IB, Ganz T, Nemeth E (2018) Levels of the erythropoietin-responsive hormone erythroferrone in mice and humans with chronic kidney disease. *Haematologica* 103(4):e141–e142. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.181743>
- Hasegawa T, Koiwa F, Akizawa T (2018) Anemia in conventional hemodialysis: finding the optimal treatment balance. *Semin Dial* 31(6):599–606. <https://doi.org/10.1111/sdi.12719>
- Peyssonaux C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH, Nizet V, Johnson RS (2007) Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors

- (HIFs). *J Clin Invest* 117(7):1926–1932. <https://doi.org/10.1172/jci31370>
19. Ueda N, Takasawa K (2018) Impact of inflammation on ferritin, hepcidin and the management of iron deficiency anemia in chronic kidney disease. *Nutrients* 10(9):1173. <https://doi.org/10.3390/nu10091173>
 20. Parker BD, Schurgers LJ, Brandenburg VM, Christenson RH, Vermeer C, Ketteler M et al (2010) The associations of fibroblast growth factor 23 and undercarboxylated matrix Gla protein with mortality in coronary artery disease: the Heart and Soul Study. *Ann Intern Med* 152(10):640–648. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-152-10-201005180-00004>
 21. Khan AM, Chirinos JA, Litt H, Yang W, Rosas SE (2012) FGF-23 and the progression of coronary arterial calcification in patients new to dialysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 7(12):2017–2022. <https://doi.org/10.2215/cjn.02160212>
 22. Faul C, Amaral AP, Askouei B, Hu MC, Sloan A, Isakova T et al (2011) FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 121(11):4393–4408. <https://doi.org/10.1172/jci46122>
 23. Mendoza MJ, Isakova T, Ricardo AC, Xie H, Navaneethan SD, Anderson AH et al (2012) Fibroblast growth factor 23 and inflammation in CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 7(7):1155–1162. <https://doi.org/10.2215/cjn.13281211>
 24. Wolf M, White KE (2014) Coupling fibroblast growth factor 23 production and cleavage: iron deficiency, rickets, and kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 23(4):411–419. <https://doi.org/10.1097/01.mnh.0000447020.74593.6f>
 25. Braithwaite V, Prentice AM, Doherty C, Prentice A (2012) FGF23 is correlated with iron status but not with inflammation and decreases after iron supplementation: a supplementation study. *Int J Pediatr Endocrinol* 2012(1):27. <https://doi.org/10.1186/1687-9856-2012-27>
 26. Deger SM, Erten Y, Pasaoglu OT, Derici UB, Reis KA, Onec K, Pasaoglu H (2013) The effects of iron on FGF23-mediated Ca-P metabolism in CKD patients. *Clin Exp Nephrol* 17(3):416–423. <https://doi.org/10.1007/s10157-012-0725-0>
 27. Nemeth E, Valore E, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T (2003) Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute phase protein. *Blood* 101(7):2461–2463. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3235>
 28. Wrighting DM, Andrews NC (2006) Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* 108(9):3204–3209. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-027631>
 29. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, Sirito M, Sawadogo M, Kahn A, Vaulont S (2002) Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(7):4596–4601. <https://doi.org/10.1073/pnas.072632499>
 30. Donderski R, Kardymowicz A, Manitus J (2009) Niedokrwistość nerkopochodna. Wybrane aspekty diagnostyki i terapii. *Choroby Serca i Naczyni* 6(2):82–93. https://journals.viamedica.pl/choroby_serca_i_naczyni/article/view/12052/9930
 31. Ganz T, Nemeth E (2016) Iron balance and the role of hepcidin in chronic kidney disease. *Semin Nephrol* 36:87–93. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2016.02.001>
 32. Fasano A (2012) Leaky gut and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 42(1):71–78. <https://doi.org/10.1007/s12016-011-8291-x>
 33. Babbitt JL, Lin HY (2012) Mechanism of anemia in CKD. *J Am Soc Nephrol* 23(10):1631–1634. <https://doi.org/10.1681/ASN.201111078>
 34. Wish JB (2006) Assessing iron status: beyond serum ferritin and transferrin saturation. *Clin J Am Soc Nephrol* 1(suppl 1):S4–S8. <https://doi.org/10.1159/000486968>
 35. Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC, Peyrin-Biroulet L (2016) Iron deficiency anaemia. *Lancet* 387:907–916. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00865-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00865-0)
 36. The Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Anemia Work Group (2012) KDIGO clinical practice guideline for anemia in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2:279–335. <https://doi.org/10.1038/kisup.2012.37>
 37. National Kidney Foundation (2006) KDOQI clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for anemia in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 47(5 Suppl 3):S11–S145. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2006.03.010>
 38. Locatelli F, Bárányi P, Covic A, De Francisco A, Del Vecchio L, Goldsmith D, Hörl W, London G, Vanholder R, Van Biesen W, ERA-EDTA ERBP Advisory Board (2013) Kidney disease: improving global outcomes guidelines on anaemia management in chronic kidney disease: a European Renal Best Practice position statement. *Nephrol Dial Transplant* 28:1346–1359. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft033>
 39. Tsubakihara Y, Nishi S, Akiba T, Hirakata H, Iseki K, Kubota M, Kuriyama S, Komatsu Y, Suzuki M, Nakai S, Hattori M, Babazono T, Hiramatsu M, Yamamoto H, Bessho M, Akizawa T (2010) 2008 Japanese Society for Dialysis Therapy: guidelines for renal anemia in chronic kidney disease. *Ther Apher Dial* 14:240–275. <https://doi.org/10.1111/1/j.1744-9987.2010.00836.x>
 40. Macginley R, Walker R, Irving M (2013) KHA-CARI guideline: use of iron in chronic kidney disease patients. *Nephrology (Carlton)* 18:747–749. <https://doi.org/10.1111/nep.12139>
 41. Stancu S, Stanciu A, Zugravu A, Bărsan L, Dumitru D, Lipan M, Mircescu G (2010) Bone marrow iron, iron indices, and the response to intravenous iron in patients with non-dialysis-dependent CKD. *Am J Kidney Dis* 55:639–647. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2009.10.043>
 42. Gaweda AE (2017) Markers of iron status in chronic kidney disease. *Hemodial Int* 21(Suppl 1):S21–S27. <https://doi.org/10.1111/hdi.12556>
 43. Wish JB (2006) Assessing iron status: beyond serum ferritin and transferrin saturation. *Clin J Am Soc Nephrol* 1(suppl 1):S4–S8. <https://doi.org/10.2215/CJN.01490506>
 44. Besarab A, Coyne DW (2010) Iron supplementation to treat anemia in patients with chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 6:699–771. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2010.139>
 45. Hayes M (2019) Measurement of iron status in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 34:605–613. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-3955-x>
 46. Wong MMY, Tu C, Li Y, Pecoits-Filho R, Lopes AA, Narita I, Reichel H, Port FK, Sukul N, Stengel B, Robinson BM, Massy ZA, Pisoni RL, the CKDopps Investigators (2019) Anemia and iron deficiency among chronic kidney disease Stages 3–5ND patients in the Chronic Kidney Disease Outcomes and Practice Patterns Study: often unmeasured, variably treated. *Clin Kidney J* 13:613–624. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfz091>
 47. Fishbane S, Pollack S, Feldman HI, Joffe MM (2009) Iron indices in chronic kidney disease in the National Health and Nutritional Examination Survey 1988–2004. *Clin J Am Soc Nephrol* 4:57–61. <https://doi.org/10.2215/CJN.01670408>
 48. Besarab A, Druke TB (2020) The problem with transferrin saturation as an indicator of iron “sufficiency” in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfaa048>
 49. Kim T, Rhee CM, Streja E, Obi Y, Brunelli SM, Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh K (2017) Longitudinal trends in serum ferritin levels and associated factors in a national incident hemodialysis cohort. *Nephrol Dial Transplant* 32:370–377. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfw012>

50. Kalantar-Zadeh K, Rodriguez RA, Humphreys MH (2004) Association between serum ferritin and measures of inflammation, nutrition and iron in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 19:141–149. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfg493>
51. Ruiz-Jaramillo Mde L, Guizar-Mendoza JM, Amador-Licona N, de Jesus G-N, Hernández-González MA, Dubey-Ortega LA, Solorio-Meza SE (2011) Iron overload as cardiovascular risk factor in children and adolescents with renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 26:3268–3273. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr044>
52. Macdougall IC, Bock AH, Carrera F, Eckardt KU, Gaillard C, Van Wyck D, Roubert B, Cushway T, Roger SD, FIND-CKD Study Investigators (2014) FIND-CKD: a randomized trial of intravenous ferric carboxymaltose versus oral iron in patients with chronic kidney disease and iron deficiency anaemia. *Nephrol Dial Transplant* 29:2075–2084. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfu201>
53. Macdougall IC, Bock AH, Carrera F, Eckardt KU, Gaillard C, Van Wyck D, Meier Y, Larroque S, Perrin A, Roger SD (2017) Erythropoietic response to oral iron in patients with non-dialysis-dependent chronic kidney disease in FIND-CKD trial. *Clin Nephrol* 88:301–310. <https://doi.org/10.5414/cn109198>
54. Takasawa K, Takeda C, Wada T, Ueda N (2018) Optimal serum ferritin levels for iron deficiency anemia during oral iron therapy (OIT) in Japanese hemodialysis patients with minor inflammation and benefit of intravenous iron therapy for OIT-nonresponders. *Nutrients* 10:428. <https://doi.org/10.3390/nu10040428>
55. Singh AK, Coyne DW, Shapiro W, Rizkala AR, the DRIVE Study Group (2007) Predictors of the response to treatment in anemic hemodialysis patients with high serum ferritin and low transferrin saturation. *Kidney Int* 71:1163–1171. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002223>
56. Musanovic A, Trnacevic S, Mekic M, Musanovic A (2013) The influence of inflammatory markers and CRP predictive value in relation to target hemoglobin level in patients on chronic hemodialysis. *Med Arch* 67:361–364. <https://doi.org/10.5455/medarh.2013.67.361-364>
57. Tessitore N, Girelli D, Campostriani N, Bedogna V, Solero GP, Castagna A, Mellilli E, Mantovani W, De Matteis G, Olivieri O, Poli A, Lupo A (2010) Heparin is not useful as a biomarker for iron needs in hemodialysis patients on maintenance erythropoiesis-stimulating agents. *Nephrol Dial Transplant* 25:3996–4002. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq321>
58. Suchdev PS, Williams AM, Mei Z, Flores-Ayala R, Pasricha SR, Rogers LM, MI NS (1633S) Assessment of iron status in settings of inflammation: challenges and potential approaches. *Am J Clin Nutr* 106(Suppl 6):1626S–1633S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.155937>
59. Targ DC, Huang TP (2002) Determinants of circulating soluble transferrin receptor level in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 17:1063–1069. <https://doi.org/10.1093/ndt/17.6.1063>
60. Chiang WC, Tsai TJ, Chen YM, Lin SL, Hsieh BS (2002) Serum soluble transferrin receptor reflects erythropoiesis but not iron availability in erythropoietin-treated chronic hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 58:363–369. <https://doi.org/10.5414/cnp58363>
61. Chen YC, Hung SC, Targ DC (2006) Association between transferrin receptor—ferritin index and conventional measures of iron responsiveness in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 47:1036–1044. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2006.02.180>
62. Hackeng CM, Beerenhout CM, Hermans M, Van der Kuy PHM, Van der Dussen H, Van Diejen-Visser MP, Hamulyák K, Van der Sande FM, Leunissen KM, Koomanal JP (2004) The relationship between reticulocyte hemoglobin content with C-reactive protein and conventional iron parameters in dialysis patients. *J Nephrol* 17:107–111
63. Bovy C, Tsoho C, Crapanzano L, Rorive G, Beguin Y, Albert A, Paulus JM (1999) Factors determining the percentage of hypochromic red blood cells in hemodialysis patients. *Kidney Int* 56:1113–1119. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00627.x>
64. Tessitore N, Solero GP, Lippi G, Bassi A, Faccini GB, Bedogna V, Gammara L, Brocco G, Restivo G, Bernich P, Lupo A, Maschio G (2001) The role of iron status markers in predicting response to intravenous iron in haemodialysis patients on maintenance erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant* 16:1416–1423. <https://doi.org/10.1093/ndt/16.7.1416>
65. Ratcliffe LE, Thomas W, Glen J, Padhi S, Pordes BAJ, Wonderling D, Connell R, Stephens S, Mikhail AI, Fogarty DG, Cooper JK, Dring B, Devonald MAJ, Brown C, Thomas ME (2016) Diagnosis and management of iron deficiency in CKD: a summary of the NICE guideline recommendations and their rationale. *Am J Kidney Dis* 67:548–558. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2015.11.012>
66. Chung M, Moorthy D, Hadar N, Salvi P, Iovin RC, Lau J (2012) Biomarkers for assessing and managing iron deficiency anemia in late-stage chronic kidney disease. Agency for Healthcare Research and Quality, Rockville. Report No.: 12(13)-EHC140-EF
67. Zaritsky J, Young B, Wang HJ, Westerman M, Olbina G, Nemeth E, Ganz T, Rivera S, Nissenson AR, Salusky IB (2009) Heparin—a potential novel biomarker for iron status in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 4:1051–1056. <https://doi.org/10.2215/CJN.05931108>
68. Malyszko J, Malyszko JS, Kozminski P, Mysliwiec M (2009) Type of renal replacement therapy and residual renal function may affect prohepcidin and hepcidin. *Ren Fail* 31:876–883. <https://doi.org/10.3109/08860220903216071>
69. Zaritsky J, Young B, Gales B, Wang HJ, Rastogi A, Westerman M, Nemeth E, Ganz T, Salusky IB (2010) Reduction of serum hepcidin by hemodialysis in pediatric and adult patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 5:1010–1014. <https://doi.org/10.2215/CJN.08161109>
70. van der Weerd NC, Grooteman MP, Bots ML, van den Dorpel MA, Den Hoedt CH, Mazairac Albert HA, Nubé MJ, Lars Penne E, Gaillard CA, Wetzels JFM, Wiegerinck ET, Swinkels DW, Blankestijn PJ, ter Wee PM, CONTRAST investigator (2012) Heparin-25 in chronic hemodialysis patients is related to residual kidney function and not to treatment with erythropoiesis stimulating agents. *PLoS ONE* 7:e39783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039783>
71. Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD, Taube DH, Bloom SR, Tam FW, Chapman RS, Maxwell PH, Choi P (2009) Plasma hepcidin levels are elevated but responsive to erythropoietin therapy in renal disease. *Kidney Int* 75:976–981. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.21>
72. Mercadal L, Metzger M, Haymann JP, Theruet E, Boffa JJ, Flamant M, Vrtovsnik F, Houillier P, Froissart M, Stengel B (2014) The relation of hepcidin to iron disorders, inflammation and hemoglobin in chronic kidney disease. *PLoS ONE* 9:e99781. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099781>
73. Łukaszyk E, Łukaszyk M, Koc-Zórawska E, Toboleczyk J, Bodzenta-Łukaszyk A, Małyszko J (2015) Iron status and inflammation in early stages of chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res* 40:366–373. <https://doi.org/10.1159/000368512>
74. Kato A, Tsuji T, Luo J, Sakao Y, Yasuda H, Hishida A (2008) Association of prohepcidin and hepcidin-25 with erythropoietin response and ferritin in hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 28:115–121. <https://doi.org/10.1159/000109968>
75. Stefánsson BV, Abramson M, Nilsson U, Haraldsson B (2012) Hemodiafiltration improve plasma 25-hepcidin levels: a prospective, randomized, blinded, cross-over study comparing

- hemodialysis and hemodiafiltration. *Nephron Extra* 2:55–65. <https://doi.org/10.1159/000336482>
76. Ford BA, Eby CS, Scott MG, Coyne Daniel W (2010) Intra-individual variability of serum hepcidin precludes its use as a marker of iron status in hemodialysis patients. *Kidney Int* 78:769–773. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.254>
 77. Peters HP, Rumjon A, Bansal SS, Laarakkers Coby MM, van den Brand JA, Sarafidis P, Musto R, Malyszko J, Swinkels DW, Wetzels JFM, Macdougall IC (2012) Intra-individual variability of serum hepcidin-25 in haemodialysis patients using mass spectrometry and ELISA. *Nephrol Dial Transplant* 27:3923–3929. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs164>
 78. Gaillard CA, Bock AH, Carrera F, Eckardt KU, Van Wyck DB, Bansal SS, Cronin M, Meier Y, Larroque S, Roger SD, Macdougall IC (2016) Hepcidin response to iron therapy in patients with non-dialysis dependent CKD: an analysis of the FIND-CKD trial. *PLoS ONE* 11:e0157063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157063>
 79. Finkenstedt A, Widschwendter A, Brasse-Lagnel CG, Theurl I, Hubalek M, Dieplinger H, Tselepis C, Ward DG, Vogel W, Zoller H (2012) Hepcidin is correlated to soluble hemojuvelin but not increased GDF15 during pregnancy. *Blood Cells Mol Dis* 48:233–237. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2012.02.001>
 80. Malyszko J, Malyszko JS, Levin-Iaina N, Koc-Zorawska E, Kozminski P, Mysliwiec M (2011) Is hemojuvelin a possible new player in iron metabolism in hemodialysis patients? *Int Urol Nephrol* 44:1805–1811. <https://doi.org/10.1007/s11255-011-0084-x>
 81. Rumjon A, Sarafidis P, Brincat S, Musto R, Malyszko J, Bansal SS, Macdougall IC (2012) Serum hemojuvelin and hepcidin levels in chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 35:295–304. <https://doi.org/10.1159/000336528>
 82. Lin L, Goldberg YP, Ganz T (2005) Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. *Blood* 106:2884–2889. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-1845>
 83. Silvestri L, Pagani A, Camaschella C (2008) Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood* 111:924–931. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-100677>
 84. Zhang AS, Anderson SA, Meyers KR, Hernandez C, Eisenstein RS, Enns CA (2007) Evidence that inhibition of hemojuvelin shedding in response to iron is mediated through neogenin. *J Biol Chem* 282:12547–12556. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608788200>
 85. Gutiérrez OM, Sun CC, Chen W, Babitt JL, Lin HY (2012) Statement of concern about a commercial assay used to measure soluble hemojuvelin in humans. *Am J Nephrol* 36:332–333. <https://doi.org/10.1159/000342519>
 86. Malyszko J, Koc-Zorawska E, Levin-Iaina N, Malyszko J, Kozminski P, Kobus G, Mysliwiec M (2012) New parameters in iron metabolism and functional iron deficiency in patients on maintenance hemodialysis. *Pol Arch Med Wewn* 122:537–542
 87. Lakhil S, Talbot NP, Crosby A, Stoepker C, Townsend ARM, Robbins PA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR (2009) Regulation of growth differentiation factor 15 by intracellular iron. *Blood* 113:1555–1536. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-170431>
 88. Theurl I, Finkelstedt A, Schroll A, Nairz M, Sonnweber T, Bellmann-Weiler R, Theurl M, Seifert M, Wroblewski VJ, Murphy AT, Wicher D, Zoller H, Weiss G (2010) Growth differentiation factor in anaemia of chronic disease, iron deficiency anaemia and mixed type anaemia. *Br J Hematol* 148:449–455. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07961.x>
 89. Breit SN, Carrero JJ, Tsai VW, Yagoutifam N, Luo W, Kuffner T, Bauskin AR, Wu L, Jiang L, Barany P, Heimburger O, Muri-kami MA, Apple FS, Marquis CP, Macia L, Lin S, Sainsbury A, Herzog H, Law M, Stenvinkel P, Brown DA (2012) Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15) and mortality in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 27:70–75. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr575>
 90. Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, Donato V, Campo S, Fazio MR, Nicocia G, Buemi M (2009) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and progression of chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 4:337–344. <https://doi.org/10.2215/CJN.03530708>
 91. Castillo-Rodriguez E, Fernandez-Prado R, Martin-Cleary C, Pizarro-Sánchez MS, Sanchez-Niño MD, Sanz AB, Fernandez-Fernandez B, Ortiz A (2017) Kidney injury marker 1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in chronic kidney disease. *Nephron* 136:263–267. <https://doi.org/10.1159/000447649>
 92. Kim IY, Kim JH, Lee DW, Lee SB, Rhee H, Song SH, Seong EY, Kwak IS (2018) Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin is associated with iron status in anemic patients with predialysis chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 22:28–34. <https://doi.org/10.1007/s10157-017-1409-6>
 93. Avci Cicek E, Rota S, Dursun B, Cavalci E (2016) Evaluation of serum NGAL and hepcidin levels in chronic kidney disease patients. *Ren Fail* 38:35–39. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2015.1107823>
 94. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG (2009) Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med* 6:e1000097. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>
 95. Cappellini MD, Comin-Colet J, De Francisco A, Dignass A, Doehner W, Lam CS, Macdougall IC, Rogler G, Camaschella C, Kadir R, Kassebaum NJ, Spahn DR, Taher AT, Musallam KM, IRON CORE Group (2017) Iron deficiency across chronic inflammatory conditions: international expert opinion on definition, diagnosis and management. *Am J Hematol* 92(10):1068–1078. <https://doi.org/10.1002/ajh.24820>
 96. Malyszko J, Malyszko JS, Matuszkiewicz-Rowinska J (2019) Hepcidin as a therapeutic target for anemia and inflammation associated with chronic kidney disease. *Expert Opin Ther Targets* 23(5):407–421. <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1599358>
 97. Wish JB, Aronoff GR, Bacon BR, Brugnara C, Eckardt KU, Ganz T, Macdougall IC, Núñez J, Perahia AJ, Wood JC (2018) Positive iron balance in chronic kidney disease: how much is too much and how to tell? *Am J Nephrol* 47(2):72–83. <https://doi.org/10.1159/000486968>
 98. Nakanishi T, Kuragano T (2020) Potential hazards of recent trends in liberal iron use for renal anemia. *Clin Kidney J*. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfaa117>
 99. Lenihan CR, Winkelmayr WC (2016) The dawning of a new day in CKD anemia care? *J Am Soc Nephrol* 27(4):968–970. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015091009>
 100. Bnaya A, Shavit L, Malyszko JS, Malyszko J, Slotki I (2020) Labile plasma iron levels in chronic hemodialysis patients treated by intravenous iron supplementation. *Ther Apher Dial* 24(4):416–422. <https://doi.org/10.1111/1744-9987.13458>
 101. Cobo G, Lindholm B, Stenvinkel P (2018) Chronic inflammation in end-stage renal disease and dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 33(suppl 3):iii35–iii40
 102. Appleby S, Chew-Harris J, Troughton RW, Richards AM, Pemberton CJ (2020) Analytical and biological assessment of circulating human erythroferrone. *Clin Biochem* 79:41–47. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2020.02.001>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

6.2 Iron status and anemia control are related to peritoneal membrane properties in peritoneally dialyzed patients



OPEN ACCESS

EDITED BY
Yogesh M. Scindia,
University of Florida, United States

REVIEWED BY
Komuraiah Myakala,
Georgetown University Medical Center,
United States
Tomasz Porazko,
Opole University, Poland

*CORRESPONDENCE
Jolanta Malyszko
✉ jolmal@poczta.onet.pl

RECEIVED 19 January 2023
ACCEPTED 19 June 2023
PUBLISHED 06 July 2023

CITATION
Głogowski T, Wojtaszek E and
Malyszko J (2023) Iron status and anemia
control are related to peritoneal membrane
properties in peritoneally dialyzed patients.
Front. Med. 10:1148094.
doi: 10.3389/fmed.2023.1148094

COPYRIGHT
© 2023 Głogowski, Wojtaszek and Malyszko.
This is an open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic practice.
No use, distribution or reproduction is
permitted which does not comply with these
terms.

Iron status and anemia control are related to peritoneal membrane properties in peritoneally dialyzed patients

Tomasz Głogowski, Ewa Wojtaszek and Jolanta Malyszko*

Department of Nephrology, Dialysis and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, Warsaw, Masovian, Poland

Background: Characteristics of peritoneal membrane is unique and individually different in peritoneal dialysis patients. Relationship between specific nature of peritoneal transport, anemia and inflammation has not yet been extensively studied. We attempted to outline the complex interplay of several biomarkers of iron status and their association with peritoneal transport, degree of inflammation and residual renal function.

Methods: A total of 58 patients treated with peritoneal dialysis either CAPD or APD for at least 3 months were enrolled in this study. Full blood count, traditional markers of iron status (transferrin saturation-TSAT and ferritin), serum erythroferrone-ERFE, soluble transferrin receptor (sTfR), hepcidin, zonulin, growth differentiation factor-15 (GDF15), IL-16, hsCRP and hypoxia-inducible factor- α (HIF-1- α ; in serum and dialysate) were measured using commercially available tests. We also performed Peritoneal Equilibrium Test and assessed GFR level.

Results: Hb levels above 10 g/dL was found in 74% of patients. Hb levels positively correlated with residual renal function and nutritional status. Adequate iron status was diagnosed in 69% of subjects, only in 9% of patients, criteria for absolute iron deficiency were met. Serum ERFE correlated inversely with hepcidin levels but was not associated with erythropoietin stimulating agent dose. Peritoneal transport had strong correlation with dialysate sTfR ($p < 0.05$), dialysate hepcidin ($p < 0.05$), dialysate GDF15 ($p < 0.01$) and dialysate zonulin ($p < 0.001$) levels, as well as serum IL6 ($p = 0.03$), serum hs-CRP ($p = 0.04$) and dialysate hs-CRP ($p = 0.04$).

Conclusion: Residual kidney function contributes considerably to better control of anemia. Various degree of inflammation is inherent to PD patients. Additionally, fast-average peritoneal transport is associated with greater degree of inflammation and higher concentration of markers of iron status, GDF15 and zonulin in dialysate. This finding may indicate more effective clearance of higher-range middle molecules in fast-average transporters. The role of ERFE as a marker of erythropoiesis in PD patients requires further investigation.

KEYWORDS

end-stage renal disease, peritoneal dialysis, anemia, iron homeostasis, hepcidin, erythroferrone, GDF15, zonulin

Introduction

Anemia affects the majority of patients with end-stage renal disease (ESRD). Several mechanisms have been suggested to contribute to anemia of chronic kidney disease (CKD) with relative erythropoietin deficiency, iron deficiency and maldistribution, shortened erythrocyte lifespan, nutritional deficiencies and chronic inflammation (1, 2).

Up to date, the management of anemia and iron metabolism disturbances and outcomes in predialysis CKD and hemodialysis patients have been extensively studied. There are few studies that have examined characteristics of anemia and iron status in peritoneal dialysis (PD) patients. In recently published large international study it has been shown that more than half of PD patients have a various degree of anemia, and, regardless of iron supplementation, a certain percentage of them has disequilibrium of iron status (3, 4). Abnormal iron status is associated with increased risk of all-cause and cardiovascular mortality (5, 6). Furthermore, it is a factor in terms of both risk and prognosis for PD-related infectious complications (7, 8).

Population of PD patients tends to differ from HD patients in several regards, which may impact iron homeostasis and anemia. They tend to have better preserved residual kidney function and less iron loss as a result of dialysis technique. At the same time chronic, subclinical or overt inflammation at both systemic and intraperitoneal levels commonly affects PD patients. The underlying mechanisms of inflammation in peritoneal dialysis patients are complex and result from direct stimulation of cytokine generation by uremic milieu and impaired renal clearance of inflammatory cytokines, as well as cumulative peritoneal membrane injury and dysfunction stemming from exposure to non-biocompatible dialysis fluids, episodes of PD-associated peritonitis, biofilm formation within catheter lumen and endotoxemia by translocation of macromolecules from the intestine (9–11). Furthermore, intravenous iron administration causes oxidative stress and inflammation and may affect intraperitoneal homeostasis (12, 13). Available data suggest that systemic and local intraperitoneal inflammation reflect distinct processes and sequelae, and in particular the significance and impact of intraperitoneal inflammation on iron homeostasis requires further elucidation.

PD is a continuous technique with effective diffusive and convective transport of small- to middle-molecular solutes. However, data regarding the efficacy of removal of molecules involved in iron homeostasis are scarce. It has been demonstrated that, compared to HD patients, PD patients have significantly lower serum hepcidin levels, and dialysate hepcidin concentrations are higher than of HD ultrafiltrate (14). It suggests that hepcidin may be effectively removed via peritoneal membrane, however peritoneal hepcidin clearance was evaluated only in one small study (15). It should be emphasized that individual properties of peritoneal membrane may also influence efficacy of removal of hepcidin and other solutes.

To the best of our knowledge, the influence of peritoneal membrane transport on iron metabolism in peritoneal patients has not been investigated so far.

Objectives

The aim of the study was to assess iron status and anemia control in end-stage renal disease patients on peritoneal dialysis depending on the properties of the peritoneal membrane and residual renal function.

Materials and methods

The patients in our PD program who fulfilled inclusion criteria entered the study. Inclusion criteria were: age ≥ 18 years, treatment with PD (CAPD or APD) ≥ 3 months and written informed consent for participation. Exclusion criteria were: acute inflammation within previous 4 weeks, active malignancy, blood transfusion in the last 4 weeks, use of intravenous iron in the last 4 weeks, liver failure and evident/occult bleeding as shown in flow chart on Figure 1.

The study protocol was approved by the Ethics Committee of Medical University of Warsaw, and carried out in accordance with the Declaration of Helsinki.

Data collection

Demographics and clinical data including age, gender, primary kidney disease, comorbidity burden assessed by Charlson Comorbidity Index (CCI), and dialysis vintage were collected.

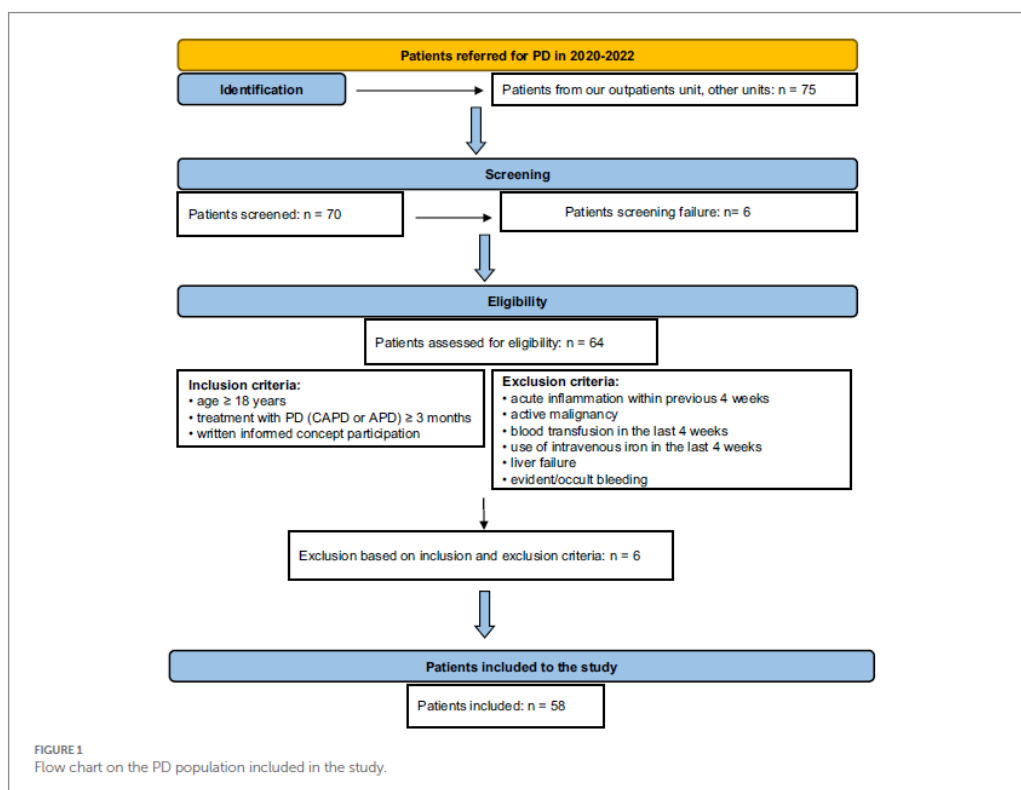
Anemia treatment—oral iron and Erythropoietin Stimulating Agent (ESA) doses were collected. All patients received CERA (Continuous Erythropoietin Receptor Activator—methoxy polyethylene glycol-epoetin beta).

Hemoglobin concentration (Hb), serum ferritin (SF), serum iron, total iron-binding capacity (TIBC) were obtained using standard laboratory methods (automated system) in certified local central laboratory. Transferrin saturation with iron (TSAT) was calculated as the ratio of serum iron and TIBC and expressed as percentage.

According to the definition of absolute and functional iron deficiency patient were categorized into four groups based on the levels of TSAT and SF: reference iron status (RIS) defined as TSAT 20%–30% and SF 100–500 ng/mL, absolute iron deficiency (AID)—TSAT < 20% and SF < 100 ng/mL, functional iron deficiency (FID)—TSAT < 20% and SF > 100 ng/mL, and high iron status (HIS)—TSAT > 30% and SF > 500 ng/mL.

Commercially available tests were used to measure high sensitivity C-reactive protein—hsCRP (R&D Systems, Inc. Minneapolis, United States), interleukin 6—IL-6 (R&D Systems, Inc. Minneapolis, United States), soluble transferrin receptor—sTfR (R&D Systems, Inc. Minneapolis, USA), hepcidin-25 (Peninsula Laboratories International Inc., United States), erythroferrone—ERFE (SunRed, Shanghai, China), growth differentiation factor 15—GDF15 (R&D Systems, Inc. Minneapolis, United States), zonulin (Immundiagnostik AG, Bernsheim, Germany). The assays were performed in serum and in dialysate.

Standard Peritoneal Equilibration Test (PET), residual renal function (expressed as glomerular filtration rate—GFR) and dialysis adequacy (expressed as Kt/V) were calculated using Patient OnLine software version (Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany). Serum creatinine, urea, protein and glucose, dialysate creatinine, urea, protein and glucose, and urine creatinine, urea and protein for calculations were obtained using standard laboratory methods (automated system) in certified local central laboratory. Patients were divided into three peritoneal membrane transport groups based on D/P creatinine: slow, ≤ 0.52 ; average, $0.53–0.77$; fast, ≥ 0.78 . For further analysis, based on the mean \pm SD of peritoneal membrane transport in the entire study group, two



transport subgroups were distinguished—“fast-average” ($D/P_{\text{creatinine}} \geq 0.65$), and “slow-average” ($D/P_{\text{creatinine}} < 0.65$).

Demographic and clinical characteristics of the studied group are presented in [Table 1](#).

Statistical analysis

Data are presented as mean and standard deviation, median (lower and upper quartile) or frequencies and percentages for categorical variables. Differences between study groups were tested using the Mann–Whitney *U*-test, Kruskal–Wallis test, and differences in the relative frequencies were tested using the Pearson chi-square test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Analyses of the correlation of each parameter were performed using Person or Spearman correlation coefficients. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

All calculations were performed using STATISTICA software package (version 13), StatSoft Poland.

Results

A total 58 patients met predefined inclusion criteria and were enrolled to the present study.

Anemia control

Mean Hb in the studied group was 10.91 ± 1.27 g/dL. The majority of patients (54%) had Hb 10–11.6 g/dL, while 24% had Hb < 10 g/dL, and 22% > 11.6 g/dL. The characteristics of the patients in each of the quartiles of Hb are presented in [Table 2](#).

Patients with mean Hb > 11.6 g/dL had significantly better preserved residual kidney function, higher serum albumin and lower serum ferritin levels. They also tended to have the lowest serum hepcidin, ERF and GDF15 levels, however differences did not reach statistical significance.

Almost a quarter of the patients in the study group had a hemoglobin concentration < 10 g/dL despite a significantly higher median CERA dose and better iron metabolism control expressed by higher SF and TSAT. Compared to the others, these patients had significantly lower residual renal function and serum albumin levels. They also tended to have more systemic and intraperitoneal inflammation, as suggested by higher serum and dialysate concentrations of IL6 and hs-CRP.

Hb strongly correlated with residual renal function ($r = 0.53$, $p < 0.0001$), dialysis adequacy ($r = 0.4$, $p < 0.01$) and serum albumin

TABLE 1 Demographic and clinical characteristics of the studied group.

Parameter	Value
Age (years)	49 ± 17
Male sex (n, %)	n = 28 (48%)
Charlson comorbidity index (CCI)	5 ± 3
The cause of kidney disease: (n, %)	
• Diabetic nephropathy	n = 5 (8%)
• Glomerulonephritis	n = 29 (50%)
• Hypertensive/vascular	n = 4 (7%)
• Interstitial nephropathy	n = 10 (17%)
• ADPKD	n = 5 (8%)
• Other/unknown	n = 6 (10%)
Dialysis vintage (months)	Median 9 (3–186)
Dialysis method	
CAPD (n, %)	27 (47%)
APD (n, %)	31 (53%)
PMT (D/Pcreatinine)	0.65 ± 0.11
GFR (mL/min)	5.84 ± 4.24
Kt/V	2.59 ± 0.84
CERA users (n, %)	26 (45%)
Oral iron users (n, %)	14 (24%)

CAPD, Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis; APD, Automated Peritoneal Dialysis; PMT, peritoneal membrane transport; GFR, glomerular filtration rate; CERA, Continuous Erythropoietin Receptor Activator; ADPKD, Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease.

(0.36, $p < 0.01$). Among iron status biomarkers, statistically significant correlation was revealed only with serum ferritin (SF; $r = -0.47$, $p < 0.001$). Details are presented in Table 3.

GFR strongly correlated with Hb ($r = 0.53$, $p < 0.0001$) and CERA dose ($r = -0.75$, $p < 0.0001$), but among iron status biomarkers only with serum ferritin ($r = 0.32$, $p < 0.01$) and GDF15 ($r = -0.53$, $p < 0.01$).

Iron status

Mean TSAT in the entire group was $33.5 \pm 13.1\%$, and mean serum ferritin 345 ± 414.3 ng/mL. The majority of patients (69%) had reference iron status (RIS). Absolute iron deficiency (AID) has been found only in 9% of patients while high iron status (HIS) 14%. None of the patients met the criteria for the diagnosis of a functional iron deficiency (FID). The characteristics of patients stratified by iron status are presented in Table 4.

Patients in HIS group tended to have worse preserved RRF and lower Hb level compared to others despite higher CERA doses. They had higher serum and dialysate hepcidin and erythroferrone levels, however the differences did not reach statistical significance. In this group, there was also a trend toward more intense inflammation, especially in relation to higher concentrations of IL6 and hs-CRP in the dialysate.

In the entire studied group, ERF correlated significantly only with hepcidin (0.4, $p < 0.05$), but not other iron status biomarker or CERA dose.

Hepcidin correlated significantly with SF (0.67, $p < 0.001$), TSAT (0.4, $p < 0.05$), sTfR (0.46, $p < 0.05$), hs-CRP (0.51, $p < 0.05$) and CERA dose (0.6, $p < 0.01$). Details are presented in Table 5.

Iron status and peritoneal membrane transport

The majority of patients (65%) had average peritoneal membrane transport (D/Pcreatinine 0.53–0.77), 21% had slow peritoneal membrane transport (D/Pcreatinine ≤ 0.52), and 14% had fast peritoneal membrane transport (D/Pcreatinine ≥ 0.78). In each of the iron status categories the proportion of patients with particular type of peritoneal membrane transport was similar (RIS: average PMT 67%, slow PMT 18%, fast PMT 15%; HIS average PMT 63%, slow PMT 25%, fast PMT 12%; AID average PMT 60%, slow PMT 20%, fast PMT 20%).

For further analysis, based on the mean \pm SD of peritoneal membrane transport in the entire study group, two transport subgroups were distinguished—“fast-average” (D/Pcreatinine ≥ 0.65), and “slow-average” (D/Pcreatinine < 0.65). The clinical characteristics of the subgroups are presented in Table 4, and data on iron biomarkers in serum and dialysate assessed by us are presented in Table 6.

“Fast-average” transporters tended to have more severe inflammation and higher serum and dialysate levels of sTfR and zonulin, however, only serum IL6 and dialysate zonulin reached statistical significance.

PMT strongly correlated with CCI ($r = 0.34$, $p < 0.01$) and serum albumin ($r = -0.25$, $p = 0.04$) as well as serum IL6 (0.4, $p = 0.03$), serum hs-CRP (0.39, $p = 0.04$) and dialysate hs-CRP (0.38, $p = 0.04$). Strong correlation was also revealed between PMT and dialysate sTfR (0.38, $p < 0.05$), dialysate hepcidin (0.46, $p < 0.05$), dialysate GDF15 (0.5, $p < 0.01$) and dialysate zonulin (0.64, $p < 0.001$) levels.

Moreover, dialysate hepcidin correlated with serum ferritin (0.38, $p < 0.05$), sTfR (0.51, $p < 0.05$) and TSAT (0.4, $p < 0.05$).

Discussion

In the study, we present preliminary data exploring the relationship between iron status and peritoneal membrane transport. We assumed that intraperitoneal milieu and properties of the peritoneal membrane can affect iron homeostasis as a result of local intraperitoneal inflammation and, potentially, clearance of molecules involved in iron metabolism. To our knowledge this is the first study which evaluates iron metabolism biomarkers in dialysis effluent and estimates the relationship between PMT category and biomarkers of iron homeostasis.

Most of the study participants had well controlled anemia. 76% had Hb > 10 g/dL, and the majority of them (69%) had well-balanced iron status. Only 9% patients met the criteria for absolute iron deficiency, while none had functional iron deficiency. Our results stand out significantly from the literature data according to which iron deficiency prevalence exceeds 26% (6, 8, 16). At least in part, this may be due to the fact that current analysis excluded patients with conditions that may have at least potentially contributed to absolute or functional iron deficiency. Fourteen percent of patients in our cohort had high iron status, comparable to other reports (6, 8). These patients tended to have the lowest Hb level despite the highest median CERA dose, and worse preserved RRF. Although the differences were not statistically

TABLE 2 Characteristics of patients according to Hb level.

	Hb < 10 g/dL	Hb 10–11.6 g/dL	Hb > 11.6 g/dL	P
Age (years)	46 ± 19	49 ± 16	54 ± 19	NS
CCI	4.5 ± 3	4.5 ± 2.2	5.3 ± 2.9	NS
CERA	62.5 (0–110)	30 (0–75)	0	<0.01
GFR (ml/min)	1.5 (0–4.1)	5.6 (2.8–8.8)	9.4 (6.0–11.6)	<0.001
Kt/V	2.15 ± 0.7	2.64 ± 0.65	2.93 ± 1.19	NS
PMT (D/Pcreatinine)	0.64 ± 0.12	0.64 ± 0.12	0.66 ± 0.1	NS
Serum albumin (g/dL)	3.53 ± 0.6	3.75 ± 0.45	3.99 ± 0.31	<0.05
Serum ferritin (ng/mL)	368 (290–643)	206 (144–337)	173 (111–208)	<0.05
TSAT (%)	36.4 ± 14.5	33.3 ± 12.4	31.0 ± 13.6	NS
Erythroferone (ng/mL)	1.61 (0.84–3.47)	2.28 (1.47–5.3)	1.34 (0.81–3.17)	NS
Serum sTfR (nmol/L)	46.6 ± 14.2	35.8 ± 8.2	41.8 ± 7.7	NS
Dialysate sTfR (nmol/L)	0.1 (0.06–0.13)	0.06 (0.01–0.18)	0.04 (0.03–0.2)	NS
Serum Hepcidin (ng/mL)	72.2 (59.2–128.1)	94.5 (40.2–140.7)	33.4 (25.9–75.4)	NS
Dialysate Hepcidin (ng/mL)	9.4 (8.8–28.9)	7.9 (5.4–18.5)	10.3 (7.9–38.8)	NS
Serum hs-CRP (ng/mL)	4,998 (2,345–11,200)	1,403 (710–2,972)	1,322 (996–2,858)	NS
Dialysate hs-CRP (ng/mL)	35.6 (10.3–117.9)	11.9 (3.5–78.8)	14.6 (7.9–27.9)	NS
Serum IL6 (pg/mL)	9.14 (8.16–14.84)	5.69 (3.4–11.3)	5.7 (4.1–7.78)	NS
Dialysate IL6 (pg/mL)	85.0 (50.6–102.9)	37.1 (6.4–75.8)	46.4 (25.8–67.1)	NS
Serum GDF15 (pg/mL)	3,873 (3,630–4,495)	3,182 (2,237–4,193)	2,982 (2,346–3,602)	NS
Dialysate GDF15 (pg/mL)	391 (375.5–454.3)	310.3 (102.8–551.9)	218.8 (201.6–575.0)	NS
Serum Zonulin (ng/mL)	73.3 (64.2–77.2)	58.5 (54.2–64.3)	61.1 (59.4–66.6)	NS
Dialysate Zonulin (ng/mL)	0.75 (0.65–0.97)	0.54 (0.3–0.66)	0.6 (0.54–1.13)	NS

CCI, Charlson Comorbidity Index; GFR, glomerular filtration rate; PMT, peritoneal membrane transport; CERA, Continuous Erythropoietin Receptor Activator; TSAT, transferrin saturation with iron; sTfR, soluble transferrin receptor; hs-CRP, high sensitivity C-reactive protein; IL-6, interleukin 6; GDF15, growth differentiation factor 15.

significant, the characteristics of patients with suboptimal anemia control (Hb < 10 g/dL) and HIS, showed that they tended to have worse preserved RRF and higher levels of ferritin, hepcidin, hsCRP and IL6. The weakness of statistical significance of the observed relationships may result from the relative homogeneity and small size of the group. Nevertheless, strong correlation between GFR and Hb clearly demonstrates the paramount importance of residual renal function in patients with ERS. It has been ascertained that RRF is associated with higher serum hemoglobin, decreased circulating inflammatory markers, and better clinical outcomes in several regards (17–19).

In the entire group median erythroferone level was 1.79 ng/mL. Relatively higher levels were observed in patients with high iron status, and ERFE correlated significantly only with hepcidin, but not CERA dose. This finding was unexpected, because physiologically ERFE is produced in response to increased erythropoiesis and increases iron availability via suppression of hepcidin. Nevertheless, ERFE concentration and its significance in CKD patients are not well-characterized, and information on ERFE in CKD is scarce and, in fact, limited to CKD non-dialysis-dependent and hemodialysis patients. In all prior studies positive correlation between serum ERFE levels and serum EPO, as well as ESA dose. Was confirmed, while the relationship between ERFE and biomarkers of iron metabolism has not been clearly demonstrated (20–22). Honda et al. revealed statistically significant negative correlation between ERFE and hepcidin and ferritin levels, and a positive correlation with soluble transferrin

receptor (20). The inverse relationship between ERFE and biomarkers of iron metabolism (serum iron and ferritin) was confirmed in the cohort of CKD and HD patients in the Spoto et al. study (22). Meanwhile, in the Honda et al. study, ERFE did not correlate with hepcidin or any biomarker of iron metabolism (21). The modulatory effect of ERFE on iron homeostasis, as well as a role of ERFE as a biomarker of erythropoietic activity in PD patients, and generally in CKD population, need evaluation in future studies.

There is some evidence that systemic and intraperitoneal iron status may differ in patients on peritoneal dialysis (7). However, intraperitoneal iron biology and the impact of individual difference in peritoneal membrane properties on iron status in PD patients are poorly studied.

In our study PMT strongly correlated with dialysate sTfR (0.38, $p < 0.05$), dialysate hepcidin (0.46, $p < 0.05$), dialysate GDF15 (0.5, $p < 0.01$) and dialysate zonulin (0.64, $p < 0.001$) levels, as well as serum IL6 (0.4, $p = 0.03$), serum hs-CRP (0.39, $p = 0.04$) and dialysate hs-CRP (0.38, $p = 0.04$). It is unclear if the abovementioned findings are associated with the properties of the peritoneal membrane and elimination of these molecules via convective transport, or due to systemic and/or local intraperitoneal inflammation. This observation needs to be elucidated further. So far, only peritoneal hepcidin clearance using peritoneal equilibration test was evaluated and confirmed in one small study (15). At the same time, fast peritoneal transport associated with intraperitoneal inflammation results in high

TABLE 3 Correlations between hemoglobin and studied parameters.

	Hemoglobin	P
CCI	0.15	NS
CERA	-0.47	<0.0001
GFR (mL/min)	0.53	<0.0001
Kt/V	0.4	<0.01
PMT (D/Pcreatinine)	-0.02	NS
Serum albumin (g/dL)	0.36	<0.01
Serum ferritin (ng/mL)	-0.47	<0.001
TSAT (%)	-0.15	NS
Erythroferone (ng/mL)	-0.06	NS
Serum sTfR (nmol/L)	-0.09	NS
Dialysate sTfR (nmol/L)	-0.16	NS
Serum Heparin (ng/mL)	-0.2	NS
Dialysate Heparin (ng/mL)	0.19	NS
Serum hs-CRP (ng/mL)	-0.22	NS
Dialysate hs-CRP (ng/mL)	-0.22	NS
Serum IL6 (pg/mL)	-0.37	NS
Dialysate IL6 (pg/mL)	-0.36	NS
Serum GDF15 (pg/mL)	-0.29	NS
Dialysate GDF15 (pg/mL)	-0.15	NS
Serum Zonulin (ng/mL)	-0.14	NS
Dialysate Zonulin (ng/mL)	-0.35	NS

CCI, Charlson Comorbidity Index; GFR, glomerular filtration rate; PMT, peritoneal membrane transport; CERA, Continuous Erythropoietin Receptor Activator; TSAT, transferrin saturation with iron; sTfR, soluble transferrin receptor; hs-CRP, high sensitivity C-reactive protein; IL-6, interleukin 6; GDF15, growth differentiation factor 15.

TABLE 4 Clinical characteristics of patients according to peritoneal membrane transport.

	Fast-average PMT	Slow-average PMT	P
Age (years)	53 ± 17	46 ± 17	NS
CCI	5.5 ± 2.7	3.9 ± 2.3	<0.05
CERA (°)	0 (0–75)	30 (0–30)	NS
GFR (mL/min)	5.9 ± 4.6	5.7 ± 3.9	NS
Kt/V	2.62 ± 0.9	2.55 ± 0.71	NS
Serum albumin (g/dL)	3.7 ± 0.4	3.79 ± 0.54	NS
Hemoglobin (g/dL)	11.1 ± 1.33	10.8 ± 1.22	NS
Serum ferritin (ng/mL)	186 (125–360)	281 (144–419)	NS
TSAT (%)	32.6 ± 12.8	34.6 ± 13.3	NS

CCI, Charlson Comorbidity Index; GFR, glomerular filtration rate; PMT, peritoneal membrane transport; CERA, Continuous Erythropoietin Receptor Activator; TSAT, transferrin saturation with iron.

peritoneal membrane permeability not only for small solutes but also for middle-size molecules and proteins (23–25).

In our study, fast-average transporters tended to have higher serum and dialysate levels of sTfR, GDF15 and zonulin. Although the differences did not reach statistical significance, fast-average transporters tended to have higher dialysate hepcidin levels, and dialysate hepcidin significantly correlated with serum ferritin (0.38, $p < 0.05$), sTfR (0.51, $p < 0.05$) and TSAT (0.4, $p < 0.05$).

Previous studies confirmed the relationship between serum hepcidin and iron status and anemia in patients on PD (14, 26, 27). The significance of this phenomenon is not clear as only one study to date has assessed the concentration of hepcidin in peritoneal effluent (14). In this study, it was found that the removal of hepcidin through the peritoneal membrane is significantly more effective than during hemodialysis or hemodiafiltration, but also that RRF is one of the significant

TABLE 5 Correlations between iron status biomarkers and studied parameters.

	Serum ferritin (ng/mL)	TSAT (%)	Serum sTfR (nmol/L)	Serum hepcidin (ng/mL)	Serum GDF15 (pg/mL)	Serum Zonulin (pg/mL)	Erythroferrone (ng/mL)
CCI	-0.21	-0.3	0.34	-0.17	0.18	0.16	-0.2
CERA	0.34	0.02	0.17	0.6**	0.42	0.09	-0.06
GFR (mL/min)	-0.32*	-0.09	-0.13	-0.13	-0.54**	-0.02	0.11
Kt/V	-0.2	0.07	0.03	0.15	-0.5**	0.02	0.24
PMT (D/Pcreatinine)	0.01	-0.09	0.48*	-0.06	0.14	0.31	-0.18
Serum albumin (g/dL)	0.02	0.08	0.09	0.07	-0.15	0.08	0.06
Serum ferritin (ng/mL)	x	0.57**	-0.11	0.67***	0.18	0.034	0.34
TSAT (%)	0.57**	x	-0.2	0.4	-0.13	-0.2	0.27
Erythroferrone (ng/mL)	0.33	0.23	-0.07	0.4*	-0.23	-0.13	X
Serum sTfR (nmol/L)	-0.1	-0.19	X	0.46*	0.14	0.32	-0.07
Dialysate sTfR (nmol/L)	-0.2	-0.18	0.37	-0.33	0.18	0.14	-0.12
Serum Hepcidin (ng/mL)	0.67***	0.4*	0.46*	X	0.1	-0.12	0.4*
Dialysate Hepcidin (ng/mL)	0.38	0.1	0.09	0.54**	0.51**	-0.7	0.08
Serum hs-CRP (ng/mL)	0.02	-0.05	0.13	-0.18	-0.12	-0.07	0.07
Dialysate hs-CRP (ng/mL)	-0.03	-0.01	0.28	-0.08	-0.19	-0.1	0.09
Serum IL6 (pg/ml)	-0.12	-0.25	0.34	-0.17	0.12	0.11	0.003
Dialysate IL6 (pg/mL)	0.46**	-0.34	0.25	0.09	-0.09	0.06	0.14
Serum GDF15 (pg/mL)	0.17	-0.13	0.14	0.1	X	0.21	-0.23
Dialysate GDF15 (pg/ml)	0.03	-0.12	0.22	-0.09	0.53**	0.04	-0.07
Serum Zonulin (ng/mL)	-0.03	-0.2	0.32	-0.12	0.21	X	-0.13
Dialysate Zonulin (ng/mL)	-0.35	-0.07	0.42	-0.11	0.17	0.02	-0.02

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. CCI, Charlson Comorbidity Index; GFR, glomerular filtration rate; PMT, peritoneal membrane transport; CERA, Continuous Erythropoietin Receptor Activator; TSAT, transferrin saturation with iron; sTfR, soluble transferrin receptor; hs-CRP, high sensitivity C-reactive protein; IL-6, interleukin 6; GDF15, growth differentiation factor 15. Bold means statistically significant.

predictors of hepcidin in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. Inverse association between hepcidin level and estimated glomerular filtration rate was revealed also in G35–5 CKD patients (28). These findings suggest that hepcidin may be not only key player in iron homeostasis, but also uremic toxin associated with the risk of mortality in PD patients (29).

Soluble transferrin receptor (sTfR) represents the extracellular domain part of the TfR, and its concentration is proportional to the amount of TfR in the total body. STfR is not an acute-phase reactant and is less influenced by inflammation than other iron metabolism indices and may be useful for assessing iron deficiency anemia in chronic disorders. Another known role of sTfR is that it represents the erythropoietic activity of bone marrow (30). In our study population sTfR correlated positively with serum hepcidin and ferritin and dialysate hsCRP and IL6. Our results are in contrary to the study conducted in HD patients (31).

The correlation sTfR with dialysate hsCRP and IL6 may be an expression of specific iron state in peritoneal cavity in PD patients. In Aldriwesh et al. study proteomic analysis revealed that peritoneal transferrin is iron-saturated, which is in marked contrast to transferrin in serum and is a risk of intraperitoneal infection (7).

Zonulin, a 47 kDa protein, which regulates intestinal permeability via alteration of tight junctions, has not been extensively studied in CKD population yielding slightly different results on its function, and in fact there is no data on zonulin in PD patients (32, 33). The study performed in hemodialysis patients revealed significantly increased zonulin levels, as well as inflammatory markers (hsCRP and IL-6) in the study group compared with healthy subjects.

A borderline correlation with serum hypersensitive CRP suggests that zonulin may play a role in the systemic inflammation in HD patients (34). In our study concentration of zonulin in dialysate was significantly higher in fast-average transporters, which corresponded positively with the degree of inflammation as measured by serum hsCRP and IL-6, although with former it did not reach statistical relevance. This finding is of interest, since it reinforces results from the aforementioned study. Further investigation on the role of zonulin in intestinal permeability and induction of inflammation in PD patients would be advisable.

These data could suggest that zonulin could be a link between inflammation and iron homeostasis disorders. However the studies conducted in early stages CKD patients and kidney transplant recipients showed no relationship between zonulin and iron state parameters (35–37).

TABLE 6 Biomarkers of iron metabolism and inflammation according to peritoneal membrane transport.

	Fast-average PMT	Slow-average PMT	P
Serum sTfR (nmol/L)	43.4 (36.6–44.8)	31.1 (28.9–42.4)	0.05
Dialysate sTfR (nmol/L)	0.15 (0.06–0.2)	0.04 (0.01–0.11)	0.05
Serum Heparin (ng/mL)	72.2 (31.6–101.2)	72.06 (35.2–134.4)	NS
Dialysate Heparin (ng/mL)	10.72 (8.2–48.3)	5.53 (5.44–10.09)	NS
Serum Erythroferrone (ng/mL)	1.48 (1.07–3.53)	2.3 (1.44–4.65)	NS
Serum hs-CRP (ng/mL)	2,394 (1,403–4,498)	1,358 (672.3–2,972)	0.05
Dialysate hs-CRP (ng/mL)	31.75 (11.26–98.35)	10.25 (2.24–41.84)	0.05
Serum IL6 (pg/mL)	9.16 (6.88–15.75)	4.22 (2.88–6.31)	0.01
Dialysate IL6 (pg/mL)	46.36 (17.3–83.96)	48.24 (13.95–67.61)	NS
Serum GDF15 (pg/mL)	3,602 (2,346–4,214)	2,999 (2,290–4,193)	NS
Dialysate GDF15 (pg/mL)	422.65 (187.9–633.4)	201.6 (95.29–543)	NS
Serum Zonulin (pg/mL)	64.29 (60.4–69.68)	55.47 (54.17–64.31)	0.05
Dialysate Zonulin (pg/mL)	0.78 (0.59–1.54)	0.54 (0.26–0.66)	0.02

PMT, peritoneal membrane transport; sTfR, soluble transferrin receptor; hs-CRP, high sensitivity C-reactive protein; IL-6, interleukin 6; GDF15, growth differentiation factor 15.

Growth differentiation factor 15 (GDF15), an anti-inflammatory cytokine, secreted by matured erythroblasts is involved in hepcidin metabolism and as such is potentially involved in iron metabolism. Nevertheless, available data on the role of GDF15 as the marker of iron status in CKD patients are scarce and yield slightly inconsistent results (38–41).

GDF-15 was not studied in adult PD patients, in pediatric PD population it was shown to be elevated in comparison to the healthy subjects and hemodialyzed children (42). The authors did not assess GDF-15 in relation to the modality of PD or membrane transport in PET test.

Our study did not reveal a statistically significant difference between 2 groups of peritoneal membrane transporters. In addition, for the first time we did assess GDF-15 in serum and dialysate in adult PD population.

Limitations

There are some limitations to our study. This is a single center study. The sample size was relatively small when compared with studies on HD patients. As a result some of our findings did not reach statistical significance. However on the other hand, this is a relative large and homogenous PD population. Despite that, further investigation in larger cohorts from different centers may confirm at least some of our results and may yield others.

Conclusion

Anemia in PD patients is less pronounced in those with better preserved residual kidney function. This group of patients tends to have a various degree of inflammation, with fast-average transporters displaying greater degree of inflammation. Higher concentration of dialysate sTfR, hepcidin, GDF15 and zonulin in

this group of patients may indicate more effective clearance of these molecules. The role of ERFE in regard to erythropoietic activity in PD patients requires further investigation.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethics Committee at Medical University of Warsaw, Poland. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

TG and EW contributed to the conception and design of the study, collected the data, performed the statistical analysis, wrote the manuscript, and prepared its final version. JM contributed to the conception and design of the study, wrote the manuscript, and prepared its final version. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated

organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

References

- Fishbane S, Spinovitz B. Update on anemia in ESRD and earlier stages of CKD: core curriculum 2018. *Am J Kidney Dis.* (2018) 71:423–35. doi: 10.1053/j.ajkd.2017.09.026
- Babbitt JL, Lin HY. Mechanism of anemia in CKD. *J Am Soc Nephrol.* (2012) 23:1631–4. doi: 10.1681/ASN.2011111078
- Perlman RL, Zhao J, Fuller DS, Bieber B, Li Y, Pisoni RL, et al. International anemia prevalence and management in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int.* (2019) 39:539–46. doi: 10.3747/pdi.2018.00249
- Rostoker G, Griancelli M, Ghali N, Beaudreuil S, Cohen Y, Issad B. Hepatic iron load differs strikingly between peritoneal dialysis and hemodialysis patients. *Bull Dial Domic.* (2019) 2:181–91. doi: 10.25796/bdd.v2i4.23613
- Maruyama Y, Yokoyama K, Yokoo T, Shigematsu T, Iseki K, Tsubakihara Y. The different association between serum ferritin and mortality in hemodialysis and peritoneal dialysis patients using Japanese nationwide dialysis registry. *PLoS One.* (2015) 10:e0143430. doi: 10.1371/journal.pone.0143430
- Luo D, Zhong Z, Qiu Y, Wang Y, Li H, Lin J, et al. Abnormal iron status is associated with increased risk of mortality in patients on peritoneal dialysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* (2021) 31:1148–55. doi: 10.1016/j.numecd.2020.12.018
- Aldriwesh M, Al-Dayyan N, Barratt J, Freestone P. The iron biology status of peritoneal dialysis patients may be a risk factor for development of infectious peritonitis. *Perit Dial Int.* (2019) 39:362–74. doi: 10.3747/pdi.2018.00052
- Diao X, Zheng Z, Yi C, Cao P, Ye H, Liu R, et al. Association of abnormal iron status with the occurrence and prognosis of peritoneal dialysis-related peritonitis: a longitudinal data-based 10-year retrospective study. *Nutrients.* (2022) 14:1613. doi: 10.3390/nu14081613
- Cho Y, Hawley CM, Johnson DW. Clinical causes of inflammation in peritoneal dialysis patients. *Int J Nephrol.* (2014) 2014:909373. doi: 10.1155/2014/909373
- Lambie M, Chess J, Donovan KL, Kim YL, do JY, Lee HB, et al. Independent effects of systemic and peritoneal inflammation on peritoneal dialysis survival. *J Am Soc Nephrol.* (2013) 24:2071–80. doi: 10.1681/ASN.2013030314
- Innico G, Gobbi L, Bertoldi G, Rigato M, Basso A, Bonfante L, et al. Oxidative stress, inflammation, and peritoneal dialysis: a molecular biology approach. *Artif Organs.* (2021) 45:1202–7. doi: 10.1111/aor.14001
- Breborowicz A, Polubinska A, Kupczyk M, Wanic-Kossowska M, Oreopoulos DG. Intravenous iron sucrose changes the intraperitoneal homeostasis. *Blood Purif.* (2009) 28:53–8. doi: 10.1159/000210038
- Misian M, Baum E, Breborowicz A. N-acetylcysteine modulates effect of the iron isomaltoside on peritoneal mesothelial cells. *J Physiol Pharmacol.* (2020) 71. doi: 10.26402/jpp.2020.3.07
- Malyszko J, Malyszko JS, Kozminski P, Mysliwiec M. Type of renal replacement therapy and residual renal function may affect prohepcidin and hepcidin. *Ren Fail.* (2009) 31:876–83. doi: 10.3109/08860220903216071
- Diepeveen LE, Laarakkers CM, Peters HPE, van Herwaarden AE, Groenewoud H, Int'Hout J, et al. Unraveling hepcidin plasma protein binding: evidence from peritoneal equilibration testing. *Pharmaceutics.* (2019) 12:123. doi: 10.3390/ph12030123
- Mitsopoulos E, Iyitska A, Pateinakis P, Lamprou V, Intzevidou E, Minasidis I, et al. Efficacy and safety of a low monthly dose of intravenous iron sucrose in peritoneal dialysis patients. *Int Urol Nephrol.* (2020) 52:387–92. doi: 10.1007/s11255-019-02362-4
- Marron B, Remon C, Perez-Fontan M, Quiros P, Ortiz A. Benefits of preserving residual renal function in peritoneal dialysis. *Idney Int Suppl.* (2008) 73:S42–51. doi: 10.1038/sj.ki.5002600
- Tanriover C, Ucku D, Basile C, Tuttle KR, Kanbay M. On the importance of the interplay of residual renal function with clinical outcomes in end-stage kidney disease. *J Nephrol.* (2022) 35:2191–204. doi: 10.1007/s40620-022-01388-9
- Ganesan LL, O'Brien FJ, Strich TL, Plummer NS, Sheth R, Fajardo C, et al. Association of Plasma Uremic Solute Levels with residual kidney function in children on peritoneal Dialysis. *Clin J Am Soc Nephrol.* (2021) 16:1531–8. doi: 10.2215/CJN.01430121
- Honda H, Kobayashi Y, Onuma S, Shibagaki K, Yuza T, Hirao K, et al. Association among erythroferone and biomarkers of erythropoiesis and iron metabolism, and treatment with long-term erythropoiesis stimulating agents in patients on hemodialysis. *PLoS One.* (2016) 11:e0151601. doi: 10.1371/journal.pone.0151601
- Hanudel MR, Rappaport M, Chua K, Gabayan V, Qiao B, Jung G, et al. Levels of the erythropoietin-responsive hormone erythroferone in mice and humans with chronic kidney disease. *Hematologica.* (2018) 103:e144:e141–2. doi: 10.3324/haematol.2017.181743
- Spoto B, Kakkor R, Lo L, Devalaraja M, Pizzini P, Torino C, et al. Serum erythroferone levels associate with mortality and cardiovascular events in hemodialysis and CKD patients: a two cohort study. *J Clin Med.* (2019) 8:523. doi: 10.3390/jcm8040523
- Davies SJ. Peritoneal solute transport and inflammation. *Am J Kidney Dis.* (2014) 64:978–86. doi: 10.1053/j.ajkd.2014.06.030
- Cho JH, Hur IK, Kim CD, Park SH, Ryu HM, Yook JM, et al. Impact of systemic and local peritoneal inflammation on peritoneal solute transport rate in new peritoneal dialysis patients: a 1-year prospective study. *Nephrol Dial Transplant.* (2010) 25:1964–73. doi: 10.1093/ndt/gfp767
- Gutierrez-Prieto JA, Soto-Vargas J, Parra-Michel R, Pazarin-Villasenor HL, Garcia-Sanchez A, Miranda-Diaz AG. The behavior of the type of peritoneal transport in the inflammatory and oxidative status in adults under peritoneal Dialysis. *Front Med.* (2019) 6:6–2019. doi: 10.3389/fmed.2019.00210
- Eguchi A, Mochizuki T, Tsukada M, Kataoka K, Hamaguchi Y, Oguni S, et al. Serum hepcidin levels and reticulocyte hemoglobin concentrations as indicators of the iron status of peritoneal dialysis patients. *Int J Nephrol.* (2012) 2012:239476. doi: 10.1155/2012/239476
- Malyszko J, Malyszko JS, Pawlak K, Drozdowska-Rams L, Brzosko S, Mysliwiec M. Hepcidin is linked to anemia and inflammation in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int.* (2008) 28:418–21. doi: 10.1177/089686080802800420
- Lee SW, Kim JM, Lim HJ, Hwang Y-H, Kim SW, Chung W, et al. Serum hepcidin may be a novel uremic toxin, which might be related to erythropoietin resistance. *Sci Rep.* (2017) 7:4260. doi: 10.1038/s41598-017-04664-y
- Zhong Z, Luo D, Luo N, Li B, Fu D, Fan L, et al. Serum Hepcidin-25 and risk of mortality in patients on peritoneal dialysis. *Front Med.* (2021) 8:685448. doi: 10.3389/fmed.2021.685448
- Tomasz G, Ewa W, Jolanta M. Biomarkers of iron metabolism in chronic kidney disease. *Int Urol Nephrol.* (2021) 53:935–44. doi: 10.1007/s11255-020-02663
- Belo L, Rocha S, Valente MJ, Coimbra S, Catarino C, Bronze-da-Rocha E, et al. Hepcidin and diabetes are independently related with soluble transferrin receptor levels in chronic dialysis patients. *Ren Fail.* (2019) 41:662–72. doi: 10.1080/0886022X.2019.1635893
- Strugeona C, Fasano A, Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tiss Barriers.* (2016) 4:e1251384. doi: 10.1080/21688370.2016.1251384
- Yu J, Shen Y, Zhou N. Advances in the role and mechanism of zonulin pathway in kidney diseases. *Int Urol Nephrol.* (2021) 53:2081–8. doi: 10.1007/s11255-020-02756-9
- Ficek J, Wyskida K, Ficek R, Wajda J, Klein D, Witkiewicz J, et al. Relationship between plasma levels of zonulin, bacterial lipopolysaccharides, d-lactate and markers of inflammation in haemodialysis patients. *Int Urol Nephrol.* (2017) 49:17725:717–25. doi: 10.1007/s11255-016-1495-5
- Lukaszuk E, Lukaszuk M, Koc-Zorawska E, Tobolczyk J, Bodzenta-Lukaszuk A, Malyszko J. Iron status and inflammation in early stages of chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res.* (2015) 40:366–73. doi: 10.1159/000368512
- Lukaszuk E, Lukaszuk M, Koc-Zorawska E, Bodzenta-Lukaszuk A, Malyszko J. Zonulin, inflammation and iron status in patients with early stages of chronic kidney disease. *Int Urol Nephrol.* (2018) 50:121–5. doi: 10.1007/s11255-017-1741-5
- Malyszko J, Koc-Zorawska E, Levin-Iaina N, Malyszko J. Zonulin, iron status, and anemia in kidney transplant recipients: are they related? *Transplant Proc.* (2014) 46:2644–6. doi: 10.1016/j.transproceed.2014.09.018
- Wischhusen J, Melero I, Fridman WH. Growth/differentiation Factor-15 (GDF-15): from biomarker to novel targetable immune checkpoint. *Front Immunol.* (2020) 11:951. doi: 10.3389/fimmu.2020.00951
- Lukaszuk E, Lukaszuk M, Koc-Zorawska E, Bodzenta-Lukaszuk A, Malyszko J. GDF-15, iron, and inflammation in early chronic kidney disease among elderly patients. *Int Urol Nephrol.* (2016) 48:839–44. doi: 10.1007/s11255-016-1278-z
- Malyszko J, Koc-Zorawska E, Malyszko JS, Glowinska I, Mysliwiec M, Macdougall IC. GDF15 is related to Anemia and Hepcidin in kidney allograft recipients. *Nephron Clin Pract.* (2013) 123:112–7. doi: 10.1159/000351810430
- Nalado AM, Olorunfemi G, Dix-Peek T, Dickens C, Khambule L, Snyman T, et al. Hepcidin and GDF-15 are potential biomarkers of iron deficiency anaemia in chronic kidney disease patients in South Africa. *BMC Nephrol.* (2020) 21:415. doi: 10.1186/s12882-020-02046-7
- Bargenda A, Musial K, Zwolińska D. Epidermal growth factor, growth differentiation factor-15, and survivin as novel biocompatibility markers in children on chronic dialysis. *Biomarkers.* (2016) 21:752–6. doi: 10.1080/1354750X.2016.1201534

Rozdział 7. Podsumowanie

Niedokrwistość jest jedną z najczęstszych konsekwencji PChN. Zrozumienie zjawisk leżących u podstaw zaburzeń gospodarki żelazem u pacjentów z PChN, a w szczególności chorych dializowanych otrzewnowo, niesie nadzieję na opracowanie nowych strategii terapeutycznych umożliwiających lepszą kontrolę niedokrwistości. U pacjentów dializowanych otrzewnowo istnieją pewne szczególne uwarunkowania wpływające na metabolizm żelaza zarówno na poziomie ogólnoustrojowym, jak i lokalnym, wewnątrzotrzewnowym, które pozostają słabo zbadane. Grupa chorych PD, poza typowymi dla PChN przyczynami subklinicznej aktywacji układu odpornościowego (przewlekły stan zapalny wskutek stresu oksydacyjnego, starzenia się komórek, niedotlenienia, dysbiozę jelitową i retencję toksyn mocznicowych) są również przewlekłe narażeni na niekorzystny wpływ czynników związanych z samą metodą dializoterapii. Blok zapalny skutkuje opornością na działanie erytropoetyny, nawet w stanie adekwatnej dostępności żelaza, co jest lepiej zrozumiałe dzięki poznaniu roli hepcydyny w metabolizmie żelaza. Przeprowadzone badanie nie udowodniło wcześniejszych obserwacji, w których wykazano wzrost stężenia ERFE w surowicy w odpowiedzi na stymulację ESA. Korelacja między ERFE a hepcydyną również pozostaje niejasna. Wydaje się, że wpływ ERFE na obniżenie stężenia hepcydyny może być osłabiony przez toczący się stan zapalny i jednocześnie leczenie preparatami żelaza. Na ten moment trudno ocenić przydatność zarówno ERFE, jak i hepcydyny, w diagnostyce i monitorowaniu efektów leczenia niedokrwistości u pacjentów z ESRD. W naszym badaniu wykazaliśmy, że niedokrwistość jest mniej nasilona u chorych z lepiej zachowaną resztkową czynnością nerek. Grupa ta ma zwykle różny stopień nasilenia stanu zapalnego, natomiast jest on wyraźnie wyższy u chorych ze „średnio-wysokim” transportem otrzewnowym. Większe stężenie sTfR, hepcydyny, GDF15 i zonuliny w dializacie w tej podgrupie pacjentów może wskazywać na bardziej skuteczne usuwanie tych cząsteczek przez błonę otrzewnową.

Rozdział 8. Piśmiennictwo

1. Blanc B, Finch CA, Hallberg L, et al (1968) Nutritional anemias. Report of a WHO Scientific Group. WHO Tech Rep Ser 405:1-40.
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/40707/WHO_TRS_405.pdf;jsessionid=72826504327390B6E2BACE6A264BC23?sequence=1
2. Astor BC, Muntner P, Levin A, Eustace JA, Coresh J (2002) Association of Kidney Function With Anemia, The Third National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994). *Arch Intern Med* 162(12):1401-1408.
3. Babitt JL, Lin HY (2012) Mechanisms of anemia in CKD. *JASN* 23(10):1631-1634.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2011111078>
4. Palaka E, Grandy S, van Haalen H, McEwan P, Darlington O. The Impact of CKD Anaemia on Patients: Incidence, Risk Factors, and Clinical Outcomes-A Systematic Literature Review. *Int J Nephrol.* 2020 Jul 1;2020:7692376. doi: 10.1155/2020/7692376. PMID: 32665863; PMCID: PMC7349626.
5. Lambie M, Chess J, Donovan KL, Kim YL, Do JY, Lee HB, Noh H, Williams PF, Williams AJ, Davison S, Dorval M, Summers A, Williams JD, Bankart J, Davies SJ, Topley N; Global Fluid Study Investigators. Independent effects of systemic and peritoneal inflammation on peritoneal dialysis survival. *J Am Soc Nephrol.* 2013 Dec;24(12):2071-80. doi: 10.1681/ASN.2013030314. Epub 2013 Sep 5. PMID: 24009237; PMCID: PMC3839554
6. Innico G, Gobbi L, Bertoldi G, Rigato M, Basso A, Bonfante L, Calò LA. Oxidative stress, inflammation, and peritoneal dialysis: A molecular biology approach. *Artif Organs.* 2021 Oct;45(10):1202-1207. doi: 10.1111/aor.14001. Epub 2021 Jun 15. PMID: 34037984; PMCID: PMC8519152.
7. Fishbane S, Spinowitz B. Update on Anemia in ESRD and Earlier Stages of CKD: Core Curriculum 2018. *Am J Kidney Dis.* 2018 Mar;71(3):423-435. doi: 10.1053/j.ajkd.2017.09.026. Epub 2018 Jan 11. PMID: 29336855.
8. Macdougall IC. Intravenous iron therapy in patients with chronic kidney disease: recent evidence and future directions. *Clin Kidney J.* 2017 Dec;10(Suppl 1):i16-i24. doi: 10.1093/ckj/sfx043. Epub 2017 Nov 28. PMID: 29225819; PMCID: PMC5716151.
9. Mehrotra R, Devuyst O, Davies SJ, Johnson DW. The Current State of Peritoneal Dialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2016 Nov;27(11):3238-3252. doi:

- 10.1681/ASN.2016010112. Epub 2016 Jun 23. PMID: 27339663; PMCID: PMC5084899.
10. R Gokal, NP Mallick (1999) Peritoneal dialysis. *The Lancet* 353 (9155): 823-828. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)09410-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)09410-0).
 11. Ronco C, Clark W. Factors affecting hemodialysis and peritoneal dialysis efficiency. *Semin Dial.* 2001 Jul-Aug;14(4):257-62. doi: 10.1046/j.1525-139x.2001.00065.x
 12. Liem YS, Wong JB, Hunink MG, de Charro FT, Winkelmayer WC. Comparison of hemodialysis and peritoneal dialysis survival in The Netherlands. *Kidney Int.* 2007 Jan;71(2):153-8. doi: 10.1038/sj.ki.5002014. Epub 2006 Nov 29. PMID: 17136031.
 13. Weinhandl ED, Foley RN, Gilbertson DT, Arneson TJ, Snyder JJ, Collins AJ. Propensity-matched mortality comparison of incident hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2010 Mar;21(3):499-506. doi: 10.1681/ASN.2009060635. Epub 2010 Feb 4. PMID: 20133483; PMCID: PMC2831857.
 14. Conrad ME, Umbreit JN, Moore EG. Iron absorption and transport. *Am J Med Sci.* 1999 Oct;318(4):213-29. doi: 10.1097/00000441-199910000-00002. PMID: 10522550.
 15. Ganz T, Nemeth E. Iron Balance and the Role of Heparin in Chronic Kidney Disease. *Semin Nephrol.* 2016 Mar;36(2):87-93. doi: 10.1016/j.semnephrol.2016.02.001. PMID: 27236128; PMCID: PMC4884601.
 16. Camaschella C, Pagani A. Advances in understanding iron metabolism and its crosstalk with erythropoiesis. *Br J Haematol.* 2018 Aug;182(4):481-494. doi: 10.1111/bjh.15403. Epub 2018 Jun 25. PMID: 29938779.
 17. Camaschella C, Nai A, Silvestri L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. *Haematologica.* 2020 Jan 31;105(2):260-272. doi: 10.3324/haematol.2019.232124. PMID: 31949017; PMCID: PMC7012465.
 18. Slotki I, Cabantchik ZI. The Labile Side of Iron Supplementation in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2015 Nov;26(11):2612-9. doi: 10.1681/ASN.2015010052. Epub 2015 May 21. PMID: 25999405; PMCID: PMC4625683.
 19. Dev S, Babitt JL. Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodial Int.* 2017 Jun;21 Suppl 1(Suppl 1):S6-S20. doi: 10.1111/hdi.12542. Epub 2017 Mar 15. PMID: 28296010; PMCID: PMC5977983.
 20. Paliege A, Rosenberger C, Bondke A, Sciesielski L, Shina A, Heyman SN, Flippin LA, Arend M, Klaus SJ, Bachmann S. Hypoxia-inducible factor-2alpha-expressing interstitial fibroblasts are the only renal cells that express erythropoietin under

- hypoxia-inducible factor stabilization. *Kidney Int.* 2010 Feb;77(4):312-8. doi: 10.1038/ki.2009.460. Epub 2009 Dec 16. PMID: 20016470.
21. Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev.* 2013 Jan;27(1):41-53. doi: 10.1016/j.blre.2012.12.003. Epub 2013 Jan 3. PMID: 23291219; PMCID: PMC3731139.
22. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem.* 2001 Mar 16;276(11):7806-10. doi: 10.1074/jbc.M008922200. Epub 2000 Dec 11. PMID: 11113131.
23. Mazur G, Wróbel T, Nosol J (2005) Rola hepcydyny w regulacji homeostazy żelaza. *Acta Haematologica Polonica* 36(2):167–175.
https://pthit.pl/Acta_Haematologica_Polonica,Hepcydyna_Hemochromatoza_Niedokr_wistosc_w_przebiegu_chorob_przewleklych,250.html
24. Camaschella C. Iron-deficiency anemia. *N Engl J Med.* 2015 May 7;372(19):1832-43. doi: 10.1056/NEJMra1401038. PMID: 25946282.
25. Fleming RE, Ponka P. Iron overload in human disease. *N Engl J Med.* 2012 Jan 26;366(4):348-59. doi: 10.1056/NEJMra1004967. Erratum in: *N Engl J Med.* 2012 Feb 23;366(8):771. PMID: 22276824.
26. Zhang AS, Enns CA. Molecular mechanisms of normal iron homeostasis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009:207-14. doi: 10.1182/asheducation-2009.1.207. PMID: 20008200; PMCID: PMC5831338.
27. Casu C, Nemeth E, Rivella S. Heparin agonists as therapeutic tools. *Blood.* 2018 Apr 19;131(16):1790-1794. doi: 10.1182/blood-2017-11-737411. Epub 2018 Mar 9. PMID: 29523504; PMCID: PMC5909761.
28. 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 Apr 1;101(7):2461-3. doi: 10.1182/blood-2002-10-3235. Epub 2002 Nov 14. PMID: 12433676.
29. Schwartz AJ, Das NK, Ramakrishnan SK, Jain C, Jurkovic MT, Wu J, Nemeth E, Lakhal-Littleton S, Colacino JA, Shah YM. Hepatic hepcidin/intestinal HIF-2 α axis maintains iron absorption during iron deficiency and overload. *J Clin Invest.* 2019 Jan 2;129(1):336-348. doi: 10.1172/JCI122359. Epub 2018 Dec 10. PMID: 30352047; PMCID: PMC6307944.
30. Zaritsky J, Young B, Gales B, Wang HJ, Rastogi A, Westerman M, Nemeth E, Ganz T, Salusky IB. Reduction of serum hepcidin by hemodialysis in pediatric and adult

- patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010 Jun;5(6):1010-4. doi: 10.2215/CJN.08161109. Epub 2010 Mar 18. PMID: 20299375; PMCID: PMC2879302.
31. Malyszko J, Malyszko JS, Kozminski P, Mysliwiec M. Type of renal replacement therapy and residual renal function may affect prohepcidin and hepcidin. *Ren Fail*. 2009;31(10):876-83. doi: 10.3109/08860220903216071. PMID: 20030521.
32. Yamamoto M, Matsumoto T, Ohmori H, Takemoto M, Ikeda M, Sumimoto R, Kobayashi T, Kato A, Ohdan H. Effect of increased blood flow rate on renal anemia and hepcidin concentration in hemodialysis patients. *BMC Nephrol*. 2021 Jun 15;22(1):221. doi: 10.1186/s12882-021-02426-7. PMID: 34126941; PMCID: PMC8204539.
33. Panichi V, Scatena A, Rosati A, Giusti R, Ferro G, Malagnino E, Capitanini A, Piluso A, Conti P, Bernabini G, Migliori M, Caiani D, Tetta C, Casani A, Betti G, Pizzarelli F. High-volume online haemodiafiltration improves erythropoiesis-stimulating agent (ESA) resistance in comparison with low-flux bicarbonate dialysis: results of the REDERT study. *Nephrol Dial Transplant*. 2015 Apr;30(4):682-9. doi: 10.1093/ndt/gfu345. Epub 2014 Nov 10. PMID: 25385719.
34. Teatini U, Liebchen A, Nilsson LG, Beck W, Longhena GR. Effect of a More Permeable Dialysis Membrane on ESA Resistance in Hemodialysis Patients--A Pilot Investigation. *Blood Purif*. 2016;41(1-3):80-6. doi: 10.1159/000441437. Epub 2015 Nov 5. PMID: 26536083.
35. Stefánsson BV, Abramson M, Nilsson U, Haraldsson B. Hemodiafiltration improves plasma 25-hepcidin levels: a prospective, randomized, blinded, cross-over study comparing hemodialysis and hemodiafiltration. *Nephron Extra*. 2012 Jan;2(1):55-65. doi: 10.1159/000336482. Epub 2012 Mar 28. PMID: 22619668; PMCID: PMC3350355.
36. Malyszko J, Malyszko JS, Kozminski P, Mysliwiec M. Type of renal replacement therapy and residual renal function may affect prohepcidin and hepcidin. *Ren Fail*. 2009;31(10):876-83. doi: 10.3109/08860220903216071. PMID: 20030521.
37. Hanudel MR, Rappaport M, Chua K, Gabayan V, Qiao B, Jung G, Salusky IB, Ganz T, Nemeth E. Levels of the erythropoietin-responsive hormone erythroferrone in mice and humans with chronic kidney disease. *Haematologica*. 2018 Apr;103(4):e141-e142. doi: 10.3324/haematol.2017.181743. Epub 2018 Feb 1. PMID: 29419424; PMCID: PMC5865435.

38. Arezes J, Foy N, McHugh K, Sawant A, Quinkert D, Terraube V, Brinth A, Tam M, LaVallie ER, Taylor S, Armitage AE, Pasricha SR, Cunningham O, Lambert M, Draper SJ, Jasuja R, Drakesmith H. Erythroferrone inhibits the induction of hepcidin by BMP6. *Blood*. 2018 Oct 4;132(14):1473-1477. doi: 10.1182/blood-2018-06-857995. Epub 2018 Aug 10. PMID: 30097509; PMCID: PMC6238155.
39. Wang CY, Core AB, Canali S, Zumbrennen-Bullough KB, Ozer S, Umans L, Zwijsen A, Babitt JL. Smad1/5 is required for erythropoietin-mediated suppression of hepcidin in mice. *Blood*. 2017 Jul 6;130(1):73-83. doi: 10.1182/blood-2016-12-759423. Epub 2017 Apr 24. PMID: 28438754; PMCID: PMC5501149.
40. Olivera J, Zhang V, Nemeth E, Ganz T. Erythroferrone exacerbates iron overload and ineffective extramedullary erythropoiesis in a mouse model of β -thalassemia. *Blood Adv*. 2023 Jul 25;7(14):3339-3349. doi: 10.1182/bloodadvances.2022009307. PMID: 36995275; PMCID: PMC10345853.
41. Srole DN, Ganz T. Erythroferrone structure, function, and physiology: Iron homeostasis and beyond. *J Cell Physiol*. 2021 Jul;236(7):4888-4901. doi: 10.1002/jcp.30247. Epub 2020 Dec 28. PMID: 33372284; PMCID: PMC8026552.
42. Honda H, Kobayashi Y, Onuma S, Shibagaki K, Yuza T, Hirao K, Yamamoto T, Tomosugi N, Shibata T. Associations among Erythroferrone and Biomarkers of Erythropoiesis and Iron Metabolism, and Treatment with Long-Term Erythropoiesis-Stimulating Agents in Patients on Hemodialysis. *PLoS One*. 2016 Mar 15;11(3):e0151601. doi: 10.1371/journal.pone.0151601. PMID: 26978524; PMCID: PMC4792384.
43. Spoto B, Kakkar R, Lo L, Devalaraja M, Pizzini P, Torino C, Leonardis D, Cutrupi S, Tripepi G, Mallamaci F, Zoccali C. Serum Erythroferrone Levels Associate with Mortality and Cardiovascular Events in Hemodialysis and in CKD Patients: A Two Cohorts Study. *J Clin Med*. 2019 Apr 16;8(4):523. doi: 10.3390/jcm8040523. PMID: 30995819; PMCID: PMC6518296.
44. Wischhusen J, Melero I, Fridman WH. Growth/Differentiation Factor-15 (GDF-15): From Biomarker to Novel Targetable Immune Checkpoint. *Front Immunol*. 2020 May 19;11:951. doi: 10.3389/fimmu.2020.00951. PMID: 32508832; PMCID: PMC7248355.
45. Bilson J, Scorletti E, Bindels LB, Afolabi PR, Targher G, Calder PC, Sethi JK, Byrne CD. Growth differentiation factor-15 and the association between type 2 diabetes and

- liver fibrosis in NAFLD. *Nutr Diabetes*. 2021 Oct 18;11(1):32. doi: 10.1038/s41387-021-00170-3. PMID: 34663793; PMCID: PMC8523689.
46. Lukaszuk E, Lukaszuk M, Koc-Zorawska E, Bodzenta-Lukaszuk A, Malyszko J. GDF-15, iron, and inflammation in early chronic kidney disease among elderly patients. *Int Urol Nephrol*. 2016 Jun;48(6):839-44. doi: 10.1007/s11255-016-1278-z. Epub 2016 Apr 4. PMID: 27043030; PMCID: PMC4894927.
47. Fasano A. All disease begins in the (leaky) gut: role of zonulin-mediated gut permeability in the pathogenesis of some chronic inflammatory diseases. *F1000Res*. 2020 Jan 31;9:F1000 Faculty Rev-69. doi: 10.12688/f1000research.20510.1. PMID: 32051759; PMCID: PMC6996528.
48. Wood Heickman LK, DeBoer MD, Fasano A. Zonulin as a potential putative biomarker of risk for shared type 1 diabetes and celiac disease autoimmunity. *Diabetes Metab Res Rev*. 2020 Jul;36(5):e3309. doi: 10.1002/dmrr.3309. Epub 2020 Mar 31. PMID: 32162764; PMCID: PMC7340576.
49. Lukaszuk E, Lukaszuk M, Koc-Zorawska E, Bodzenta-Lukaszuk A, Malyszko J. Zonulin, inflammation and iron status in patients with early stages of chronic kidney disease. *Int Urol Nephrol*. 2018 Jan;50(1):121-125. doi: 10.1007/s11255-017-1741-5. Epub 2017 Nov 13. PMID: 29134616; PMCID: PMC5758680.
50. Ficek J, Wyskida K, Ficek R, Wajda J, Klein D, Witkowicz J, Rotkegel S, Spiechowicz-Zatoń U, Kocemba-Dyczek J, Ciepał J, Więcek A, Olszanecka-Glinianowicz M, Chudek J. Relationship between plasma levels of zonulin, bacterial lipopolysaccharides, D-lactate and markers of inflammation in haemodialysis patients. *Int Urol Nephrol*. 2017 Apr;49(4):717-725. doi: 10.1007/s11255-016-1495-5. Epub 2017 Jan 2. PMID: 28044237; PMCID: PMC5357507.
51. Marrón B, Remón C, Pérez-Fontán M, Quirós P, Ortíz A. Benefits of preserving residual renal function in peritoneal dialysis. *Kidney Int Suppl*. 2008 Apr;(108):S42-51. doi: 10.1038/sj.ki.5002600. PMID: 18379546.
52. Tanriover C, Ucku D, Basile C, Tuttle KR, Kanbay M. On the importance of the interplay of residual renal function with clinical outcomes in end-stage kidney disease. *J Nephrol*. 2022 Dec;35(9):2191-2204. doi: 10.1007/s40620-022-01388-9. Epub 2022 Jul 11. PMID: 35819749.
53. Ganesan LL, O'Brien FJ, Sirich TL, Plummer NS, Sheth R, Fajardo C, Brakeman P, Sutherland SM, Meyer TW. Association of Plasma Uremic Solute Levels with Residual Kidney Function in Children on Peritoneal Dialysis. *Clin J Am Soc Nephrol*.

2021 Oct;16(10):1531-1538. doi: 10.2215/CJN.01430121. Epub 2021 Jul 7. PMID: 34233922; PMCID: PMC8499013.

54. Sturgeon C, Fasano A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers*. 2016 Oct 21;4(4):e1251384. doi: 10.1080/21688370.2016.1251384. PMID: 28123927; PMCID: PMC5214347.
55. Aldriwesh M, Al-Dayyan N, Barratt J, Freestone P. The Iron Biology Status of Peritoneal Dialysis Patients May Be a Risk Factor for Development of Infectious Peritonitis. *Perit Dial Int*. 2019 Jul-Aug;39(4):362-374. doi: 10.3747/pdi.2018.00052. Epub 2019 May 23. PMID: 31123076.
56. Bargenda A, Musiał K, Zwolińska D. Epidermal growth factor, growth differentiation factor-15, and survivin as novel biocompatibility markers in children on chronic dialysis. *Biomarkers*. 2016 Dec;21(8):752-756. doi: 10.1080/1354750X.2016.1201534. Epub 2016 Jun 24. PMID: 27295369.



Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

Tel.: 022/ 57 - 20 -303

Fax: 022/ 57 - 20 -165

ul. Żwirki i Wigury nr 61
02-091 Warszawa

e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl
www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl

KB/...../2020

Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym
w dniu 03 lutego 2020 r. po zapoznaniu się z wnioskiem:

Prof. dr hab. n. med. Jolanta Małyżko
Katedra i Klinika Nefrologii, Dializoterapii
i Chorób Wewnętrznych,
ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa

dotyczącym: wyrażenia opinii w sprawie badania pt.: "Ocena wybranych parametrów metabolizmu żelaza u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek."

wyraża następującą
opinię

- stwierdza, że jest ono dopuszczalne i zgodne z zasadami naukowo-etycznymi*.
- stwierdza, że jest ono niedopuszczalne i niezgodne z zasadami naukowo-etycznymi.*

Uwagi Komisji – verte

Komisja działa na podstawie art.29 ustawy z dnia 5.12.1996r. o zawodzie lekarza /Dz.U.nr 28/97 poz.152 wraz z późn.zm./, zarządzenia MZiOS z dn.11.05.1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych /Dz.U.nr 47 poz.480/, Ustawy prawo farmaceutyczne z dnia 6 września 2001r. (Dz.U.Nr 126, poz. 1381 z późn. zm.) oraz Zarządzenie nr 56/2007 z dnia 15 października 2007r. w sprawie działania Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym /Regulamin Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym/.
Komisja działa zgodnie z zasadami GCP .

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej


Prof. dr hab. n. med. Magdalena Kuźma-Kozakiewicz

*niepotrzebne skreślić

Prof. dr hab. n. med. Jolanta Małyško
Klinika Nefrologii, Dializoterapii i Chorób Wewnętrznych
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa 10.11.2023

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji
“Iron status and anemia control are related to peritoneal membrane properties in peritoneally
dialyzed patients”
Głogowski T., Wojtaszek E., Małyško J.
Frontiers in Medicine, 2023, DOI: 10.3389/fmed.2023.1148094 wchodzącej w skład
rozprawy doktorskiej „Gospodarka żelazem u pacjentów dializowanych otrzewnowo” wynosi
25% i polegał współdziałanie w opracowaniu koncepcji pracy, analizie i interpretacji danych,
pisanii pracy, krytycznej analizie manuskryptu.
Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Tomasza Głogowskiego publikacji
w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Prof. dr hab. n. med. Jolanta Małyško
specjalista I stopnia
nephrolog, transplantologia
choroby wewnętrzne
3356445

Lek. Tomasz Głogowski
Klinika Nefrologii, Dializoterapii i Chorób Wewnętrznych
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa 10.11.2023

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji
“Iron status and anemia control are related to peritoneal membrane properties in peritoneally
dialyzed patients”

Głogowski T., Wojtaszek E., Małyszko J.

Frontiers in Medicine, 2023, DOI: 10.3389/fmed.2023.1148094 wchodzącej w skład
rozprawy doktorskiej „Gospodarka żelazem u pacjentów dializowanych otrzewnowo” wynosi
55%.

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na opracowaniu koncepcji, zbieraniu danych,
współdziałanie w analizie statystycznej i analizie piśmiennictwa, przygotowaniu oryginalnego
tekstu.



Lek. Tomasz Głogowski
Klinika Nefrologii, Dializoterapii i Chorób Wewnętrznych
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa 10.11.2023

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji
"Biomarkers of iron metabolism in chronic kidney disease"

Głogowski T., Wojtaszek E., Małyшко J.

International Urology and Nephrology, 2021, DOI: 10.1007/s11255-020-02663-z
wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Gospodarka żelazem u pacjentów dializowanych
otrzewnowo” wynosi 55%.

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na opracowaniu koncepcji, współudziale w
analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu rycin i oryginalnego tekstu.



Dr hab. n. med. Ewa Wojtaszek
Klinika Nefrologii, Dializoterapii i Chorób Wewnętrznych
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa 10.11.2023r.

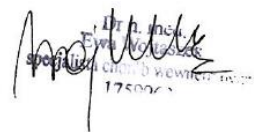
Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji
Biomarkers of iron metabolism in chronic kidney disease

Głogowski T., Wojtaszek E., Małyszko J.

International Urology and Nephrology, 2021, DOI: 10.1007/s11255-020-02663-z wchodzącej
w skład rozprawy doktorskiej „Gospodarka żelazem u pacjentów dializowanych otrzewnowo”
wynosi 20% i polegał na współdziałaniu w opracowaniu koncepcji pracy, analizie i interpretacji
danych, pisaniu pracy, krytycznej analizie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Tomasza Głogowskiego publikacji
w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.


Dr hab. n. med.
Ewa Wojtaszek
specjalista chorób wewnętrznych
175020

Dr hab. n. med. Ewa Wojtaszek
Klinika Nefrologii, Dializoterapii i Chorób Wewnętrznych
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa 10.11.2023r.

Oświadczenie

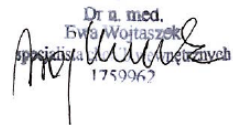
Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji
“Iron status and anemia control are related to peritoneal membrane properties in peritoneally
dialyzed patients”

Głogowski T., Wojtaszek E., Małyszko J.

Frontiers in Medicine, 2023, DOI: 10.3389/fmed.2023.1148094 wchodzącej w skład
rozprawy doktorskiej „Gospodarka żelazem u pacjentów dializowanych otrzewnowo” wynosi
20% i polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, analizie i interpretacji
danych, pisaniu pracy, krytycznej analizie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Tomasza Głogowskiego publikacji
w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Dr n. med.
Ewa Wojtaszek
opisana w: Choroby Wewnętrzne
1750962



Prof. dr hab. n. med. Jolanta Małyško
Klinika Nefrologii, Dializoterapii i Chorób Wewnętrznych
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa 10.11.2023

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji
"Biomarkers of iron metabolism in chronic kidney disease"

Głogowski T., Wojtaszek E., Małyško J.

International Urology and Nephrology, 2021, DOI: 10.1007/s11255-020-02663-z wchodzącej
w skład rozprawy doktorskiej „Gospodarka żelazem u pacjentów dializowanych otrzewnowo”
wynosi 25% i polegał współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, analizie i interpretacji
danych, pisaniu pracy, krytycznej analizie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Tomasza Głogowskiego publikacji
w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Prof. dr hab. Jolanta Małyško
specjalista nefrolog
kliniki nefrologii i dializoterapii
chorób wewnętrznych
3355443