

# Hepcidin – peptidni hormon, glavni regulator metabolizma željeza



I. Artuković Nadinić, R. Barić Rafaj, Lj. Bedrica\*, M. Pavlak, M. Lipar i V. Mrljak

## Sažetak

Hepcidin je peptidni hormon i glavni je regulator metabolizma željeza. Otkriven je u humanom serumu i urinu 2000. godine i nazvan je LEAP-1 (engl. *Liver Expressed Antimicrobial Protein*). Nedugo nakon toga znanstvenici su pod vodstvom Tomasa Ganze u potrazi za antimikrobnim peptidima otkrili peptid povezan s upalom i nazvali ga "hepcidin". Otkrili su da se sintetizira u jetri i da ima antimikrobna svojstva. Najveći broj istraživanja o djelovanju i regulaciji izlučivanja hepcidina učinjen je na mišjim modelima kada je ustanovljeno da se sinteza i izlučivanje hepcidina u miševa povećava u stanjima s povišenim količinama željeza u serumu i upalnim stanjima. Određivanje hepcidina u krvi i ostalim tjelesnim tekućinama određuje se imunološkim testovima s anti-hepcidinskim protutijelima - ELISA (prema engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) i masenom spektrometrijom. Koncentracije hepcidina u serumu određene masenom spektrometrijom i koncentracije određene ELISA metodom dobro koreliraju. Imunološki testovi najtočnije mjere niske vrijednosti hepcidina, a masena spektrometrija točnije mjeri aktivnu formu hepcidina. Poremećaji u ekspresiji hepcidina javljaju se kod mnogih bolesti kao što su: anemija prouzročena kroničnim sistemskim bolestima, side-

ropenične anemije, maligne bolesti, hereditarne hemokromatoze i stanja s neefektivnom eritropoezom. Stoga mjerenje koncentracije hepcidina ima veliko značenje u dijagnostici i liječenju stanja u kojima je narušena ravnoteža željeza u organizmu. Napredak u razumijevanju uloge hepcidina u kontroli homeostaze željeza dovodi do novih mogućnosti liječenja u stanjima sa sniženim ili povišenim razinama željeza u organizmu. Hecpidin je nedavno identificiran kao akutno fazni protein s antimikrobnom i regulatornom funkcijom željeza. Mnogi su istraživači pokazali interes za razvoj dijagnostičkog testa za mjerenje hepcidina u pasa. Ciljevi njihovog istraživanja bili su kloniranje i sekvenciranje gena psećeg hepcidina i prikupljanje preliminarnih podataka o pojavi hepcidina u pasa. Filogenetska analiza pokazala je da je humani hepcidin bio sličniji hepcidinu pasa nego hepcidinu glodavaca. U pasa, kao i u ljudi, hepcidin se najviše sintetizira u jetri, a nešto slabije u bubrežima i plućnom tkivu pasa. Rezultat ovog istraživanja uspostavio je osnovu za buduća istraživanja psećeg hepcidina. Autori navode da psi mogu biti dobar model za istraživanje uloge hepcidina u ljudi.

**Ključne riječi:** *hepcidin, jetra, željezo, ELISA, spektrometrija*

Irena ARTUKOVIĆ NADINIĆ, dr. med., Poliklinika za prevenciju kardiovaskularnih bolesti i rehabilitaciju, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Renata BARIĆ RAFAJ, dipl. ing. med. biokem., redovita profesorica, dr. sc. Ljiljana BEDRICA\*, dr. med. vet., (dopisni autor, e-mail: bedrica@vef.hr), redovita profesorica, dr. sc. Marina PAVLAK, dr. med. vet., redovita profesorica, dr. sc. Marija LIPAR, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, dr. sc. Vladimir MRLJAK, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

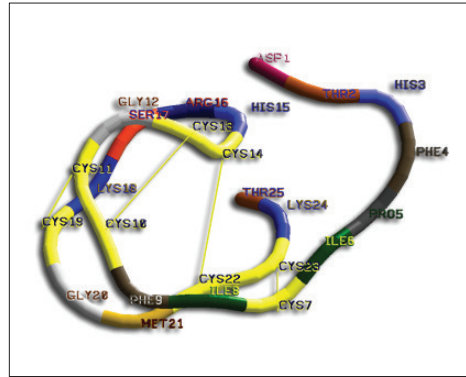
## Uvod

Hepcidin je otkriven u humanom serumu i urinu 2000. godine (Kemna i sur., 2008.) i nazvan je LEAP-1 (engl. *Liver Expressed Antimicrobial Protein*) (Krausse, 2000.). Nedugo nakon toga znanstvenici su u laboratoriju „Tomas Ganze“ u potrazi za antimikrobnim peptidima, otkrili peptid povezan s upalom i prozvali ga „hepcidin“. Otkrili su da se stvara u jetri i da ima antimikrobna svojstva (Park i sur., 2001.). Najveći broj istraživanja o djelovanju i regulaciji izlučivanja hepcidina vršeno je na mišjim modelima. Tada je ustanovljeno da se sinteza i izlučivanje hepcidina u miševa povećavaju u stanjima s povišenim koncentracijama željeza u serumu i upalnim stanjima.

Genetički modificirani miševi s povećanom razinom hepcidina zbog teškog nedostatka željeza umirali su vrlo brzo nakon rođenja, što ukazuje na važnu ulogu hepcidina u regulaciji metabolizma željeza. Prvi dokazi o povezanosti hepcidina s anemijama u upalnim stanjima otkriveni su u laboratoriju „Nancy Andrews“ u Bostonu. Analizirana su tkiva dva pacijenta s jetrenim tumorima i teškom mikroцитnom anemijom koja nisu reagirala na supstituciju željezom. U tumorskom tkivu nađene su velike količine hepcidinske mRNK. Kirurškim odstranjenjem tumora anemija je izliječena (Weinstein i sur., 2002.).

## Struktura hepcidina i njegovo određivanje u tjelesnim tekućinama

Hepcidin je peptidni hormon bogat cisteinom (slika 1). Javlja se u tri oblika: kao preprohormon od 84 aminokiseline, prohormon od 60 aminokiselina i aktivni hormon od 25 aminokiselina stabiliziran sa 4 disulfidne veze. Metaboliti hepcidina od 20 i 22 aminokiseline nalaze se u urinu.



**Slika 1.** Struktura hepcidina- aktivna forma od 25 peptida (Intrinsic Lifesciences)

U konverziji prohepcidina u hepcidin posreduje protein furin (Valore i sur., 2008.). Ova konverzija može biti regulirana alfa-1-antitripsinom (Pandur i sur., 2009.). Struktura hepcidina određena je NMR (engl. *nuclear magnetic resonance*) spektroskopijom. Temperatura okoliša mijenja konformaciju hepcidina, a na fiziološkim temperaturama prisutne su dvije konformacije (Jordan i sur., 2009.). N-terminalna regija hepcidina bitna je za vezanje za feroportin, ali nije dostatna za internalizaciju feroportina (Nemeth i sur., 2006.). Dokazano je da je Cys326 feroportin potreban za interakciju hepcidina i feroportina i moguće stvaranje disulfidnih veza između njih (Fernandes i sur., 2009.). Hepcidin je u plazmi vezan za alfa 2-makroglobulin (Pesalova i sur., 2015.).

Određivanje hepcidina u krvi i ostalim tjelesnim tekućinama vrši se imunološkim testovima s anti-hepcidinskim protutijelima - ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) (Ganz, 2006.) i masenom spektrometrijom koja detektira karakterističnu masu od 25 aktivnih aminokiselina hepcidina ili njegovih fragmenata (Kemna i sur., 2005., Murray i sur., 2007.). Koncentracije hepcidina u plazmi određene masenom spektrometrijom i koncentracije određene ELISA metodom dobro koreliraju. ELISA

točnije mjeri niske vrijednosti hepcidina, dok masena spektrometrija točnije mjeri aktivnu formu hepcidina (Kroot i sur., 2010.).

Koncentracije hepcidina u serumu i urinu dobro koreliraju. Određivanje hepcidina u urinu je manje invazivno od određivanja koncentracije u serumu ili plazmi, ali je potreban oprez u interpretaciji rezultata mjerenja jer vrijednosti ovise o glomerularnoj filtraciji i tubularnoj reapsorpciji. Glavno mjesto sinteze hepcidina je jetra, a male količine hepcidinske mRNK nađene su i u bubrezi i u masnom tkivu. Jutarnje vrijednosti hepcidina u serumu više su od poslijepodnevnih, a niže su u žena nego u muškaraca.

## Hepcidin i metabolizam željeza u organizmu

Peptidni hormon hepcidin glavni je regulator metabolizma željeza u organizmu sisavaca. Uglavnom se sintetizira u jetri. Sinteza i sekrecija hepcidina regulirane su zalihama željeza u organizmu, upalnim stanjima, infekcijom, hipoksijom i eritropoezom (Ganz, 2003.). Hepcidin inhibira otpuštanje željeza u plazmu pri čemu se veže za transporter željeza feroportin koji se nalazi u bazolateralnoj membrani enterocita, u duodenumu te plazmatskoj membrani stanica retikuloendotelnog sustava (slika 2).

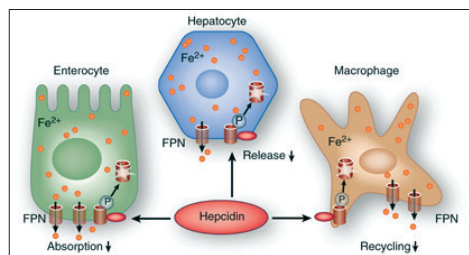
Poremećaji u ekspresiji hepcidina javljaju se kod mnogih bolesti kao što

su: anemije prouzročene kroničnim sistemskim bolestima, sideropenične anemije, maligne bolesti, hereditarne hemokromatoze i stanja s neefektivnom eritropoezom (Zhao i sur., 2013.), stoga mjerenje koncentracije hepcidina ima veliko značenje u dijagnostici i liječenju stanja u kojima je narušena ravnoteža željeza u organizmu.

## Interakcija hepcidina i feroportina

Homeostaza željeza u organizmu regulirana je interakcijom hepcidina i eksportera željeza feroportina. Feroportin je protein koji sadrži 571 aminokiselinu i nalazi se na površini membrane stanica koje pohranjuju ili transportiraju željezo: enterociti u duodenumu, hepatociti, makrofagi retikuloendotelnog sustava, adipociti i eritroblasti (Donovan i sur., 2005.).

Feroportin je jedini poznati eksporter željeza u sisavaca. Otkriven je 2000. godine od tri nezavisne skupine istraživača (De Domenico i sur., 2011.). Vežanjem hepcidina za feroportin na membranama stanice dolazi do aktivacije citosolne Janus kinaze 2 (JAK 2), pri čemu dolazi do autofosforilacije JAK 2 i fosforilacije feroportina i posljedično internalizacije feroportinsko-hepcidinskog kompleksa endocitozom u stanicu. Feroportin ulazi u lumen endosoma gdje nastaju multivezikularna tjelešca koja se stapaju s lizosomima i dolazi do razgradnje feroportina (De Domenico i sur., 2007.). Transkripcija feroportina kodirana je genom FPN1 (SLC40A1 - Solute Carrier Family 40 member 1) (Donovan i sur., 2000.). Na transkripciju feroportina zbog nedostatka željeza utječu hipoksija i upalna stanja. Glavni fiziološki uzrok pojačane apsorpcije željeza je hipoksija, odnosno anemija. Povećana eritropoeza dovodi do povećane apsorpcije željeza i povećanja razina feroportinske mRNK. Tijekom hipoksije dolazi do



Slika 2. Djelovanje hepcidina [Cui i sur., 2009.]

stabilizacije članova HIF (engl. *hypoxia inducible factor*) obitelji transkripcijskih faktora. HIF 1-alfa i HIF 2-alfa su citosolni proteini koji se u normalnim stanjima razgrađuju hidrosilacijom pod utjecajem željeza, oksoglutarata i kisikom ovisnim reakcijama. U slučaju hipoksije i manjka željeza HIF 1-alfa i HIF 2-alfa se ne razgrađuju i nakupljaju se u jezgri i s Arnt (engl. *Ary1 hydrocarbon receptor nuclear translocator- HIF 1-beta*) formiraju reaktivni transkripcijski factor (Mastrogiannaki i sur., 2009., Shah i sur., 2009.). Na transkripciju feroportina uz željezo utječu i mangan, cink, bakar i hem (Trodec i sur., 2010.).

Upalna stanja negativno utječu na transkripciju feroportina. Ustanovljeno je da injekcija bakterijskog lipopolisaharida u miševa dovodi do snižene transkripcije feroportina. Učinak na transkripciju je neovisan o izlučivanju upalnih citokina, jer se pokazalo da miševi s delecijom gena za IL-6, TNF-alfa i IL-1 na primjenu lipopolisaharida reagiraju sa sniženjem razine željeza i smanjenim razinama feroportinske mRNK (Liu i sur., 2005., Viatte i sur., 2005., Harada i sur., 2011.). Ekspresija feroportina posttranslacijski je regulirana hepcidinom. Kod sniženih razina hepcidina u serumu raste ekspresija FPN1 (engl. *ferroportin-1*) na membranama stanica i povećava se izlazak željeza u plazmu; i obrnuto, kod povišenih razina hepcidina u serumu smanjuje se ekspresija FPN1 i željezo se zadržava u stanicama (Weinstein i sur., 2002., Chung i sur., 2009.).

## Regulacija sinteze i izlučivanja hepcidina

Stanja u kojima dolazi do pojačane sinteze hepcidina su upalne bolesti, infektivne bolesti, kronično bubrežno zatajenje, karcinomi te povišene razine željeza u plazmi. Smanjena sinteza hepcidina javlja se u stanjima sa sniženim razinama željeza u plazmi anemijama,

hipoksiji te kod povećane eritropoetske aktivnosti.

Osim upalom, aktivacija signalnog sustava ovisi o razinama željeza u plazmi. Sinteza hepcidina u jetri i njegovo izlučivanje u plazmu regulirani su djelovanjem osam različitih proteina: hemojuvelinom (HJV), proteinom hereditarne hemokromatoze (HFE), transferinskim receptorom 2 (TfR2), koštanim morfogenetskim proteinom 6 (BMP 6), matriptazom 2 (MT2), neogeninom, receptorima koštanog morfogenetskog proteina (BMP receptor) i transferinom (Zhao i sur., 2013.).

## Hepcidin i anemije prouzročene kroničnim sistemskim bolestima

Kod kroničnih bolesti dolazi do kronične aktivacije imunološkog sustava. Tu se najčešće ubrajaju kronične bubrežne bolesti, kronične infekcije, šećerna bolest, teške traume, autoimune bolesti (reumatoidni artritis), Chronova bolest te maligne bolesti. Za anemiju prouzročenu kroničnim sistemskim bolestima karakteristične su niske razine željeza u plazmi uz nisku saturaciju transferina usprkos visokim ili normalnim zalihama željeza u organizmu (Ganz i Nemeth, 2006.).

Kod kroničnih, ali i akutnih upalnih stanja, dolazi do pojačane ekspresije hepcidina pod utjecajem IL-6, aktivina B, IL-1-alfa, IL-1-beta te lipopolisaharida. Najveći utjecaj na ekspresiju hepcidina u upalnim stanjima ima IL-6. To je dokazano na pokusima s miševima - miševi s delecijom gena za IL-6 u izazvanim upalnim stanjima nisu pokazivali pojačanu ekspresiju hepcidina (Nemeth, 2004.).

Interleukin-6 djeluje kao proupalni citokin i kao protoupalni miokin. U upalnim stanjima izlučuju ga T-stanice i makrofagi i na taj način stimuliraju

upalni odgovor, a potiče sintezu  $PG_{E_2}$  (prostanglandin  $E_2$ ) u hipotalamusu i povisuje tjelesnu temperaturu. U mišićima i masnom tkivu stimulira stvaranje energije. Izlučuju ga i osteoblasti te stimuliraju formaciju osteoklasta, i glatki mišići krvnih žila. Interleukin-6 stimulira upalne procese mnogih bolesti - šećerna bolest (Kristiansen i Madrup-Poulsen, 2005.), ateroskleroza (Dubinski i Zdrojewicz, 2007.), depresija (Dowlati, 2010.), Alzheimerova bolest, sistemski lupus (Tackey i sur., 2004.), multipli mijelom (Gado i sur., 2000.), karcinom prostate, Bechetova bolest (Hirohata i Kikuchi, 2012.), i reumatoidni artritis (Nishimoto, 2006.). Interleukon-6 se veže za površinski citokinski receptorski kompleks tipa 1 koji se sastoji od IL 6R alfa lanca (CD126) i gp130 signalne komponente (CD130). Vežući se za kompleks IL-6 aktivira transdukcijsku kaskadu JAK/STAT (engl. *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription proteins*) (Heinrich i sur., 1998.). Na humanom je modelu dokazano da i primjena rekombinantnog IL-6 dovodi do snižene razine željeza i povećane koncentracije hepcidina u urinu.

## Eritropoetska aktivnost i hipoksija suprimiraju ekspresiju hepcidina

Ekspresija hepcidina smanjena je u stanjima anemije, hipoksije i primjene eritropoetina (EPO) (Nicolas i sur., 2002., Vokurka i sur., 2006.). Eritrocitima je potrebno željezo koje se ugrađuje u hem za transport kisika. Bez željeza sazrijevanje eritrocita je onemogućeno i nastaje mikrocitna hipokromna anemija. Većina željeza potječe iz razgrađenih eritrocita iz retikuloendotelnog sustava.

Pojačana eritropoeza je fiziološki odgovor na hipoksiju. Glavni regulator pojačane eritropoeze je eritropoetin (EPO).

Snižena koncentracija kisika u tkivima uglavnom se registrira u bubrezima, koji kao odgovor na hipoksiju i anemiju pojačano izlučuju EPO. Eritropoetin se veže za receptore na površini prekursora eritrocita i time sprječava apoptozu i inducira proliferaciju i diferencijaciju u eritrocite (Yousoufian i sur., 1993.). Regulator supresije ekspresije hepcidina kao odgovora na pojačano izlučivanje EPO u organizmu još nije identificiran (Park i sur., 2006.).

Glavni čimbenici pojačane eritropoeze u stanjima hipoksije su HIF proteini (engl. *Hypoxia-inducible transcription Factors*). Hypoxia-inducible transcription 1-alfa veže se za pojačivač EPO gena i aktivira njegovu ekspresiju, a suprimira i ekspresiju hepcidina vežući se za promotor hepcidina (Peyssonnaud i sur., 2007.).

## Hepcidin i regulacija željeza u beta-talasemijama

Beta-talasemija je najčešći nasljedni oblik kod ljudi. Nastaje zbog poremećene ekspresije beta lanca hemoglobina. Anemija je mikrocitna. Nastaje zbog hemolize, povećane destrukcije eritrocita i skraćenog života eritrocita. Međutim, glavni uzrok mortaliteta i morbiditeta je opterećenje organizma željezom. U osoba s beta-talasemijom primjena transfuzije krvi, pojačana eritropoeza i smanjenje razine hepcidina pojačavaju apsorpciju željeza (Gardenhi, 2007.).

## Terapijske mogućnosti liječenja anemije regulacijom hepcidina

Napredak u razumijevanju uloge hepcidina u kontroli homeostaze željeza dovodi do novih mogućnosti liječenja u stanjima sa sniženim ili povišenim razinama željeza u organizmu.



U hereditarnoj hemokromatozi povećane razine željeza posljedica su jako niskih vrijednosti hepcidina. Kratki polipeptidni lipofilni peptidi - minihepcidini, oponašaju ulogu hepcidina i primjenjuju se peroralno.

Antagonisti hepcidina mogli bi biti korisni u liječenju leukemija s povišenim razinama hepcidina (Fung i sur., 2013.). Hepcidinska protutijela blokiraju vezanje hepcidina za FPN1 i povećavaju klirens hepcidina u majmuna (Xiao i sur., 2010.).

U beta-talasemijama kod miševa primjena injekcija transferina dovodi do povećanja ekspresije hepcidina i smanjenja razine EPO, čime dolazi do smanjenja anemija (Li i sur., 2010.). Pokazalo se da heparin primijenjen *in vitro* i *in vivo* smanjuje razine hepcidina vežući se za BMP6 (Poli, 2011.). Inhibicija ekspresije hepcidina može se postići i djelovanjem na STAT3 signalni put. Inhibitor STAT3 fosforilacije smanjuje ekspresiju hepcidina u miševa (Zhang i sur., 2011.). Antagonist IL-6 receptora snižava i visoke razine hepcidina (Kawabata i sur., 2007., Fatih, 2010.).

## Klinička ispitivanja povezanosti hepcidina i željeza

Željezo je esencijalni mineral za preživljavanje stanica reguliran peptidnim hormonom hepcidinom. Njegov utjecaj na određene bolesti izravno je povezan s metabolizmom željeza ili sekundarno u odnosu na osnovne bolesti. Genetska promjena utječe na koncentraciju hepcidina u serumu, što može dovesti do preopterećenja željeza u tkivima, kao što je ustanovljeno kod hemokromatoze gdje se pojavljuje nepravilna sinteza hepcidina. Genetska neravnoteža željeza je i željezo-refraktorna anemija, u kojoj se serumska koncentracija hepcidina povećava, onemogućujući protok ekstra- i intra-celularnog željeza.

Tijekom patogeneze određene bolesti, stres koji rezultira oksidacijom, kao i povećanje upalnih citokina, utječu na transkripciju HAMP gena da generira sekundarnu anemiju zbog povećanja serumske koncentracije hepcidina. Još ne postoji lijek koji bi inhibirao ili pojačao transkripciju hepcidina uglavnom zbog citotoksičnosti opisane u *in vitro* modelima. Predloženi terapijski ciljevi su još uvijek u ranim fazama kliničkih ispitivanja. Reichert i sur. (2017.) opisuju glavni put sistemske i genetske regulacije hepcidina, kao i njegov utjecaj na poremećaje vezane uz metabolizam željeza.

Hepcidin kao glavni regulator metabolizma željeza ima glavnu ulogu u transportu željeza kroz epitel duodenuma, što ovisi o kisikom reguliranom faktoru transkripcije, hipoksija- induciranom faktoru 2a (> HIF-2a). Lee (2010.) potaknut prijašnjim istraživanjima koja pokazuju da je duofenski HIF-2a reguliran hepcidinom, što ukazuje da taj transkripcijski faktor nije reguliran samo kisikom već i željezom, u svom istraživanju je dokazao da hepcidin i crijevni HIF-2a imaju važnu ulogu tijekom preopterećenja željezom, kod sistemskog nedostatka željeza i anemije (Lee, 2019.). Hepcidin postupno postaje ključan u kliničkoj praksi za dijagnozu i praćenje velikog broja bolesti. Njegove biokemijske i strukturne značajke zakomplicirale su i odgodile stjecanje standardiziranog kvantitativnog testa (Wolff i sur., 2018.) te otežavaju razvoj metoda za njegovo određivanje.

Genetski defekti u signalizaciji željeza prema hepcidinu dovode do "hepcidinopatija" od nasljedne hemokromatoze do refraktorne anemije. Ti su poremećaji prouzročeni nedostatkom ili suviškom hepcidina. Disregulacija hepcidina je patogeni kofaktor u anemijama s neučinkovitom eritropoezom i anemijama prouzročanim

upalama. Eksperimenti na predkliničkim životinjskim modelima dokazuju da se za liječenje ovih stanja može upotrijebiti odgovarajuća doza hepcidina. To je potaknulo istraživanja na području terapije anemija. Do sada je identificirano nekoliko hepcidin agonista i antagonista hepcidina, kao i induktori i inhibitori njegove ekspresije. Neki od njih se i dalje razvijaju i trenutno se ocjenjuju u kliničkim ispitivanjima (Katsarou i Pantopoulos, 2018.).

Anemije kod kroničnih bolesti (ACD) i anemije zbog deficita željeza (IDA) su dva najraširenija oblika anemije koji su međusobno povezani. Hepcidin, novo uvedeni biomarker za procjenu statusa željeza, je homeostatski regulator metabolizma željeza. Cheng i sur. (2011.) su istraživali pojavu hepcidina kod anemija kroničnih sistemskih bolesti. Ustanovili su da su razine serumskog hepcidina u skupinama bolesnika bile statistički različite, od visoke do niske razine. Mahajan i sur. (2017.) istraživali su koncentracije hepcidina i drugih uvriježenih parametara željeza da se procijeni količina željeza u djece s ACD i IDA, a identificirali su i djecu s ACD koja su razvila deficit željeza (ID).

Činjenica da ljudi moraju uravnotežiti svoju potrebu za željezom zbog moguće štete poznata je već nekoliko stoljeća, ali su molekularni mehanizmi regulacije željeza poznati u posljednja dva desetljeća, pri čemu je najvažnije bio otkriće glavnog regulatornog hormona hepcidina iz jetre. Prebacivanjem feroportina u enterocite i makrofage, hepcidin pokazuje preciznu kontrolu nad apsorpcijom i raspodjelom željeza između tkiva. Ekspresija hepcidina regulirana je niskim statusom željeza i aktivnom eritropoezom te povećanom koncentracijom željeza kod infekcije i/ili upale. Ovaj mehanizam objašnjava etiologiju anemije kod kronične infekcije. Farmaceutske kompanije aktivno razvijaju agoniste i antagoniste hepcidina

u borbi protiv preopterećenja željezom i anemija. U globalnom zdravstvenom kontekstu otkriće hepcidina daje novo svjetlo na svjetski najrašireniji problem mikronutrijenata, deficit željeza i posljedično anemiju (Prentice, 2017.).

Funkcionalni nedostatak željeza posljedica je anemije prouzročene upalom (AI). Nedostatak željeza, bez obzira na anemiju, ima štetan utjecaj na kvalitetu života tako da je liječenje opravdano. Terapeutske strategije uključuju liječenje osnovne bolesti, suplementaciju željeza i strategiju preraspodjele željeza. Podrobniji uvid u patofiziologiju AI doveo je do razvoja novih lijekova koji djeluju na upalne citokine i uvođenje novih formulacija željeza. Otkriće da hormon hepcidin ima ključnu regulatornu ulogu u AI stimulira razvoj nekoliko terapeutskih pristupa prema funkciji ovog peptida, čija povećana koncentracija u upali uzrokuje zadržavanje željeza u stanicama i tkivima. Osim patofizioloških koncepata i dijagnostičkih pristupa za AI, u svom su radu Petzer i sur. (2018.) razmatrali aktualne smjernice za nadomjesne terapije željezom s posebnim naglaskom na prednosti, ograničenja i neriješena pitanja koja se odnose na oralno i parenteralno suplementiranje željeza u kroničnim upalnim bolestima. Nadalje, istraživali su kako terapije koje imaju za cilj liječenje bolesti koje su dovele do AI mogu utjecati na anemiju i raspravljali su o pojavljivanju antagonizirajućih hepcidina, za koje se trenutačno vode pretklinička ili klinička ispitivanja.

Hepcidin je nedavno identificiran kao akutno fazni protein s antimikrobnom i regulatornom funkcijom u metabolizmu željeza. Fry i sur. (2004.) su pokazali interes za razvoj dijagnostičkog testa za mjerenje hepcidina u pasa. Ciljevi njihovog istraživanja bili su kloniranje i sekvenciranje gena psećeg hepcidina i prikupljanje preliminarnih podataka o ulozi hepcidina u pasa. Filogenetska

analiza pokazala je da je humani hepcidin bio sličniji hepcidinu pasa nego hepcidinu glodavaca. U pasa, kao i u ljudi, hepcidin se najviše sintetizira u jetri, a otkriveno je da se manje količine hepcidina sintetiziraju i u bubrezima i plućnom tkivu pasa. Rezultat ovog istraživanja uspostavio je osnovu za buduća istraživanja psećeg hepcidina. Autori navode da psi mogu biti dobar model za istraživanje uloge hepcidina u ljudi.

Fry i sur. (2004.) istraživali su hepcidin kao protein akutne faze s antimikrobnim i regulatornim funkcijama u metabolizmu željeza. Smatraju da hepcidin može biti ključni posrednik u anemiji kroničnih bolesti. Bili su zainteresirani za razvoj dijagnostičkog testa za mjerenje hepcidina u pasa. Filogenetska analiza pokazala je da je humani hepcidin homologniji onom u pasa nego u glodavaca. U pasa, kao i u ljudi, hepcidin se najviše nalazi u jetri. Western blot je pokazao bistru traku od približno 9 kDa, u skladu s pro-hepcidinom. Slabije pojavljivanje hepcidina je otkriveno u psećim bubrezima i plućima.

Fry i sur. (2009.) ispitivali su ekspresiju gena u jetri pasa s eksperimentalno induciranim nedostatkom željeza (ID). Pretpostavili su da bi ID rezultirao smanjenjem ekspresije hepcidina gena, a možda i promijenjenom ekspresijom drugih gena povezanih s metabolizmom željeza. Učinili su biopsiju jetre u tri psa prije indukcije ID-a, u točki maksimalnog ID-a, i nakon ID-a. Identificirali su gene koji su imali najmanje dvostruku promjenu kao odgovor na ID. Četiri gena su odabrana za daljnju analizu reverznom transkriptazom PCR (RT-PCR).

Psi s ID-om izrazito su smanjili ekspresiju gena za hepcidin (prosječno smanjenje za 40 puta za jednu sondu i > 100 puta za drugu sondu) i povećanu ekspresiju gena receptora transferina (srednje povećanje od 7 puta). Blago

je smanjena i ekspresija gena "sličnog kalretikulinu" i gena nepoznate funkcije. Rezultati RT-PCR analize bili su u skladu s nalazima mikromreže. Promjene u ekspresiji gena hepcidina i receptora transferina bile su u skladu s nalazima. Smanjenje ekspresije gena identificiranog kao "slično kalretikulinu", iako nije statistički značajno, bilo je u skladu s nalazima drugih istraživača koji smatraju da željezo ima ulogu u ekspresiji kalretikulina.

U veterinarskoj medicini hiperferitinemija je često promatrana u pasa kod različitih bolesti (npr. histiocitarni sarkom i autoimunosna hemolitička anemija) bez dokaza o preopterećenju željezom. Mehanizam nastanka hiperferitemije još uvijek nije u potpunosti poznat. Anemija prouzročena upalom naziva se anemija kronične bolesti (ACD), a eksperimentalno izazvana ACD je poznata kao uzrok blage hiperferitinemije. Gotovo sva ova ispitivanja bila su zasnovana na kratkotrajnim akutnim upalama. Smatra se da je hepcidin, protein koji se uglavnom proizvodi u hepatocitima, ključni regulator otpuštanja željeza iz retikuloendotelnih stanica (RECs), a njegovo pojavljivanje je povezano s ACD.

Chikazawa i sur. (2013.) su pretpostavili da u slučaju dugotrajne ACD, hepcidin povećava nakupljanje željeza u RES uzrokujući povećanje količine feritina u serumu u različito vrijeme. U istraživanju autori su koristili pseći model s ponavljanjem supkutanog davanja terpentinskog ulja svaka tri dana u razdoblju od 42 dana (15 injekcija) i na taj su način inducivali uvjete dugotrajne upale. Redovito su praćene promjene koncentracije feritina u serumu. Hipoproliferativna anemija, nakupljanje željeza u koštanoj srži i hipoferemija, koje su karakterizirane s ACD, primijećeni su kod davanja terpentinskog ulja injekcijama. Sadržaj željeza u jetri, hepcidina i koncentracija feritina u serumu se povećavaju odmah



nakon aplikacije terpentina, ali se kasnije vraćaju u normalne vrijednosti. Ovi rezultati pokazuju da eksperimentalno izazvana dugotrajna ACD može prouzročiti hipoproliferativnu anemiju bez neprekidnog povećavanja hepcidina bez sistemskog preopterećenja željezom. Iz toga se zaključilo da kronična upala ne može znatno doprinijeti povećanju hiperferitinemije.

Mikrocitna anemija je uobičajena u pasa s kongenitalnim portosistemskim šantom (cPSS) i obično se povlači nakon kirurške intervencije. Međutim, patofiziologija mikrocitne anemije ostaje slabo shvaćena. Hepcidin je imao ključnu ulogu u kontroli transporta željeza u ljudi i životinja te u posredovanju u anemiji upalnih bolesti u ljudi. Uloga hepcidina u razvoju mikrocitne anemije u pasa s cPSS nije ispitana.

Da bi se ustvrdilo smanjuje li se razina hepcidina, dok broj crvenih krvnih stanica (RBC) i prosječni volumen eritrocita (MCV) raste u pasa nakon kirurškog zahvata Frowde i sur. (2014.) su 18 pasa s potvrđenim cPSS podvrgnuli operativnom zahvatu. Izvršena su mjerenja RBC-a, MCV-a i razine hepcidina prije i poslije operacije. Došlo je do značajnog povećanja RBC i MCV, dok je količina hepcidina ostala nepromijenjena, stoga ovo istraživanje nije dokazalo da je neregulirana proizvodnja hepcidina povezana s anemijom u pasa s cPSS.

## Literatura

1. CHENG, P. P., X. Y. JUAO, X. H. WANG, J. H. LIN and Y. M. CAI (2011): Hepcidin expression in anemia of chronic disease and concomitant iron-deficiency anemia. *Clin. Exp. Med.* 11, 33-42.
2. CHIKAZAWA, S., T. NAKAZAWA, Y. HORI, F. HOSHI, K. KANAI, N. ITO, K. ORINO, K. WATANABE and S. HIGUCHI (2013): Change in serum ferritin concentration in experimentally induced anemia of chronic inflammation in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 75, 11, 1419-1426.
3. CHUNG, B., T. CHASTON, J. MARKS, S. K. SRAIK and P. A. SHARP (2009): Hepcidin decreases iron transporter expression in vivo in mouse duodenum and spleen and in vitro in THP-1 macrophages and intestinal Caco-2 cells. *J. Nutr.* 139, 1457-1462.
4. CUI, Y., WU. YIQING and Y. ZHOU (2009): Iron-refractory deficiency anemia: new molecular mechanisms. *Kidney International* 76, 1137-1141.
5. DE DOMENICO, I., D. M. WARD, E. NEMETH, M. B. VAUGHN, G. MUSCI, T. GANZ and J. KAPLAN (2007): The molecular basis of ferroportin-linked hemochromatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 8955-8960.
6. DE DOMENICO, I., D. M. WARD and J. KAPLAN (2011): Hepcidin and Ferroportin: The new players in Iron Metabolism. *Semin. Liver Dis.* 31, 272-279.
7. DONOVAN, A., C. A. LIMA, J. L. PINKUS, G. S. PINKUS, L. I. ZON, S. ROBINE and N. C. ANDREWS (2005): The iron exporter ferroportin/SLC40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.* 1, 191-200.
8. DOWLATI, Y., N. HERRMANN, W. SWARDFAGER, H. LIU, L. SHAM, E. K. REIM and K. L. LANCTOT (2010): A metaanalysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol. Psych.* 67, 446-457
9. DUBINSKI, A. and Z. ZDROJEWICZ (2007): The role of interleukin-6 in development and progression of atherosclerosis. *Polski merkuriusz Lekarski* 22, 291-294.
10. FATIH, N. (2010): Natural and synthetic STAT3 inhibitors reduce hepcidin expression in differentiated mouse hepatocytes expressing the active phosphorylated STAT3 form. *J. Mol. Med.* 88, 477-486.
11. FERNANDES, A., G. C. PREZA, S. L. YOUNG, I. DE DOMENICO, J. KAPLAN, T. GANZ and E. NEMETH (2009): The molecular basis of hepcidin-resistant hereditary hemochromatosis. *Blood* 114, 437-443.
12. FROWDE, P. E., A. G. GOW, C. A. BURTON, R. POWELL, V. J. LIPSCOMB, A. K. HOUSE, R. J. MELLANBY and M. S. TIVERS (2014): Hepatic hepcidin gene expression in dogs with a congenital portosystemic shunt. *J. Vet. Intern. Med.* 28, 1203-1205.
13. FRY, M. M., J. L. LIGGETT and S. J. BAEK (2004): Molecular cloning and expression of canine hepcidin. *Vet. Clin. Pathol.* 33, 4, 223-227.
14. FRY, M. M., C. A. KIRK, J. L. LIGGETT, G. B. DANIEL, S. J. BAEK, J. S. GOUFFON, P. M. CHIMAKURTHY and B. REKAPALLI (2009): Changes in hepatic gene expression in dogs with experimentally induced nutritional iron deficiency. *Vet. Clin. Pathol.* 38, 13-19.
15. FUNG, E., P. SUGIANTO, J. HSU, R. DAMOISEAUX, T. GANZ and E. NEMETH (2013): High-throughput screening of small molecules identifies hepcidin antagonists. *Mol. Pharmacol.* 83, 681-690.
16. GADO, K., G. DOMJAN, H. HEGYESI and A. FALUS (2000): Role of interleukin-6 and prostate cancer progression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12, 33-40.

17. GANZ, T. (2003): Hepcidin a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 102, 783-788.
18. GANZ, T. and E. NEMETH (2006): Hepcidin and regulation of body iron metabolism. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290, 199-203.
19. GARDENHI, S. (2007): Ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin. *Blood* 106, 5027-5035.
20. HARADA, N., M. KANAYAMA, A. MARUYAMA, A. YOSHIDA, K. TAZUMI, T. HOSOYA, J. MIMURA, T. TOKI, J. M. MAHER, M. YAMAMOTO and K. ITOH (2011): Nrf2 regulates ferroportin 1-mediated iron efflux and counteracts lipopolysaccharide-induced ferroportin 1 mRNA suppression in macrophages. *Arch. Biochem. Biophys.* 508, 101-109.
21. HEINRICH, P. C., I. BEHRMANN, G. MUELLER-NEWEN, F. SCHAPER and L. GRAEVE (1998): Interleukin-6-type cytokine signaling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* 334, 294-314.
22. HIROHATA, S. and H. KIKUCHI (2012): Changes in biomarkers focused on differences in disease courses or treatment in patients with neuro-Behcet's disease. *Internal Med.* 51, 3359-3365.
23. JORDAN, J. B., L. POPPE, M. HANIU, T. ARVEDSON, R.SYED, V. LI, H. KOHNO, H. KIM, P. D. SCHNIER and T. S. HARVEY (2009): Hepcidin revisited, disulphide connectivity, dynamics and structure. *J. Biol. Chem.* 284, 24155-24167.
24. KATSAROU, A. and K. PANTOPOULOS (2018): Hepcidin Therapeutics. *Pharmaceuticals (Basel)* 21, 11, 2, doi: 103390/ph11040127.
25. KAWABATA, H., N. TOMOSUGI, J. KANDA, Y. TANAKA, K. YOSHIZAKI and T. UCHIYAMA (2007): Anti interleukin 6 receptor antibody tocilizumab reduces the level of serum hepcidin in patients with multicentric Castelman's disease. *Haematologica* 92, 857-858.
26. KEMNA, E., H. THALSMA, C. LAARAKKERS, E. NEMETH, H. WILLEMS and D. SWINKELS (2005): Novel urin hepcidin assay by mass spectrometry. *Blood* 106, 3268-3270.
27. KEMNA, E. H., H. THALSMA, H. L. WILLEMS and D. W. SWINKELS (2008): Hepcidin – from discovery to differential diagnosis. *Haematologica* 93, 90-97.
28. KRAUSSE, Q., S. NEITZ, H. J. MAEGERT, A. SCHULZ, W. G. FROSSMAN, P. SCHULZ-KNAPPE and K. ADERMANN (2000): Leap-1, a novel highly disulphide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *Febs. Lett.* 480, 147-150.
29. KRISTINANSEN, O. P. and T. MANDRUP-POULSEN (2005): Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes* 54, 114-124.
30. KROOT, J. J., C. M. M. LAARSKKERS, A. J. GEURTS-MOESPOT, N. GREBENCHTCHIKOV, P. PICKERS, A. E. VAN EDE, H. P. E. PEPERS, E. VAN DANGEN-LASES, J. F. M. WETZELS, F. C. G. J. SWEEP, H. TJALSMA and D. W. SWINKELS (2010): Immunochemical and mass-spectrometry-based serum hepcidin assays for iron metabolism disorders. *Clin. Chem.* 56, 1570-1579.
31. LEE, D. H. (2010): Neogenin inhibits HJV secretion and regulates BMP-induced expression and iron homeostasis. *Blood* 115, 3163-3145.
32. LEE, F. S. (2019): At the crossroads of oxygen and iron sensing: hepcidin control of HIF-2 $\alpha$ . *J. Clin. Invest.* 129, 1, 72-74.
33. LI, H., A. C. RYBICKI, S. M. SUZUZKA, L. von BONSDORFF, W. BREUER, C. B. HALL, Z. I. CABANTCHIK, E. E. BOUHASSIRA, M. E. FABRY and Y. Z. GINZBURG (2010): Transferrin therapy ameliorates disease in beta-thalassemic mice. *Nat. Med.* 16, 2, 177-182.
34. LIU, X. B., N. B. NGUYEN, K. D. MARQUESS, F. YANG and D. J. HAILE (2005): Regulation of hepcidin and ferroportin expression by lipopolysaccharide in splenic macrophages. *Blood Cells. Mol. Dis.* 35, 47-56.
35. MAHAJAN, G. S. SHARMA, J. CHANDRA and A. NANGIA (2017): Hepcidin and iron parameters in children with anemia of chronic disease and iron deficiency anemia. *Blood. Res.* 52, 3, 212-217.
36. MASTROGIANNAKI, M., P. MATAK, B. KEITH, M. C. SIMON, S. VAULONT and C. PEXSSONNAUX (2009): HIF 2- $\alpha$ , but not HIP 1- $\alpha$ , promotes iron absorption in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 1159-1166.
37. MURRAY, A. T., D. R. WITCHER, P. LUAN and V. J. WROBLEWSKY (2007): Quantitation of hepcidin from human and mouse serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Blood* 110, 1048-1054.
38. NEMETH, E. G. C. PREZA, S. L. JUNG, J. KAPLAN, A. J. WARNING and T. GANZ (2006): The N-terminus hepcidin essential for the interaction with ferroportin: Structure function study. *Blood* 107, 328-333.
39. NEMETH, E., S. RIVERA, V. GABAYAN, C. KELLER, S. TANDORF, B. K. PEDERSEN and T. GANZ (2004): IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J. Clin. Invest.* 113, 1271-1276.
40. NICOLAS, G., C. CHAUVET, L. VIATTE, J. L. DANAN, X. BIGARD, C. BEAUMONT, A. KAHN and S. VAULONT (2002): The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia and inflammation. *J. Clin. Invest.* 110, 1037-1044.
41. NISHIMOTO, N. (2006): Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 18, 227-281.
42. PANDUR, E. J., J. NAGY, V. S. POOR, A. SARNYAI, A. HUSZAR, A. MISETA and K. SIPOS (2009): Alpha-1-antitripsin binds preprohepcidin

- intracellularly an prohepcidin in the serum. *Febs. J.* 276, 2012-2021.
43. PARK, C. H., E. V. VALORE, A. J. WARNING and T. GANZ (2001): Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.* 276, 7806-7810.
  44. PARK, M., M. A. LOPEZ, V. GABAYAN, T. GANZ and S. RIVERA (2006): Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood.* 108, 3730-3735.
  45. PESALOVA, G., J. PETRAK, K. KUZELOVA, I. HRDY, P. HALADA, P. W. KUCHEL, S. SOELIN, P. PONKA, R. SUTAK, E. BECKER, M. L. HUANG, Y. S. RAHMANTO, D. R. RICHARDSON and D. VYORAL (2015): Hepcidin the hormone of iron metabolism is bound specifically to alfa-2 macroglobulin in blood. *Blood* 113, 6225-6236.
  46. PETZER, V., I. THEURL and G. WEISS (2018): Established and Emerging Concepts to Tret Imbalances of Iron Homeostasis in Inflammatory Diseases. *Pharmaceuticals (Basel)* 11, 4.
  47. PEYSSONNAUX, C., A. S. ZINKERNAGEL, R. A. SCHUEPBACH, E. RANKIN, S. VOULONT, V. H. HAASE, V. NIZET and R. S. JOHNSON (2007): Regulation of iron homeostasis by th hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J. Clin. Invest.* 117, 1926-1932.
  48. POLI, M. (2011): Heparin: a potent inhibitor of hepcidin expression in vitro and in vivo. *Blood* 117, 997-1004.
  49. PRENTICE, A. M. (2017): Clinical Implications of New Insights into Hepcidin-Mediated Regulation of Iron Absorption and Metabolism. *Ann. Nutr. Metab.* 71, 40-48.
  50. REICHERT, C. O., J. Da CUNHA, D. LEVY, L. M. F. MASELLI, S. P. BYDŁOWSKI and C. SPADA (2017): Hepcidin: Homeostasis and Diseases Related to Iron Metabolism. *Acta Hematol.* 137, 220-236.
  51. SHAH, Y. M., T. MATSUBARA, S. ITO, S. H. YIM and F. J. GONZALES (2009): Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. *Cell. Metab.* 9, 152-164.
  52. TACKEY, E., P. E. LIPSKY and G. G. ILLEI (2004): Rationale for interleukin -6 blockade in systematic lupus erythematosus. *Lupus* 13, 339-343.
  53. TROADEC, M. B., D. M. WARD, E. LO, J. KAPLAN and I. De DOMENICO (2010): Induction of FPN 1 transcription by MTF-1 reveals a role for ferroportin in transition metal efflux. *Blood* 116, 4657-4664.
  54. VALORE, E. V., T. GANZ (2008): Posttransitional processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Mol. Dis.* 40, 132-138.
  55. VIATTE, L., J. C. LESBORDES-BRION, D. Q. LOU, M. BENNOUN, G. NICHOLAS, A. KAHN, F. CANONNE-HERGAUX and S. VAULONT (2005): Deregulation of proteins involved in iron metabolism in hepcidin-deficient mice. *Blood* 105, 4861-4864.
  56. VOKURKA, M., J. KRIJT, K. SULC and E. NECAS (2006): Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol. Res.* 55, 667-674.
  57. WEINSTEIN, D. A., C. N. ROY., M. D. FLEMING, M. F. LODA, J. I. WOLFSDORF and N. C. ANDREWS (2002): Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implication for the anemia of chronic disease. *Blood.* 100, 3776-3781.
  58. WOLFF, F., S. DE BREUCKER, T. PEPERSACK, N. COMPTE, B. GULBIS and F. COTTON (2018.): Baseline hepcidin measurement in the differential diagnosis of anaemia for elderly patients and its correlation with the increment of transferrin saturation following an oral iron absorption test. *Clin. Chem. Lab. Med.* 19, 57, 250-258.
  59. XIAO, J. J., W. KRZYZANSKI, Y. M. WANG, H. LI, M. J. ROSE, M. MA, Y. WU, B. HINKLE and J. J. PEREZ-RUIXO (2010): Pharmacokinetics of anti-hepcidin monoclonal antibody Ab12B9m and hepcidin in cynomolgus monkeys. *AAPS. J.* 12, 646-657.
  60. YOUSOUFIAN, H., G. LONGMORE, D. NEUMANN, A. YOSHIURA and H. F. LODISH (1993): Structure, function and activation of the erythropoietin receptor. *Blood* 81, 2223-2236.
  61. ZHANG, S. P., Z. WANG, L. X. WANG and S. J. LIU (2011): AG490: an inhibitor of hepcidin expression in vivo. *World J. Gastroenterol.* 17, 5032-5034.
  62. ZHAO, N., A. ZHANG and C. ENNIS (2013): Iron regulation by hepcidin. *J. Clin. Invest.* 123, 2337-2373.

## The peptide hormone hepcidin: the main regulator of iron metabolism

Irena ARTUKOVIĆ NADINIĆ, DM, Polyclinic for Prevention of Cardiovascular Diseases and Rehabilitation, Zagreb, Croatia; Renata BARIĆ RAFAJ, mag. med. biochem., Full Professor, Ljiljana BEDRICA, DVM, PhD, Full Professor, Marina PAVLAK, DVM, PhD, Full Professor, Marija LIPAR, DVM, PhD, Scientific Advisor, Vladimir MRLJAK, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia

Hepcidin is a peptide hormone and the main regulator of iron metabolism in the body. It was discovered in human serum and urine in 2000 and named liver expressed antimicrobial protein-1 (LEAP-1). Research of antimicrobial peptides in relation to inflammatory response was conducted by Tomas Ganz. He named the protein hepcidin as it is produced by the liver and also has antimicrobial properties. The mouse model has been used in numerous studies on the role of hepcidin and its excretion regulation. It has also been shown that the synthesis of hepcidin is greatly stimulated by inflammation or iron overload. Hepcidin detection in serum and other body fluids is performed by the ELISA assay and mass spectrometry. The hepcidin concentrations in plasma measured by ELISA and by mass spectrometry are in correlation. ELISA assay is the most favourable method for the detection and measurement of hepcidin in low concentrations in fluids, whereas mass spectrometry is a more suitable measurement method for the active form of hepcidin. Chronic anaemia, sideropenic anaemia, malignant diseases, hereditary hemochromatosis, and ineffective

erythropoiesis can all disrupt hepcidin secretion. Therefore, hepcidin concentrations may have significant relevance in the diagnosis and treatment of iron imbalance. Improving the knowledge of the role of hepcidin in iron haemostasis can lead to new treatment possibilities in cases of increased or decreased iron concentrations. Hepcidin has recently been identified as an acute phase protein with antimicrobial and iron regulatory roles. Many researchers have contributed to the development of diagnostic testing to assess canine hepcidin concentrations, with research focusing on cloning and sequencing the genes that regulate canine hepcidin production. Phylogenetic studies have revealed that human hepcidin is more similar to canine than murine hepcidin. In dogs, as in humans, hepcidin is predominantly produced in the liver. In dogs, it has been detected in kidneys and in the lungs. Based on this review article, a new foundation has been laid for novel research of canine hepcidin. The dog could serve as a suitable model to elucidate the role of human hepcidin.

**Key words:** *hepcidin; liver; iron; ELISA; spectrometry*