

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Jurica Nazlić, dr. med.

**UČINAK UMJERENE KONZUMACIJE CRNOG VINA NA SERUMSKE
KONCENTRACIJE HEPCIDINA I DRUGE POKAZATELJE
HOMEOSTAZE ŽELJEZA U ZDRAVIH I U OSOBA SA ŠEĆERNOM
BOLEŠĆU TIP 2**

DOKTORSKI RAD

Split, 2024.

Disertacija je izrađena u Zavodu za temeljnu i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta
Sveučilišta u Splitu

Voditelj rada: prof. dr. sc. Mladen Boban, dr. med.

ZAHVALA

Zahvaljujem profesoru Mladenu Bobanu na podršci, savjetima i vođenju kroz cijelo vrijeme istraživanja i pisanja doktorskog rada.

Hvala docentici Diani Gujinović i profesorici Ivani Mudnić te svim ostalim djelatnicima Zavoda za temeljnu i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu koji su sudjelovali u procesu istraživanja.

Hvala docentici Leidi Tandari i djelatnicima Zavoda za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Split.

Hvala kolegama iz Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Split i kolegama iz primarne zdravstvene zaštite koji su mi pomogli u istraživanju.

Hvala svim prijateljima koji su mi bili pomoć i podrška.

Hvala mojim roditeljima na odgoju i podršci koju su mi pružali tijekom mog odrastanja i obrazovanja.

I na kraju meni najvažnije, veliko hvala mojoj obitelji, supruzi Mireli, kćeri Miji i sinu Nikoli na njihovoj ljubavi i strpljenju.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. HOMEOSTAZA ŽELJEZA	2
1.1.1. Željezo u ljudskom organizmu i apsorpcija željeza	2
1.1.2. Prijenos željeza: transferin	5
1.1.3. Pohrana željeza: feritin.....	7
1.1.4. Sustavna homeostaza željeza	8
1.1.5. Hepcidin	10
1.1.6. Patofiziologija željeza	13
1.1.7. Učinci sastojaka hrane na homeostazu željeza.....	15
1.1.8. Učinci alkohola i učinci vina na homeostazu željeza.....	15
1.2. ERITROPOEZA	17
1.2.1. Osovina eritropoetin-eritroferon-hepcidin	17
1.3. BIOLOŠKI UČINCI VINA	20
1.3.1. Biološki učinci vina u kardiovaskularnom sustavu.....	20
1.3.2. Biološki činci vina u šećernoj bolesti tipa 2.....	21
1.4. ŠEĆERNA BOLEST TIP 2	22
1.4.1. Definicija i klasifikacija šećerne bolesti	22
1.4.2. Patogeneza šećerne bolesti tipa 2	22
1.4.3. Željezo u patogenezi šećerne bolesti tipa 2	23
1.4.4. Učinak antihiperглиkemijskih lijekova na homeostazu željeza	24
2. CILJEVI I HIPOTEZE	26
2.1. Glavni ciljevi istraživanja	27
2.2. Sporedni ciljevi istraživanja:	27
2.3. Hipoteze istraživanja:	28
3. ISPITANICI I POSTUPCI	29
3.1. Ispitanici.....	30
3.2. Postupci.....	31
3.2.1 Anamnestičko ispitivanje	31
3.2.2. Antropometrijska mjerenja.....	31
3.2.3. Protokol intervencije – trojtjedna umjerena konzumacija crnog vina.....	32
3.2.4. Uzorkovanje krvi i laboratorijska analiza uzoraka.....	33
3.2.5. Statistička analiza podataka	33
3.2.6 Izračun veličine uzorka	34
4. REZULTATI	36

4.1. Osnovne i antropometrijske karakteristike ispitanika.....	37
4.2. Antihiperглиkemijska terapija ispitanika sa šećernom bolešću tipa 2	38
4.3. Biokemijski pokazatelji ispitanika.....	38
4.4. Hematološki pokazatelji i biokemijski pokazatelji statusa željeza ispitanika	40
5. RASPRAVA	45
6. ZAKLJUČCI.....	52
7. LITERATURA	54
8. SAŽETAK.....	71
9. SUMMARY	74
10. ŽIVOTOPIS.....	77

POPIS KRATICA

AHL	antihiperглиkemijski lijek
ALT	alanin aminotransferaza
Apo-Tf	apotransferin, transferin bez vezanog željeza
AST	aspartat aminotransferaza
C/EBP	protein koji veže CCAAT-pojačivač (engl. <i>CAATT-Enhancer-Binding Protein</i>)
DcytB	duodenalni citokrom b
DMT-1	transporter dvovalentnih metala 1 (engl. <i>Divalent Metal Transporter 1</i>)
EPO	eritropoetin
EPOR	eritropoetinski receptor
ERFE	eritroferon
FPN1	feroportin 1
HbA1c	glikirani hemoglobin
HDL	lipoprotein visoke gustoće (engl. <i>High-Density Lipoprotein</i>)
HFE	protein nasljedne hemokromatoze (engl. <i>Hereditary Hemochromatosis Protein</i>)
Hgb	serumska koncentracija hemoglobina
HIF	faktor induciran hipoksijom (engl. <i>Hypoxia Inducible Factors</i>)
HJV	protein hemojuvelin
Holo-Tf	holotransferin, transferin sa vezanim željezom
hsCRP	visokoosjetljivi C-reaktivni protein (engl. <i>High-Sensitive C-Reactive Protein</i>)
Htc	hematokrit
IGF 1	inzulinu sličan čimbenik rasta 1 (engl. <i>Insulin-Like Growth Factor 1</i>)
IL-6	interleukin 6

IRE	element koji odgovara na željezo (engl. <i>Iron Responsive Element</i>)
IRP	željezom regulirani proteini (engl. <i>Iron Responsive Protein</i>)
ITM	indeks tjelesne mase
KKS	kompletna krvna slika
LDL	lipoprotein niske gustoće (engl. <i>Low-Density Lipoprotein</i>)
MCH	prosječna količina hemoglobina u eritrocitu (engl. <i>Mean Corpuscular Hemoglobin</i>)
MCHC	prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu (engl. <i>Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration</i>)
MCV	prosječni volumen eritrocita (engl. <i>Mean Corpuscular Volume</i>)
MODY	maturity onset diabetes of the young
NTBI	željezo nevezano za transferin (engl. <i>Non Transferrin Bound Iron</i>)
PAMP	molekularni obrasci patogenih mikroorganizama (engl. <i>Pathogen-Associated. Molecular Patterns</i>)
RDW	raspodjela eritrocita po obujmu (engl. <i>Red Blood Cell Distribution Width</i>)
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SCF	čimbenik rasta matičnih stanica (engl. <i>Stem Cell Factor</i>)
SGLT2	inhibitori suprijenosnika natrija i glukoze 2 (engl. <i>Sodium-Glucose Cotransporter 2</i>)
STAT	prenositelj signala i aktivator transkripcije (engl. <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>)
STEAP	protein prostate 3 sa šest transmembranskih područja (engl. <i>Six Transmembrane Prostate Protein 3</i>)
sTfR	topivi transferinski receptor (engl. <i>Soluble Transferrin Receptor</i>)
ŠBT1	šećerna bolest tip 1

ŠBT2	šećerna boleost tip 2
TfR	transferinski receptori
TfR1	transferinski receptor tipa 1
TfR2	transferinski receptor tipa 2
TIBC	ukupni kapacitet vezanja željeza (engl. <i>Total Iron Binding Capacity</i>)
UIBC	nezasićeni kapacitet vezanja željeza (engl. <i>Unsaturated Iron Binding Capacity</i>)
TLR	receptori slični Tollu (engl. <i>Toll-Like Receptors</i>)

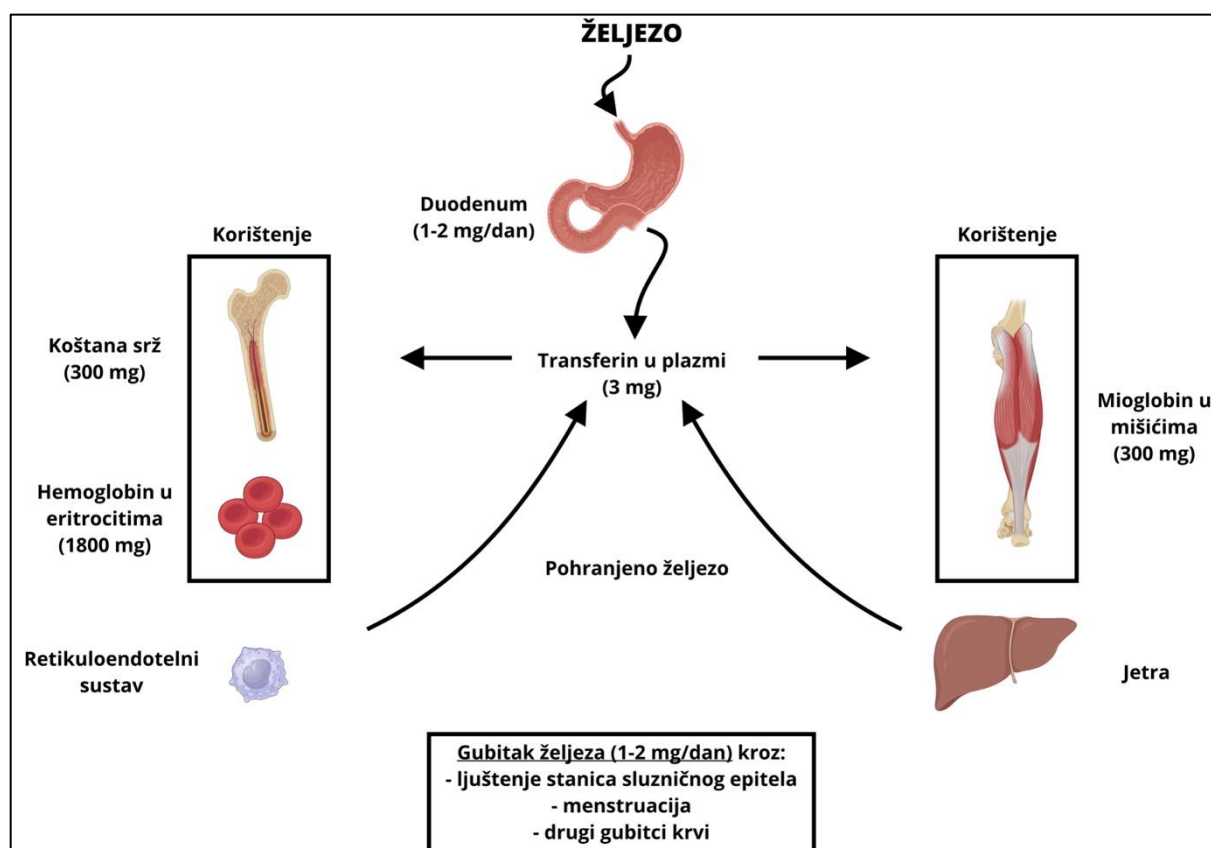
1. UVOD

1.1. HOMEOSTAZA ŽELJEZA

1.1.1. Željezo u ljudskom organizmu i apsorpcija željeza

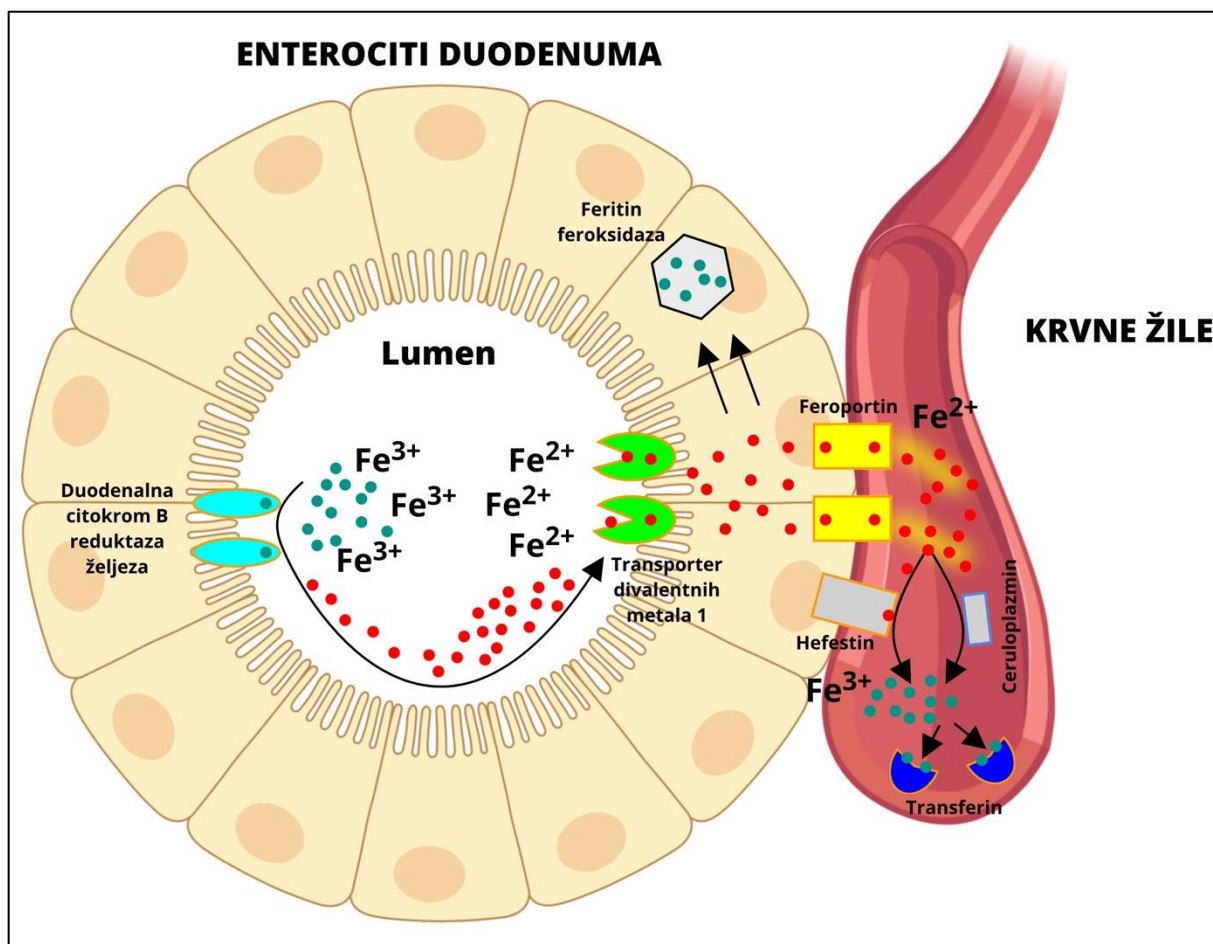
Željezo je esencijalni stanični element koji je prisutan u tragovima, a igra ključnu ulogu u raznim fiziološkim procesima u ljudskom tijelu. Prvenstveno je uključen u transport kisika, energetske metabolizam i staničnu proliferaciju, a njegova je prisutnost bitna za funkciju hemoglobina, mioglobina i brojnih enzima (1, 2). Odrasla osoba u prosjeku u svom organizmu ima 2-4 g željeza (3). Oko 65% ukupnog željeza u ljudskom tijelu nalazi se u hemoglobinu unutar eritrocita, gdje olakšava prijenos kisika iz pluća u tkiva (4). Preostalo željezo distribuira se među različitim organima i tkivima, uključujući mioglobin u mišićnim vlaknima (10%), makrofage (14%) te pohranu u jetri (6%) i koštanoj srži (5%) (4, 5) (slika 1).

Prehrambeni izvori željeza kategorizirani su u dva oblika: hemske i anorganske željezo. Hemske željezo, koje potječe iz hemoglobina i mioglobina u namirnicama životinjskog podrijetla, najlakše se apsorbira, u rasponu od 15% do 35%, te najviše pridonosi ukupnoj količini apsorbiranog željeza dok anorgansko željezo dolazi iz namirnica biljnog podrijetla, ali se slabije apsorbira (6, 7).



Slika 1. Prikaz raspodjele željeza u organizmu (autorska slika).

Za sintezu novih eritrocita potrebno je oko 20-25 mg željeza dnevno, a većina željeza (90%) se pribavlja recikliranjem starih eritrocita (8). Dakle, željezo se u cirkulaciju otpušta iz duodenalnih enterocita koji u uravnoteženom stanju apsorbiraju 1-2 mg željeza dnevno, a ostatak iz makrofaga koji recikliraju stare eritrocite (9). Proces apsorpcije željeza iz hrane koja je glavni izvor željeza može se podijeliti u tri faze: 1) apsorpcija željeza 2) transport unutar enterocita i 3) skladištenje i prijenos izvan enterocita. Proces apsorpcije odvija se u dvanaesniku, gdje ferireduktaza, duodenalni citokrom b (DcytB) na apikalnoj membrani enterocita reducira Fe(III) u Fe(II), koje se potom prenosi u citoplazmu putem transportera dvovalentnih metala 1 (DMT-1, engl. *divalent metal transporter 1*) (10, 11). Nakon ulaska u stanicu željezo koje se ne izluči može se pohraniti u feritinu, unutarstaničnom proteinu sastavljenom od 24 podjedinice koji može oksidirati i pohraniti do 4500 atoma Fe(III) željeza. Citosolna razgradnja feritina dovodi do potpunog oslobađanja željeza, dok lizosomalna razgradnja stvara hemosiderin i štiti od toksičnosti željeza (12). Nadalje, transport željeza preko bazolateralne membrane enterocita u krvotok obavlja se preko nosača feroportina 1 (FPN1), gdje se ponovno oksidira u Fe(III) oblik uz djelovanje ferooksidaze hefestina (13, 14,15) (slika 2).



Slika 2. Transport željeza preko enterocita (autorska slika).

Željezo ima bitnu ulogu u različitim fiziološki procesima te se pojavljuje u različitim oksidativnim stanjima. U normalnim, fiziološkim uvjetima pojavljuje se u trovalentnom obliku (Fe^{III}) u kojem je stabilno, ali slabo topljivo u vodi, pa se veže na proteine poput transferina kako bi se osigurala topljivost i bioraspoloživost te omogućio siguran transport u redoks-neaktivnom stanju koje nije toksično (16). Kod sistemskog opterećenja željezom ukupni kapacitet vezanja željeza je premašen zbog masivnog priljeva iz crijeva ili iz eritrocitima preopterećene jetre i slezene te se pojavljuje labilno plazmatsko željezo, odnosno željezo koje nije vezano za transferin (NTBI, engl. *non-transferrin binding iron*) (17, 18). Takva vrsta željeza posebno je reaktivna i može doprinijeti oksidativnom oštećenju stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. *reactive oxygen species*) Fentonovom reakcijom, pri čemu željezo reagira s vodikovim peroksidom i dovodi do stvaranja hidroksilnih radikala (19). Također, stanično željezo koje se pojavljuje u dvovalentnom obliku (Fe^{II}), topljivo je u vodi i visoko reaktivno kada dosegne patološke razine te može dovesti do stvaranja ROS-a putem Fentonove reakcije (20, 21). Višak željeza i ROS mogu uzrokovati oštećenje stanica, staničnu smrt i zatajenje

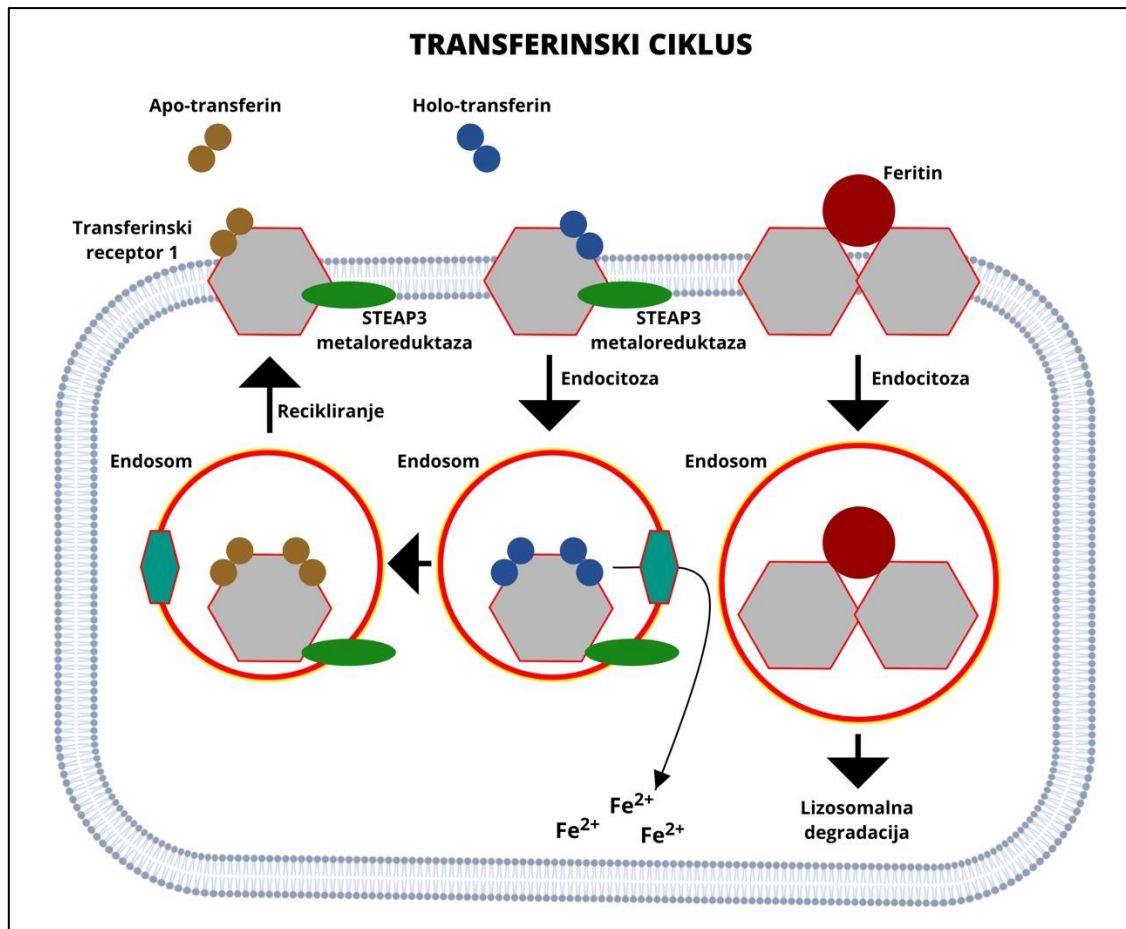
organa, prvenstveno utječući na jetru, srce, gušteraču, štitnjaču i središnji živčani sustav (16, 22, 23).

1.1.2. Prijenos željeza: transferin

Transferin je monomerni plazmatski glikoprotein koji ima ulogu u prijenosu i isporuci željeza u ciljna tkiva i organe, ali djeluje i kao čimbenik rasta i diferencijacije različitih vrsta stanica (24). Njegovo primarno mjesto sinteze je jetra, ali može biti sintetiziran i u Sertolijevim stanicama testisa, oligodendrocitima, ependimalnim stanicama koroidnog pleksusa i endotelnim stanicama moždanih kapilara (24, 25).

Tri glavne uloge transferina su: održanje topljivosti trovalentnog željeza u fiziološkim uvjetima, regulirani prijenos željeza i unos u stanice, te održavanje trovalentnog željeza u redoks-neaktivnom stanju kako bi se spriječio nastanak ROS (26). Važnu ulogu u vezanju i otpuštanju željeza od transferina imaju pH, temperatura, kelatorski i anionski utjecaj te interakcija s transferinskim receptorima (27). U već spomenutim uvjetima nekontroliranog nakupljanja i preopterećenja željezom, nadmašuje se kapacitet transferina što dovodi do stvaranja potencijalno toksičnog željeza, NTBI. Takvo željezo uklanja se iz plazme putem jetre i drugih organa pri čemu može dovesti do patoloških stanja nakupljanjem u tim organima (28). Transferin u serumu može biti u obliku bez vezanog željeza (apo-Tf, apotransferin), s vezanim jednim ionom željeza ili dva iona željeza (holo-Tf, holotransferin) (29) (slika 3). Transport željeza u stanice u procesu zvanom transferinski ciklus strogo je reguliran te se odvija preko transferinskih receptora (30). Postoje 2 vrste receptora, transferinski receptor tipa 1 (TfR1) i transferinski receptori tipa 2 (TfR2). Proces transporta započinje vezanjem transferina za receptore, slijedi unos transferina preko procesa endocitoze te otpuštanje željeza iz proteina smanjenjem pH unutar endosoma (31). TfR1 je membranski glikoprotein koji ima dvije podjedinice od 90 kDa povezane disulfidnom vezom, a svaka je sposobna na sebe vezati po jednu molekulu transferina (32). Njegova ekspresija je prisutna u niskim razinama u većini normalnih stanica dok se visoka ekspresija opaža u stanicama s povećanom potrebom za željezom, poput trofoblasta posteljice i eritroidnih progenitora, zbog velike potrebe za željezom u sintezi hema (33). U procesu unosa transferina preko TfR1, željezom zasićeni holotransferin veže se za TfR1, a kompleks se internalizira putem klatrinom posredovane endocitoze. U kiseloj sredini endosoma, Fe(III) se odvaja od transferina i reducira u Fe(II) pomoću metaloreduktaza poput STEAP3 (engl. *six transmembrane prostate protein 3*), a zatim se transportira u citosol putem DMT1. Kompleks apo-Tf/TfR1 zatim se prenosi natrag na staničnu površinu putem

reciklirajućeg endosoma, gdje se apo-Tf oslobađa u krvotok. Dokazano je da je feritin također ligand za TfR1 (29).



Slika 3. Transferinski ciklus (autorska slika).

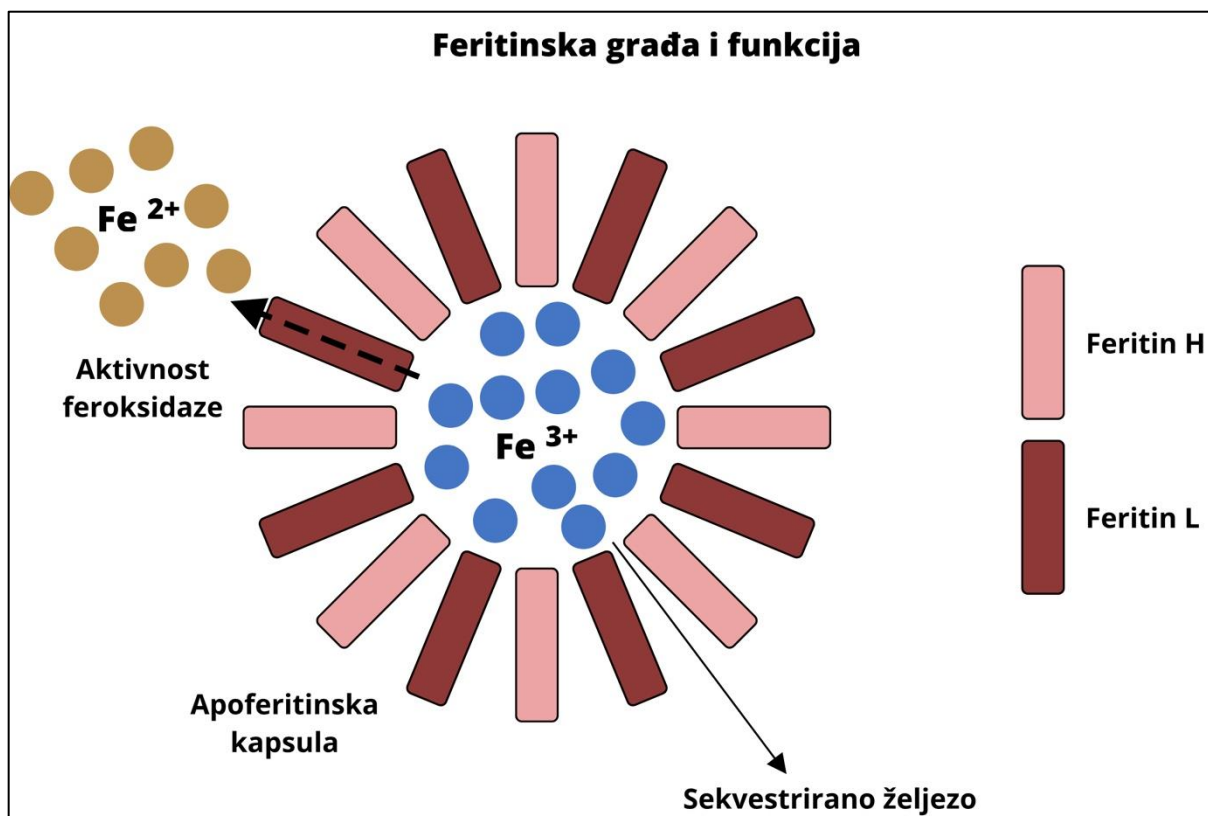
TfR2 slično kao TfR1 veže transferrin u pH ovisnim uvjetima, ali nije reguliran unutarstaničnom koncentracijom željeza kao TfR1 te je njegova ekspresija najviše izražena u hepatocitima (34, 35). Nadalje, dokazano je da je TfR2 važna stavka i sinergistički djeluje s eritropoetinskim receptorom u procesu eritropoeze u progenitorskim stanicama, a u jetri regulira sintezu hepcidina (36). U nasljednoj hemokromatozi uz disfunkcionalni TfR2, jetra proizvodi skoro dvostruko manje hepcidina zbog čega dolazi do postupnog nakupljanja željeza u različitim tkivima i organima s njihovim posljedičnim oštećenjem i gubitkom funkcije (37). U kliničkoj praksi nedostatak ili višak željeza mjerimo laboratorijskim pokazateljima željeza u koje pripada i transferrin, ali i češće se ispituju pokazatelji koji pokazuju kapacitet vezanja željeza na transferrin (38).

Ukupni kapacitet vezanja željeza (TIBC, engl. *total iron binding capacity*) je važan laboratorijski test za dijagnosticiranje poremećaja metabolizma željeza (39). On ukazuje na maksimalnu količinu željeza potrebnu za zasićenje svih dostupnih veznih mjesta na transferinu,

odnosno pokazuje zasićenost transferina željezom (39, 40). U fiziološkim uvjetima, u zdrave osobe samo je jedna trećina transferina zasićena željezom, a serumski transferin ima dodatni kapacitet vezanja kojeg nazivamo nezasićeni kapacitet vezanja željeza (UIBC, engl. *unsaturated iron binding capacity*) (41). U uvjetima kada imamo manjak željeza, udio nezasićenog transferina se povećava te se povećava i TIBC dok se obrnuto događa u stanjima preopterećenosti željezom kada se količina nezasićenog transferina smanjuje te su i vrijednosti TIBC niže (42).

1.1.3. Pohrana željeza: feritin

Feritin kao jedan od najvažnijih proteina za pohranu željeza ima središnju ulogu u metabolizmu željeza te služi zadržavanju željeza u obliku koji je netoksičan i dostupan za korištenje u organizmu (43). Citosolni feritin sastoji se od H i L podjedinica čiji se omjer razlikuje ovisno o vrsti tkiva u kojoj se nalaze te o odgovoru na upalna stanja i ksenobiotsko opterećenje (44, 45) (slika 4). H podjedinica ima feroksidaznu aktivnost te katalizira oksidaciju dvovalentnog željeza, dok L podjedinica potiče mineralizaciju i promet trovalentnog željeza (46). Apoferitin je forma bez željeza koja kao ovojnica čini spremnik oko željeza koje je pohranjeno kao ferihidrit te skupa čine feritin ili holoferitin (47). U stanjima kada nedostaje željeza, lizosomalnom autofagijom željezo iz citosola prelazi u lizosom u kojem se pomoću lizosomalne proteaze razgrađuje te se oslobađa željezo (48–50).



Slika 4. Građa i funkcija feritina (autorska slika).

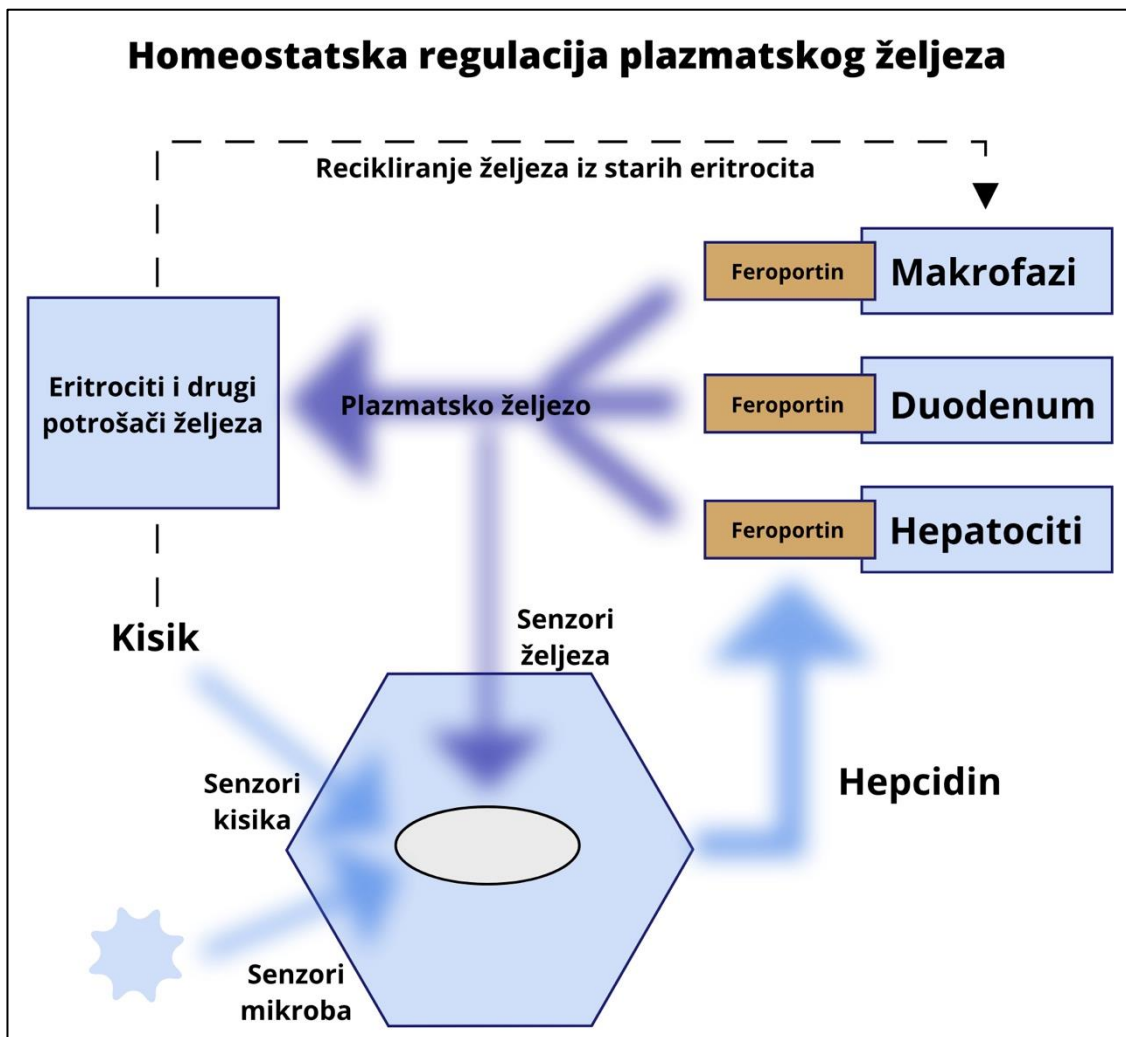
Iako se smatra citoplazmatskim proteinom, feritin je prisutan i u jezgri različitih stanica kao što su neuroni, hepatociti, kornealne epitelijalne stanice i neke stanice raka te u njima služi za opskrbu jezgrenih enzima željezom, kao zaštita DNA od oksidativnog stresa i u regulaciji transkripcije (51, 52). Osim što se smatra i glavnom zalihom željeza, feritin je također biokemijski marker upale (43, 53), pri čemu upala potiče njegovu sintezu u jetri i otpuštanje u plazmu (54). Također je povišen u osoba oboljelih od malignih bolesti te je njegova razina povezana s težinom bolesti i lošijim ishodima (55).

1.1.4. Sustavna homeostaza željeza

Da bi se razine željeza u organizmu održale unutar fizioloških vrijednosti razvijeni su mehanizmi homeostaze za kontrolu staničnih i ukupnih zaliha željeza (56, 57). Tri ključna tipa stanica uključena u postnatalnu homeostazu željeza su duodenalni enterociti koji apsorbiraju željezo iz hrane, makrofagi koji recikliraju željezo iz eritrocita i drugih stanica, te hepatociti koji pohranjuju željezo i mogu ga po potrebi otpuštati (58). Željezo se cirkulacijom u topljivom, netoksičnom obliku prenosi u ciljne organe pomoću transferina. Pojedine stanice prilagođavaju apsorpciju željeza vezanog za transferin na temelju vlastitih potreba za željezom (26). Veza između transferina opterećenog željezom i TfR na površini stanice rezultira endocitozom i

unosom željeza te prijenosom do mitohondrija, gdje se koristi za sintezu hema i željezo-sumpornih klastera, koji su ključni dijelovi nekoliko metaloproteina. Višak željeza se pohranjuje i detoksicira u citosolnom feritinu (59, 60). Budući da ne postoji jasan mehanizam izlučivanja željeza iz organizma, njegova ravnoteža se uglavnom regulira na razini apsorpcije (61), pri čemu dolazi do promjena u staničnom metabolizmu, regulaciji gena, aktivaciji signalnih putova, kontroli staničnog ciklusa, diferencijaciji i staničnoj smrti, a te prilagodbe posreduju hepcidin, IRE/IRP (engl. *iron-responsive element/ iron regulatory proteins*) signalni sustav i HIF2 α (engl. *hypoxia inducible factor 2 α*) transkripcijski faktor (62, 63).

Hepcidin, cirkulirajući peptidni hormon koji se uglavnom izlučuje iz jetre, najvažniji je regulator sistemske homeostaze željeza. On regulira koncentraciju željeza u plazmi i raspodjelu željeza u tkivima inhibirajući crijevnu apsorpciju željeza, otpuštanje recikliranog željeza iz makrofaga kao i oslobađanje uskladištenog željeza iz jetrenih stanica (64). Hepcidin se veže na ferroportin, jedini do sada utvrđeni prijenosnik željeza iz unutrašnjosti stanice u međustanični prostor. Ferroportin je prisutan na površini apsorptivnih enterocita, makrofaga, hepatocita i stanica placente. Vezanjem hepcidina dolazi do unosa ferroportinsko-hepcidinskog kompleksa u stanicu i razgradnje ferroportina. Posljedica toga je smanjen izlazak i povećano nakupljanje željeza u stanici. Posttranslacijska regulacija ferroportina pomoću hepcidina tako zaokružuje homeostatsku petlju: željezo utječe na sekreciju hepcidina, koji potom kontrolira količinu ferroportina na staničnoj površini (65) (slika 5). Budući da je željezo potrebno za niz staničnih funkcija, stalna ravnoteža između unosa, prijenosa, skladištenja i korištenja željeza ključna je za njegovu homeostazu (66).



Slika 5. Homeostatska regulacija plazmatskog željeza (autorska slika).

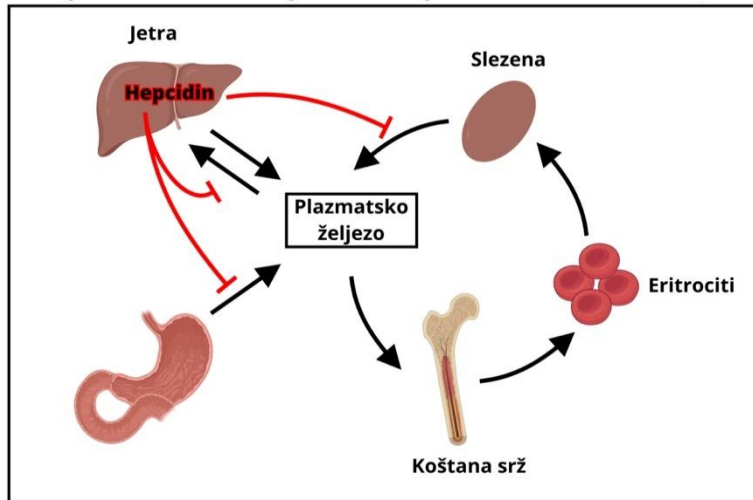
1.1.5. Hepcidin

Hepcidin je peptidni hormon građen od 25 aminokiselina koji se pretežno proizvodi u hepatocitima. Posrednik je urođenog imuniteta i najvažniji je regulator homeostaze željeza (67) (slika 6). Inicijalno se stvara kao pre-pro-peptid sastavljen od 84 aminokiseline, koji se cijepanjem pretvara u prohepcidin sastavljen od 64 aminokiseline. Djelovanjem prohormonske konvertaze furina nastaje zreli, biološki aktivni oblik hormona, hepcidin (68). Njegova sinteza uvelike je posredovana upalom i zalihama željeza u tijelu (69–71). Stanični stres povezan s izlaganjem toksičnim ksenobioticima i teškim metalima također potiče sintezu hepcidina što ukazuje na njegovu moguću citoprotektivnu ulogu (72). Suprotno tome, proizvodnja hepcidina potisnuta je anemijom i hipoksijom (64, 73). U uvjetima potaknute eritropoeze, primjerice nakon akutnog gubitka krvi, razina hepcidina se snizuje čime se povećava izvoz željeza iz stanica u plazmu kako bi se podržala proizvodnja novih crvenih krvnih stanica (74). Patološki

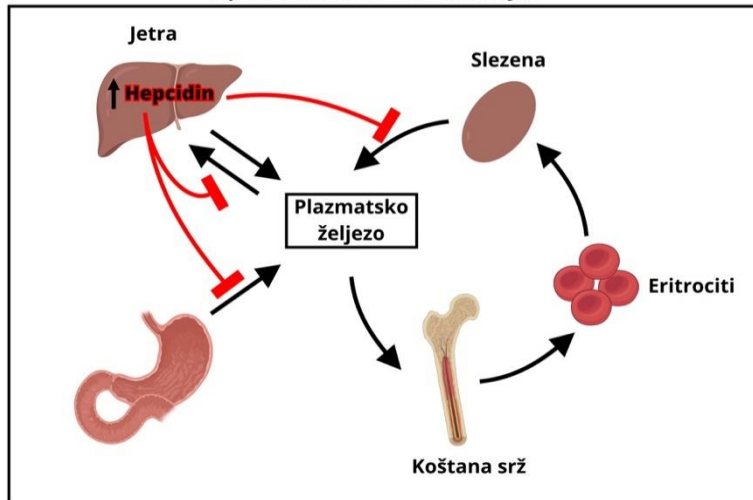
povišene razine hepcidina dovode do hipofereemije te uzrokuju ili doprinose anemijama uslijed manjka željeza, anemiji kronične upale, anemiji u kroničnoj bubrežnoj bolesti i anemiji u malignim bolestima. Nedostatak hepcidina dovodi do preopterećenja željezom u nasljednoj hemokromatozi i neučinkovitoj eritropoezi (65, 75). Pokazano je kako neki čimbenici, čija uloga u regulaciji homeostaze željeza nije dokazana, smanjuju ekspresiju hepcidina. Među njima valja posebno istaknuti epidermalni čimbenik rasta, hepatocitni čimbenik rasta, čimbenik tumorske nekroze (TNF- α , engl. *Tumor necrosis factor- α*) te spolni hormoni estrogen i testosteron. (76). U kontekstu uloge hepcidina u prirođenoj imunosti, dokazana je njegova antibakterijska aktivnost (77). Disulfidne veze koje čine okosnicu molekule hepcidina imaju glavnu ulogu u vezanju na unutarstaničnu DNA bakterija te djeluju bakteriostatski na mnoge gram pozitivne i negativne bakterije (78). Drugi predloženi mehanizam je da receptori slični Tollu (TLR, engl. *Toll-Like Receptors*) izraženi na stanicama prirođene imunosti prepoznaju molekularne obrasce patogenih mikroorganizama (PAMP, engl. *Pathogen-Associated. Molecular Patterns*) pri čemu se aktiviraju signalni putevi koji dovode do izlučivanja upalnih citokina, kemokina, interferona tip 1 i antimikrobnih peptida koji stimuliraju ekspresiju hepcidina (79, 80). Što se tiče hepcidina koji se proizvodi u upalnim stanjima, tu važnu ulogu ima interleukin 6 (IL-6), pleiotropni citokin sa širokim rasponom biološkog djelovanja u imunološkoj regulaciji, hematopoezi, upali i onkogenezi (81). IL-6 stimulira ekspresiju hepcidina putem STAT 3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*) signalnog puta (82). Proizvodnja hepcidina u kontekstu prirođenog imunološkog odgovora na infekcije ili tijekom upale može omogućiti smanjenu dostupnost željeza izvanstaničnim patogenima što bi moglo doprinijeti obrani domaćina (80, 83).

Osim hepatocita, koji su glavni izvor hepcidina u krvotoku, druge vrste stanica poput makrofaga i adipocita također izražavaju hepcidin mRNA, ali u znatno nižim razinama. Značaj takve proizvodnje hepcidina izvan jetre još uvijek nije jasan, ali bi mogao imati ulogu u lokalnoj regulaciji prometa željeza (75).

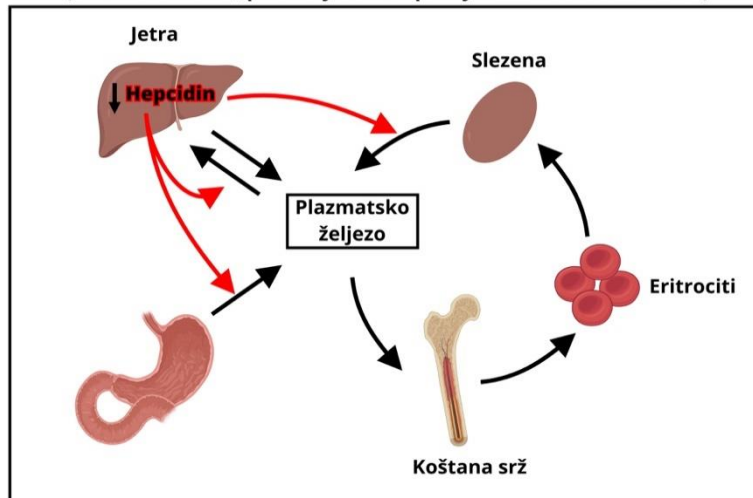
Homeostatski mehanizmi
(posredovano interakcijom unosa željeza i eritroidnih čimbenika)



Patološka stimulacija
(upala; adenomi; razne mutacije)



Patološka ugradnja
(hemokromatoza; prekomjerna ekspresija eritroidnih čimbenika)



Slika 6. Uloga hepcidina u a) normalnoj homeostazi b) patološkoj stimulaciji hepcidina c) patološkoj supresiji hepcidina (autorska slika).

1.1.6. Patofiziologija željeza

Hemokromatoza

Hemokromatozu možemo definirati kao sistemsko preopterećenje željezom genetskog podrijetla, uzrokovano smanjenjem koncentracije hepcidina ili smanjenjem vezanja hepcidina na ferroportin (84). To dovodi do povećane apsorpcije željeza u crijevima i nakupljanja prekomjerne količine željeza u različitim tkivima i organima što konačno rezultira njihovim oštećenjem i gubitkom funkcije (85). Nadalje, iako su eritropoetske potrebe potpuno zadovoljene, enterociti nastavljaju prenositi nepotrebno željezo iz probavljene hrane u krvotok, umjesto da ga zadrže u obliku feritina što može odražavati primarnu abnormalnost samih enterocita ili poremećaj regulatornih signala koji potječu s drugog mjesta (86). Najčešći oblik hemokromatoze rezultat je homozigotnih mutacija u HFE genu, koji kodira protein za nasljednu hemokromatozu (84, 87). Dokazano je da HFE ima važnu ulogu u regulaciji ekspresije hepcidina kao odgovor na preopterećenje željezom (88). Također osobe s HFE-povezanim hereditarnom kromozomom imaju smanjenu ekspresiju TfR2 i hemojuvelin (HJV) mRNA koje kodiraju gene za TfR2 i HJV koji je zadužen za regulaciju hepcidina (89).

Kod hemokromatoze, višak željeza najprije se očituje porastom zasićenja serumskog transferina, a zatim se željezo taloži u tkivnim zalihama, posebice u parenhimu jetre, što je praćeno progresivnim povećanjem serumskog feritina (90). Budući da su kapaciteti transferina za vezanje željeza zasićeni, također dolazi i do stvaranja već spomenutog željeza koje nije vezano za transferin, a koje je potencijalno toksično zbog stvaranja kisikovih radikala (91, 92). Zbog progresivne akumulacije željeza u parenhimnim stanicama jetre, gušterače, srca i adenohipofize bolest se može očitovati kao ciroza jetre, hepatocelularni karcinom, šećerna bolest, seksualna disfunkcija, kardiomiopatija, desktruktivni artritis i generalizirane kožne pigmentacije (87). Zahvaljujući sve ranijoj dijagnozi, klasična trijada ciroze, brončane kože i šećerne bolesti sada je rijetka kod odraslih s nasljednom hemokromatozom. Najčešći simptomi pri dijagnosticiranju kod osoba srednje dobi sada su umor, slabost te artralgiya koja je ponekad povezana s hepatomegalijom ili blago povišenim razinama aminotransferaza (86).

Anemija

Anemija je zdravstveno stanje koje karakterizira smanjenje hemoglobina, hematokrita ili broja eritrocita te je prema veličini eritrocita možemo podijeliti na makrocitnu, mikrocitnu ili normocitnu anemiju (93).

Mikrocitnu anemiju možemo definirati kao anemiju s MCV-om (prosječni volumen eritrocita, engl. mean corpuscular volume) manjim od 80 fL, a njen najčešći uzrok je nedostatak željeza (94). U općoj populaciji manje česti su anemija kronične bolesti, hemoglobinopatije i sideroplastična anemija (95). Anemija zbog manjka željeza ili sideropenična anemija je općenito najčešća vrsta anemije, a glavna etiologija je gubitak krvi zbog menstrualnog ciklusa ili zbog gastrointestinalnog krvarenja (96). Mjerenje razine feritina u serumu, zasićenosti transferina, topljivih serumskih transferinskih receptora (sTfR, engl. *soluble transferrin receptor*), indeksa sTfR i feritina pouzdani su dijagnostički pokazatelji sideropenične anemije (97).

Anemija kronične bolesti ili anemija uzrokovana upalom druga je najčešća vrsta anemije u kliničkoj praksi (98). Često se javlja kod osoba s kroničnim bolestima i hospitaliziranih pacijenata te je značajan čimbenik koji doprinosi pobolu i smrtnosti, pogoršavajući simptome osnovnog upalnog stanja (99). Razvija se kod kroničnih upalnih poremećaja kao što su kronične infekcije, maligne ili autoimune bolesti (100). Patofiziologija je multifaktorska i uključuje tri mehanizma: skraćeni životni vijek eritrocita, oslabljenu proliferaciju eritroidnih progenitorskih stanica te poremećaje u metabolizmu željeza (99). Citokini i proteini akutne faze igraju ključnu ulogu u patogenezi anemije kronične bolesti. Promjene homeostaze željeza, posredovane hepcidinom, uvelike su odgovorne za nastanak ove vrste anemije (101). Proteini akutne faze, kao što je hepcidin, zajedno s pro- i protu-upalnim citokinima, utječu na procese preuzimanja i oslobađanja željeza u monocitima i makrofagima, što rezultira zadržavanjem željeza unutar retikuloendotelnog sustava i sistemskom hipoferemijom. Ovi metabolički učinci djelomično se postižu modulacijom ekspresije gena za metabolizam željeza posredstvom citokina ili induciranjem stvaranja nestabilnih radikala, koji reguliraju posttranskripcijsku regulaciju stanične homeostaze željeza. Upalni procesi također utječu na preuzimanje željeza od strane makrofaga putem eritrofagocitoze, dok hepcidin smanjuje oslobađanje željeza iz makrofaga izravnom interakcijom s ključnim proteinom za izvoz željeza, feroportinom (102).

Apsolutni manjak željeza povezan je s razvojem sideropenične anemije, dok je funkcionalni manjak željeza, karakterističan za anemiju kronične bolesti, a osim razlika u pokazateljima željeza, među njima postoje razlike i u eritrocitnim pokazateljima kao što su prije spomenuti MCV, zatim MCH (prosječna količina hemoglobina u eritrocitu, engl. *mean corpuscular hemoglobin*), MCHC (prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu, engl. *mean corpuscular hemoglobin concentration*) te RDW (širina distribucije volumena eritrocita, engl. *red blood cell distribution width*) (103).

Anemije koju su prvenstveno posredovane poremećenom ravnotežom hepcidina se mogu podijeliti na one s viškom hepcidina među kojima je najčešća anemija kronične bolesti, te na one s manjkom hepcidina među kojima je najčešća β – talasemija (104).

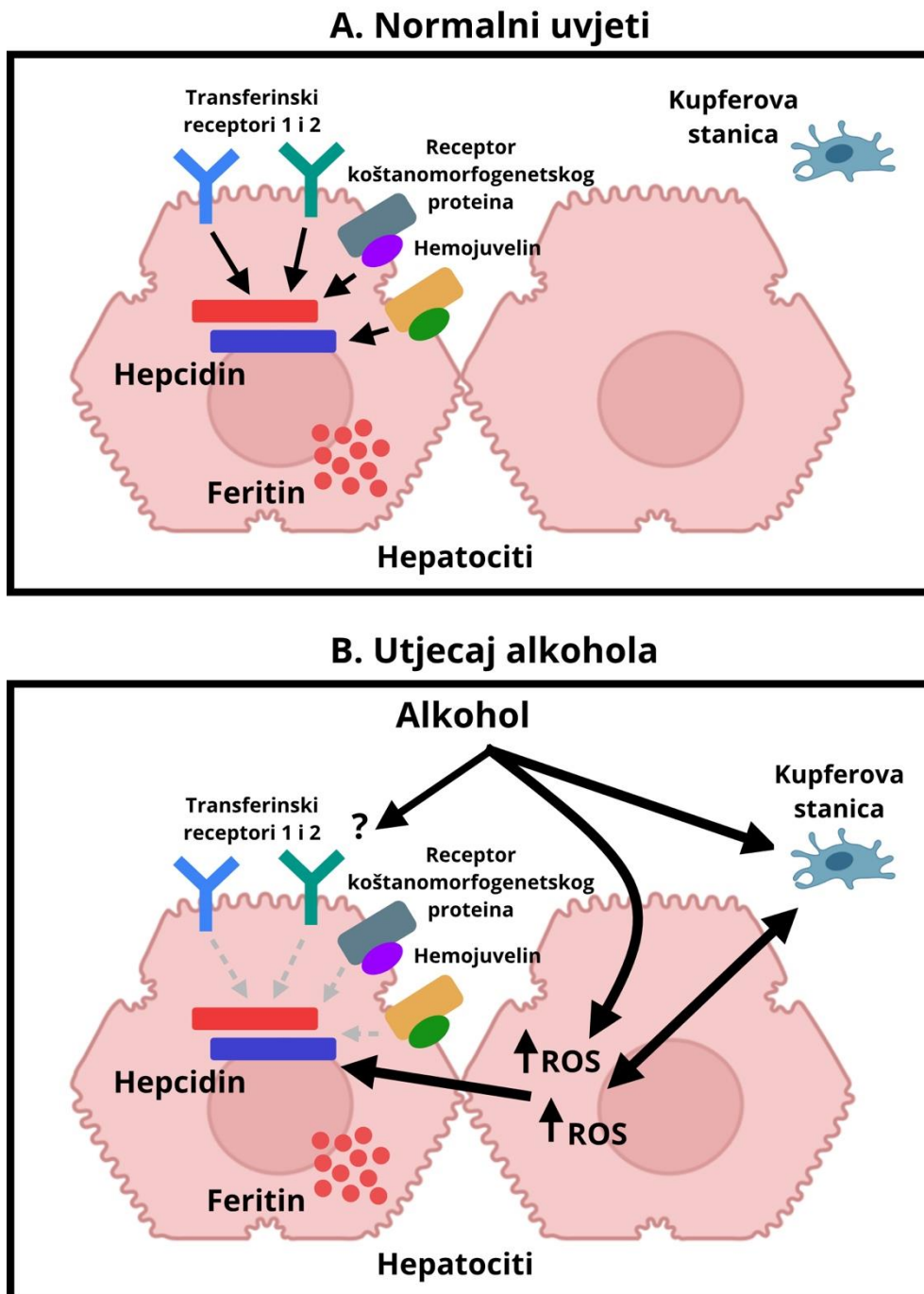
1.1.7. Učinci sastojaka hrane na homeostazu željeza

Najvažniji čimbenici koji potiču apsorpciju željeza iz hrane su askorbinska kiselina, mliječna kiselina, aminokiseline i dipeptidi iz životinjskog mesa, prisutnost henskog željeza i alkohol. S druge strane, najznačajniji inhibitori apsorpcije željeza su fitinska kiselina, polifenoli, proteini iz soje, mlijeka, i jaja te kalcij (105). Mediteranska prehrana smatra se prehranom s niskom dostupnošću željeza, što znači da u njoj prevladavaju navedeni inhibitori apsorpcije u odnosu na induktore apsorpcije željeza (106). Nadalje, fitonutrijenti dostupni u Mediteranskoj prehrani imaju sposobnost prodiranja u stanice i vezanja nestabilnog željeza u stanicama čime se sprječava nastanak lipofuscina, unutarstanične pigmentne granule nastale oksidativnim oštećenjem staničnih makromolekula (107). Polifenoli iz prehrane i njihova sposobnost vezanja željeza mogu igrati važnu ulogu u upalnim i imunomodulacijskim odgovorima makrofaga i dendritičkih stanica te mogu pridonijeti preoblikovanju crijevne mikrobiote (108).

1.1.8. Učinci alkohola i učinci vina na homeostazu željeza

Poznato je da konzumacija alkohola pogoduje akumulaciji željeza u tijelu (109, 110), ali utječe i na ostale čimbenike koji su uključeni u homeostazu željeza. Većina istraživanja je provedena kod bolesnika s alkoholnom bolesti jetre te se utjecaj prekomjerne konzumacije alkohola očituje u smanjenoj sintezi hepcidina, induciranju povećane ekspresije duodenalnih proteina DMT-1 i feroportina te povećanju razine feritina (111). Nadalje, pokazano je kako pojačano izlaganje etanolu inducira ekspresiju receptora za transferin, te se povećava unos željeza vezanog za transferin što bi moglo biti jedan od predloženih mehanizama nakupljanja željeza (112, 113). Alkoholom posredovani oksidativni stres djeluje na parenhimalne stanice jetre te inhibira transkripciju i sintezu hepcidina (114, 115) kao i na Kupfferove stanice koje proizvode hepatoprotektivne ili toksične citokine (116) (slika 7). U populacijskim istraživanjima na zdravim osobama, pokazano je kako je povećani unos alkohola povezan s povećanjem razine feritina i ukupnog sadržaja željeza u tijelu (117, 118). Nadalje, u istraživanjima na animalnim modelima, predloženi mehanizam je da oksidativni stres posredovan metabolizmom etanola smanjuje transkripciju hepcidina putem C/EBP α (engl.

CAATT-Enhancer-Binding Protein) transkripcijskog faktora, što dovodi do povećanog transporta željeza u dvanaesniku (119–121).



Slika 7. Prikaz regulacije sinteze hepcidina u jetri a) u normalnim uvjetima b) pod utjecajem alkohola (autorska slika).

Suprotno prekomjernoj konzumaciji alkohola, umjerena konzumacija alkohola usko je povezana s nakupljanjem željeza u tijelu i smanjenjem rizika od nastanka anemije zbog nedostatka željeza, bez istodobnog povećanja rizika od preopterećenja željezom (110, 122).

Vina posjeduju već prije spomenutu antioksidativnu komponentu, polifenole, koji su u većoj mjeri prisutni u crnim nego bijelim vinima (123). Naime, osim antioksidativnih svojstava dokazano je da polifenoli iz vina imaju sposobnost kelacije željeza te izravno inhibiraju njegovo nakupljanje (124), a neizravno također formiraju komplekse sa željezom koje se tako teže apsorbira u crijevima ili više izlučuje putem fecesa (125). Jedan od predloženih mehanizama je da kompleks polifenola i željeza otežano prolazi kroz bazolateralnu membranu enterocita preko ferroportina 1 (126). Posljedično pri konzumaciji crnog vina koje ima veći udio polifenola dolazi do manje topljivosti i teže apsorpcije željeza nego pri konzumaciji bijelog vina (127, 128). S druge strane, jedno kliničko istraživanje sekundarne prevencije koronarne bolesti pokazalo je pozitivnu korelaciju između unosa etanola iz vina i koncentracija serumskog željeza i feritina suprotno od pretpostavke smanjenja razina željeza i povećanja rizika osnovne bolesti.

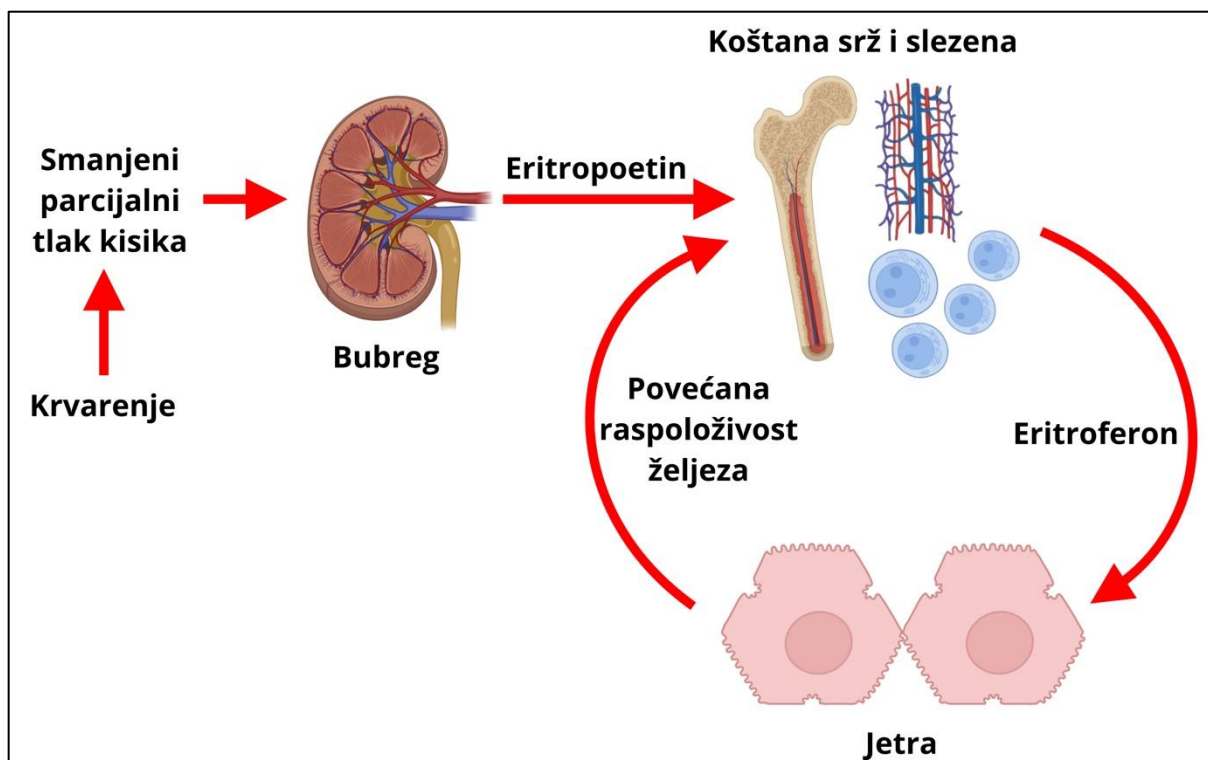
Uz izravne inhibitorne učinke na apsorpciju željeza, pokazalo se kako neki fenolni spojevi u vinu induciraju ekspresiju hepcidina, čime smanjuju sistemske razine željeza (130) i sprječavaju preopterećenje željezom izazvano etanolom (131). Nadalje, istraživanja na animalnim modelima pokazala su da resveratrol iz skupine polifenola smanjuje nakupljanje željeza u jetri i inhibira njegov toksičan učinak na hepatocite kod fibroze jetre uzrokovane preopterećenjem željezom (132, 133). Predloženi mehanizmi uključuju njegovo antioksidativno, protuupalno i anti-apoptotičko djelovanje te regulaciju homeostaze željeza inhibicijom ekspresije proteina povezanih s unosom željeza, kao što su DMT-1 i TfR-2, te poticanjem ekspresije proteina za izlučivanje željeza, FPN 1 (133).

1.2. ERITROPOEZA

1.2.1. Osovina eritropoetin-eritroferon-hepcidin

Proces eritropoeze složen je mehanizam koji uključuje prijenos stanica iz žumanjčane vreće u fetalnu jetru, a zatim u koštanu srž tijekom embrionalnog razvoja. U koštanoj srži, eritroidne progenitorske stanice prolaze kroz nekoliko faza kako bi stvorile retikulocite koji ulaze u krvotok (134). Mehanizam sazrijevanja eritroidne loze iz multipotentnih hematopoetskih matičnih stanica još uvijek je nepotpun, ali poznato je da ključni eritroid-specifični transkripcijski čimbenici igraju presudnu ulogu u usmjeravanju transkripcije stanica eritroidne loze (135). Zadnja faza eritropoeze je sazrijevanje retikulocita u eritrocite koji dobivaju bikonkavni oblik te cirkuliraju kroz krvotok dok ih ne uklone makrofazi unutar retikuloendotelnog sustava (136). Proces eritropoeze najveći je potrošač željeza u tijelu, a u

eritrocitima se nalazi dvije trećine od ukupne količine željeza u tijelu (137). Eritropoezu reguliraju različiti čimbenici, pri čemu eritropoetin (EPO), hormon kojeg sintetiziraju bubrezi, potiče proces mobilizacije željeza, dok hepcidin taj proces inhibira (134). Eritropoetin je glikoprotein koji se proizvodi u peritubularnim stanicama bubrega, dok se kod fetusa proizvodi u hepatocitima (138). Potiče eritropoezu vezanjem na EPO receptor (EPOR) na prekursorima eritroidnih stanica što pospješuje njihov opstanak, diobu i diferencijaciju (139). Njegova primarna funkcija je regulacija isporuke kisika perifernim tkivima, a to se postiže induciranjem transkripcije EPO gena u uvjetima hipoksije odnosno „stresne eritropoeze“ (140). Transkripcijski faktor hipoksijom inducirani faktor (HIF, engl. *hypoxia inducible factor*), ključni je posrednik stanične prilagodbe na hipoksiju, izravno regulira sintezu EPO u bubrezima i jetri tijekom anemije, te je također smatran potencijalnim neizravnim regulatorom transkripcije hepcidina (137, 141). Kao odgovor na sintetizirani EPO, eritroidni prekursori u koštanoj srži i slezeni stvaraju proteinski hormon eritroferon (ERFE) koji u cirkulaciji djeluje na hepatocite i suprimira proizvodnju hepcidina te pospješuje apsorpciju željeza i sintezu novih eritrocita (142) (slika 8). EPO također djeluje i citoprotektivno na ne-eritroidne stanice kao što su beta-stanice gušterače odgovorne za proizvodnju inzulina. Na animalnim modelima pokazano je kako EPO svojim antiapoptotskim, proliferativnim, protuupalnim i angiogenim učincima unutar stanica štiti protiv nastanka i progresije šećerne bolesti tipa 1 i šećerne bolesti tipa 2 (143).



Slika 8. Mehanizam djelovanja eritroferona (autorska slika).

ERFE djeluje izravno na jetru smanjujući sintezu hepcidina te se smatra glavnim eritroidnim regulatorom hepcidina (134, 144). Za razliku od EPO koji može stimulirati eritropoezu i u uvjetima homeostaze kao i u uvjetima stresa, ERFE djeluje samo u uvjetima „stresne eritropoeze“ (134).

Pokazano je da bi ERFE mogao biti koristan biomarker neučinkovite eritropoeze npr. kod β -talasemije ili mijelodisplastičnog sindroma kada nezreli eritroidni prekursori proizvode velike količine ERFE koji kronično suprimira hepcidin i dovodi do preopterećenja željezom (144). Također, u slučajevima anemije koja se razvija tijekom infekcija zbog bubrežne hipoksije povećavaju se koncentracije EPO i ERFE što osigurava i štiti od anemije, ali potencijalno može osigurati više željeza i za siderofilne patogene (145, 146).

Eritropoeza je također stimulirana pod utjecajem drugih puteva osim EPO–EPOR. Eritroidni progenitori izražavaju receptore za čimbenik rasta matičnih stanica (SCF, engl. *stem cell factor*), inzulinu sličan čimbenik rasta (IGF 1, engl. *insulin-like growth factor 1*) i inzulin. Nakon EPO-a, drugi najvažniji signalni sustav za eritropoezu uključuje SCF koji ima sposobnost stimuliranja proliferacije multipotentnih hematopoetskih progenitora, ali je također učinkovit u podržavanju eritroidnih progenitora, djelujući sinergistički s EPO-om (135).

1.3. BIOLOŠKI UČINCI VINA

Mediteranska prehrana smatra se jednim od najzdravijih prehrambenih obrazaca na svijetu dokazano koristan u prevenciji i kontroli nezazarnih bolesti povezanih s prehranom kao što su šećerna bolest i kardiovaskularne bolesti (147). Umjerena konzumacija vina dio je mediteranske prehrane te obuhvaća pojam „mediteranskog načina pijenja“, što podrazumijeva redovitu umjerenu konzumaciju vina uz jelo, do dvije čaše vina dnevno za muškarca i jednu čašu vina za ženu (148). Takav način pijenja može pridonijeti ukupnim korisnim učincima mediteranske prehrane, a bez značajnog povećanja ukupnog rizika za zdravlje povezanog s alkoholom, uključujući i nastanak malignih bolesti (149, 150).

1.3.1. Biološki učinci vina u kardiovaskularnom sustavu

Vino je složena smjesa koja se sastoji uglavnom od vode i etilnog alkohola, uz prisutnost različitih molekula poput polifenola, organskih kiselina, minerala, vitamina i drugih biološki aktivnih spojeva (151). Umjerena konzumacija vina dovodi do smanjenja rizika od koronarne srčane bolesti kroz promjene u koncentracijama kolesterola, lipoproteina visoke gustoće (HDL, engl. *high-density lipoprotein*), apolipoproteina A1, lipoproteina (a), triglicerida, aktivnosti aktivatora tkivnog plazminogena, inzulina i glukoze (152–154). Nealkoholni sastojci vina mogu nadvladati prooksidativna svojstva alkohola te značajno inhibirati oksidaciju lipoproteina niske gustoće (LDL, engl. *low-density lipoprotein*) koji imaju važnu ulogu u patogenezi nastanka aterosklerotske bolesti (155, 156). Polifenoli su najzastupljeniji antioksidansi u prehrani te se u velikoj količini nalaze i u vinu, naročito crnom, što pridonosi njegovoj protektivnoj ulozi protiv degenerativnih i kardiovaskularnih bolesti (157, 158). Brojna istraživanja pokazala su protektivnu ulogu velikog broja fenolnih spojeva iz crnog vina, kao što su resveratrol, katehin, epikatehin, kvercetin te antocijani. Posebno je isticana djelotvornost resveratrola u prevenciji koronarne bolesti srca (159). Mehanizmi koji su odgovorni za njegove moguće kardioprotektivne učinke uključuju povoljne promjene u lipidnim profilima, smanjenje inzulinske rezistencije i smanjenje oksidativnog stresa LDL-a (160). U pretkliničkim istraživanjima dokazano je da su resveratrol i flavonoidi učinkovito smanjivali krvni tlak, poboljšavali funkciju krvnih žila te smanjivali hipertrofiju i remodeliranje lijeve klijetke, uz poboljšanje njezine funkcije (161). Nadalje, umjerena konzumacija vina u prehrani bogatoj masnoćama ili mediteranskoj prehrani povećava antioksidativni kapacitet plazme, smanjuje oksidativna oštećenja DNK i normalizira funkciju endotela (162–164). U patogenezi raznih bolesti ključnu ulogu ima endotelna disfunkcija koja je povezana s oksidativnim stresom i

aterogenezom. Polifenoli iz crnog vina to sprječavaju djelujući antioksidativno i protektivno na dušikov oksid (NO) koji je glavni vazodilatator krvnih žila i regulator normalne endotelne funkcije (165). Važno je naglasiti da je učinak polifenola kao kemijskih antioksidansa koji „hvataju“ slobodne radikale, zanemariv na sistemskoj razini. Glavni antioksidativni mehanizam polifenola iz hrane, pa tako i iz vina, je da njihovim metabolizmom u stanici nastaju oblici koji aktiviraju signalne puteve za indukciju enzimskih antioksidativnih sustava koji su primarni fiziološki obrambeni sustav protiv oksidativnog stresa (166, 167). Na taj način polifenoli doprinose prevenciji od hipertenzije, moždanog udara, ishemijske bolesti srca i srčanog zatajenja (168). Nadalje, pokazano je da polifenoli djeluju na smanjenje vrijednosti visokoosjetljivog C-reaktivnog proteina (hs-CRP) koji se pokazao kao važan prediktor razvoja kardiovaskularnih i koronarne bolesti (169, 170).

1.3.2. Biološki činci vina u šećernoj bolesti tipa 2

Pokazano je kako umjerena konzumacija vina kod osoba s dobro kontroliranom ŠBT2 djeluje povoljno na promjene kao što su oscilacije srčanog ritma te formiranje karotidnih plakova (171). Istraživanja provedena na dijabetičarima pokazale su da su pri umjerenj konzumaciji crnog vina, kao važnog sastojka mediteranske prehrane, porasle razine HDL kolesterola i apolipoproteina(a)1 dok se omjer ukupnog kolesterola i HDL kolesterola smanjio (158, 172). Također, umjerena konzumacija crnog vina, u kombinaciji sa zdravom prehranom, imala je povoljne učinke na centralnu debljinu i distribuciju abdominalne masti kod osoba sa ŠBT2 (173).

Nadalje, umjerena konzumacija alkohola, posebice vina, kod osoba sa ŠBT2, bila je povezana sa smanjenim rizikom od kardiovaskularnih događaja, mikrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti i sveukupne smrtnosti (174). Naime, povećano nakupljanje 3-nitrotirozina i poliADP-riboziliranih proteina u tkivima dijabetičara povezano je s komplikacijama šećerne bolesti kao što su dijabetička neuropatija, nefropatija i retinopatija (175). Također, umjerena konzumacija alkohola ima zaštitni učinak kada govorimo općenito o razvoju ŠBT2 kod muškaraca i žena, pri čemu je u žena zabilježen izraženiji protektivni učinak (176–178). Tijekom posljednjih desetak godina, nekoliko epidemioloških istraživanja pokazalo je kako je umjerena konzumacija crnog vina, definirana kao pijenje jednog pića dnevno za žene i do dva pića dnevno za muškarce, povezana s nižim rizikom od razvoja ŠBT2, pri čemu važnu ulogu imaju flavonoidni polifenoli prisutni u crnom vinu (179). Budući da je glavno obilježje šećerne bolesti višak glukoze koji dovodi do stvaranja ROS, predloženi mehanizam učinka crnog vina je već spomenuti antioksidativni učinak polifenola (180). Kod dijabetičara slobodni

kisikovi radikali također smanjuju razinu antioksidansa u krvi, povećavaju oksidaciju LDL-a i aktiviraju sustav zgrušavanja krvi te je kod takvih pacijenata pokazano kako umjerena konzumacija crnog vina uz obrok značajno čuva razinu antioksidansa u plazmi, smanjuje oksidaciju LDL-a i sprječava proces aktivacije trombocita (181).

1.4. ŠEĆERNA BOLEST TIP 2

1.4.1. Definicija i klasifikacija šećerne bolesti

Šećernu bolest možemo definirati kao skupinu metaboličkih bolesti karakteriziranih hiperglikemijom koja je posljedica poremećaja lučenja inzulina, djelovanja inzulina ili kombinacije navedenih poremećaja (182).

Šećerna bolest tipa 1 (ŠBT1) nastaje zbog autoimune destrukcije beta-stanica Langerhansovih otočića gušterače, što obično dovodi do apsolutnog nedostatka inzulina.

Šećernu bolest tipa 2 (ŠBT2) karakterizira progresivni gubitak odgovarajućeg lučenja inzulina iz beta-stanica, često u podlozi čega je inzulinska rezistencija.

Osim ovih tipova, postoje i specifični oblici šećerne bolesti uzrokovani drugim čimbenicima, poput monogenских sindroma (neonatalni dijabetes, MODY), šećerna bolest uzrokovana bolestima gušterače (cistična fibroza, pankreatitis), šećerna bolest inducirana lijekovima ili kemikalijama te postransplantacijski dijabetes.

Gestacijski dijabetes je specifični oblik šećerne bolesti, a odnosi se na stanje hiperglikemije utvrđeno u drugom ili trećem tromjesečju trudnoće koje nije bilo prisutno prije trudnoće uz isključenje drugih oblika šećerne bolesti u trudnoći (183).

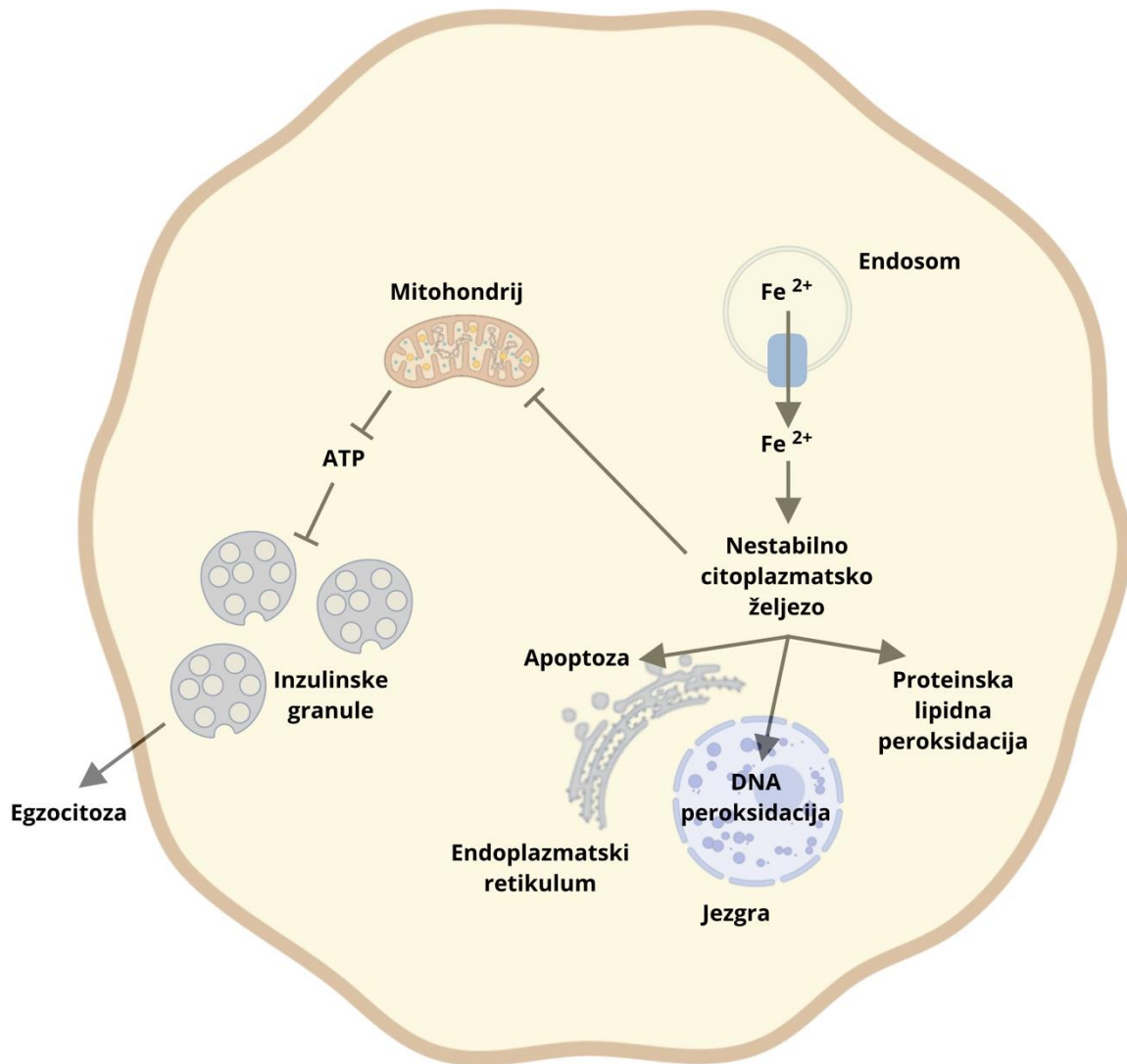
1.4.2. Patogeneza šećerne bolesti tipa 2

ŠBT2 globalna je javnozdravstvena kriza koja je potaknuta brзом urbanizacijom, konzumacijom visokokalorične hrane i sve prisutnijim sjedilačkim načinom života, te je njena učestalost porasla zajedno s globalnim porastom pretilosti (184,185). Patogeneza ŠBT2 je multifaktorska jer njenom nastanku pogoduje međusobno djelovanje okolišnih, genetskih i metaboličkih čimbenika (186). Temelj ove bolesti čine inzulinska rezistencija i disfunkcija beta-stanica gušterače koje zajedno doprinose nastanku hiperglikemije. DeFronzo predlaže višestruki pristup razumijevanju patogeneze ŠBT2, naglašavajući međusobnu povezanost različitih metaboličkih poremećaja. U središtu njegova razmatranja je teorija tzv. „zlokobnog okteta“ (engl. "*Ominous Octet*"), koja naglašava osam ključnih patofizioloških mehanizama koji pridonose hiperglikemiji i razvoju ŠBT2. To su inzulinska rezistencija u skeletnim

mišićima, jetri i masnom tkivu, oštećena sekrecija inzulina iz beta-stanica gušterače, povišena sekrecija glukagona iz alfa-stanica gušterače, povećana proizvodnja glukoze u jetri (glukoneogeneza), disfunkcija neurotransmitera i inzulinska rezistencija u mozgu, pojačana lipoliza, smanjeni inkretinski učinak u tankom crijevu te povećana reapsorpcija glukoze u bubrezima (187, 188).

1.4.3. Željezo u patogenezi šećerne bolesti tipa 2

Visoka razina željeza predstavlja čimbenik rizika za nastanak ŠBT2 i utječe na glavne karakteristike bolesti kao što su smanjeno lučenje inzulina, inzulinska rezistencija i povećana glukoneogeneza u jetri (189). Dakle, višak slobodnog željeza je toksičan, no istovremeno je željezo neophodno za normalnu funkciju beta-stanica gušterače i time za održavanje ravnoteže glukoze. U patogenezi šećerne bolesti željezo putem Fentonove reakcije stvara ROS koji mogu izazvati oksidativna oštećenja i apoptozu beta-stanica gušterače (190). Također, prekomjerne razine ROS i nakupljenog željeza zbog preopterećenja željezom uzrokuju disfunkciju mitohondrija, smanjujući razinu staničnog adenozin trifosfata i ekspresiju citokrom c oksidaze III, što povećava glukoneogenezu u jetri (191). Pacijenti s nasljednom hemokromatozom i prekomjernim nakupljanjem željeza često imaju šećernu bolest ili poremećenu toleranciju glukoze (192). Povišene razine feritina, bez viška toksičnog željeza, također pokazuju povezanost s inzulinskom rezistencijom (193). To je podržano činjenicom kako kod osoba sa ŠBT2 koji imaju povišene serumske razine feritina, smanjenje razine željeza putem flebotomije ili kelacije poboljšava glikemijsku kontrolu i smanjuje inzulinsku rezistenciju (194). Nadalje, sustavni pregled radova je pokazao kako je povišeni serumski feritin jedan od čimbenika rizika za ŠBT2, dok je omjer topljivog sTfR i feritina obrnuto proporcionalan riziku od razvoja ŠBT2 (195). Danas se ferroptaza, oblik regulirane stanične smrti ovisan o željezu, sve više prepoznaje kao važan proces u posredovanju patogeneze i progresije ŠBT2. Dokazano je kako ferroptaza u beta-stanicama gušterače dovodi do smanjenog izlučivanja inzulina, dok ferroptaza u jetri, masnom tkivu i mišićima izaziva inzulinsku rezistenciju (196). Uredna homeostaza željeza u beta-stanicama gušterače igra važnu ulogu, a prekomjerno nakupljanje željeza može dovesti do oksidativnog stresa koji pogoršava njihovu funkciju i doprinosi smanjenju stvaranja i lučenja inzulina (197) (slika 9).

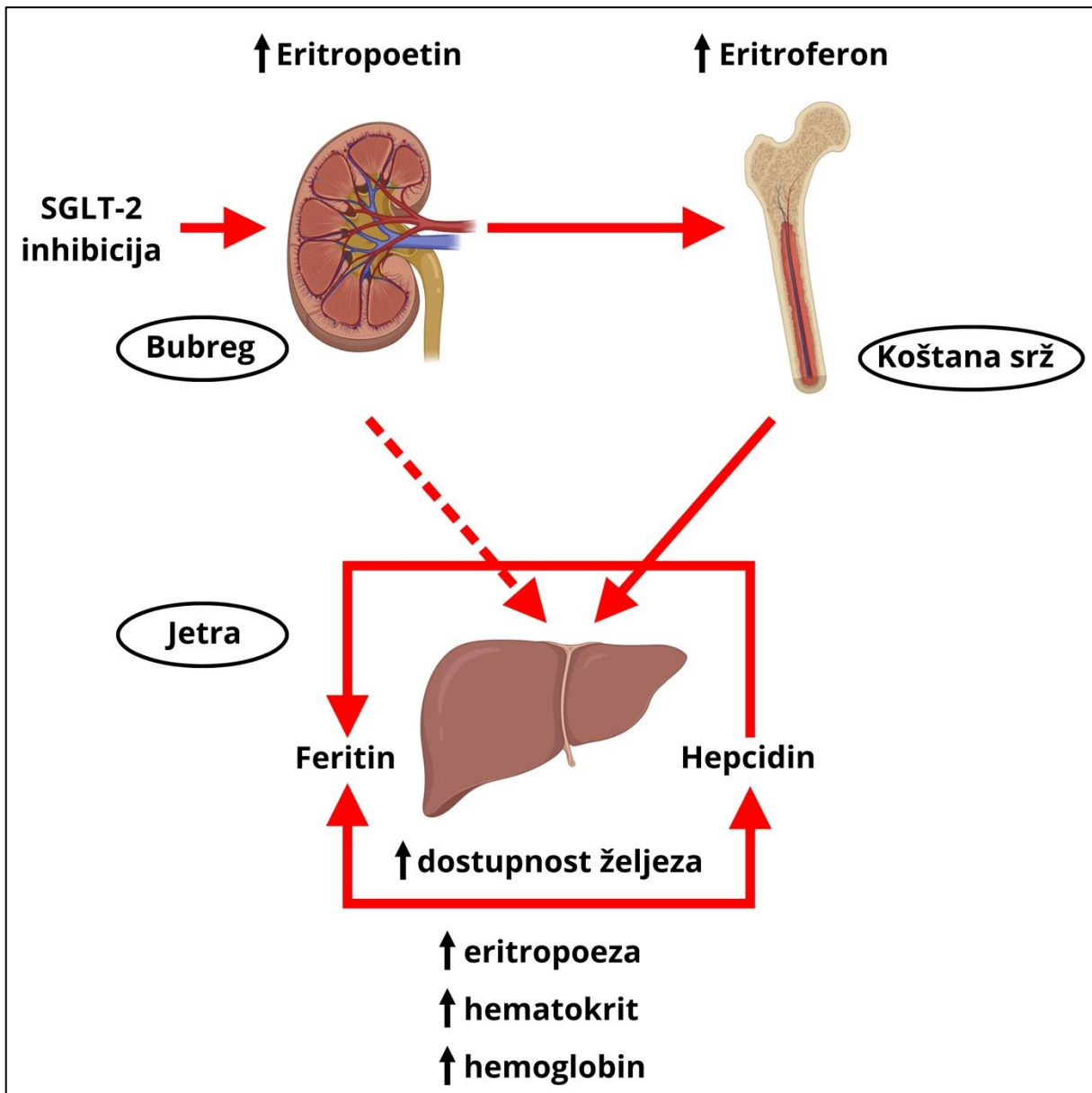


Slika 9. Utjecaj nestabilnog citoplazmatskog željeza na funkciju beta-stanice gušterače (autorska slika).

1.4.4. Učinak antihiperглиkemijskih lijekova na homeostazu željeza

Osobe sa ŠBT2 uglavnom u svrhu kontrole glikemije koriste različite skupine antihiperглиkemijskih lijekova kao što su metformin, inhibitori dipeptidil peptidaze 4 (DPP-4 inhibitori; engl. *dipeptidyl peptidase-4 inhibitor*) ili inhibitori suprijenosnika natrija i glukoze 2 (inhibitori SGLT2; engl. *sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors*). Što se tiče njihova utjecaja na homeostazu željeza pokazano je kako u populaciji osoba sa ŠBT2 uporaba peroralnih antihiperглиkemika snižava razine hepcidina i feritina (198). U drugom istraživanju u kojem je ispitivan utjecaj metformina na razine hepcidina, pokazano je kako je hepcidin niži u osoba sa ŠBT2, ali metformin nema utjecaj na njegovo sniženje (199). U okviru ovog podnaslova posebno valja istaknuti vrlo važno istraživanje u kojem je kod osoba liječenih

inhibitorom SGLT2, dapagliflozinom, došlo do značajnog pada razine cirkulirajućeg hepcidina i feritina uz zabilježen porast hematokrita te povećanje razina eritropoetina, eritroferona, transferina i pojačane ekspresije transferinskih receptora 1 i 2 (200) (slika 10). Podaci iz randomiziranih kliničkih ispitivanja na velikom broju ispitanika sa zatajivanjem srca pokazali su pojačan eritropoetski učinak i smanjenu sintezu hepcidina u skupinama ispitanika koje su bile liječene inhibitorima SGLT2, empagliflozinom i dapagliflozinom (201,202).



Slika 10. Predloženi mehanizam djelovanja SGLT2 inhibitora na eritropoezu (autorska slika).

2. CILJEVI I HIPOTEZE

S obzirom na opisane fiziološke učinke hepcidina kao i njegovu potencijalnu ulogu u patofiziologiji ŠBT2, glavni cilj našeg istraživanja bio je ispitati učinak umjerene konzumacije crnog vina na serumske koncentracije hepcidina u skupini zdravih ispitanika i u skupini ispitanika sa ŠBT2. Kako je hepcidin najvažniji čimbenik regulacije metabolizma željeza, u ovom istraživanju također je ispitan učinak umjerene konzumacije vina i na druge pokazatelje homeostaze željeza. Budući da je eritropoeza dominantni potrošač željeza kod ljudi, ispitao se učinak umjerene konzumacije crnog vina na glavni eritropoetski put eritropoetin-eritroferon-hepcidin.

2.1. Glavni ciljevi istraživanja

1. Istražiti učinak trotjedne umjerene konzumacije crnog vina na serumsku koncentraciju hepcidina u zdravih osoba i u bolesnika sa ŠBT2.
2. Istražiti učinak trotjedne umjerene konzumacije crnog vina na biokemijske pokazatelje statusa željeza (serumsko željezo, feritin, transferin, TIBC, UIBC, saturacija transferina, sTfR) u zdravih osoba i u bolesnika sa ŠBT2.
3. Istražiti učinak umjerene konzumacije crnog vina na pokazatelje eritropoeze (EPO, ERFE) u zdravih osoba i u bolesnika sa ŠBT2.
4. Istražiti postoji li razlika u promjenama koncentracija hepcidina u skupini ispitanika sa ŠBT2 ovisno jesu li liječeni samo metforminom ili kombinacijom metformina s drugim antihiperглиkemijskim lijekovima.

2.2. Sporedni ciljevi istraživanja:

1. Istražiti učinak trotjedne umjerene konzumacije crnog vina na hematološke i eritrocitne pokazatelje (hemoglobin, hematokrit, eritrociti, MCV, MCH, MCHC, RDW, retikolociti) u zdravih osoba i u bolesnika sa ŠBT2.
2. Istražiti učinak trotjedne umjerene konzumacije crnog vina na biokemijske pokazatelje funkcije bubrega (ureja, kreatinin), pokazatelje funkcije jetre (aminotransferaze, albumin, bilirubin) i upalne pokazatelje (hsCRP) u zdravih osoba i u bolesnika sa ŠBT2.
3. Istražiti učinak trotjedne umjerene konzumacije crnog vina na pokazatelje glikemijske kontrole (glukoza u plazmi, glikirani hemoglobin, fruktozamin) u bolesnika sa ŠBT2.

2.3. Hipoteze istraživanja:

1. Trotjedna umjerena konzumacija crnog vina će smanjiti serumske koncentracije hepcidina u zdravih osoba i u bolesnika sa ŠBT2.
2. Trotjedna umjerena konzumacija crnog vina će smanjiti serumske koncentracije feritina u zdravih osoba i u bolesnika sa ŠBT2, usporedo sa smanjenem razine hepcidina.
3. Trotjedna umjerena konzumacija crnog vina će povisiti serumske koncentracije željeza i utjecati na druge biokemijske pokazatelje statusa željeza u zdravih osoba i u bolesnika sa ŠBT2.
4. Trotjedna umjerena konzumacija crnog vina će povisiti serumske koncentracije pokazatelja eritropoeze (EPO, ERFE) u zdravih osoba i u bolesnika sa ŠBT2.
5. Promjene serumske koncentracije hepcidina nakon intervencije s crnim vinom se neće razlikovati između ispitanika sa ŠBT2 ovisno o tome uzimaju li samo metformin ili kombinaciju metformina s drugim antihiperглиkemijskim lijekovima.

3. ISPITANICI I POSTUPCI

Ovo istraživanje je osmišljeno i provedeno u Zavodu za temeljnu i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Istraživanje je bilo u skladu s Helsinškom deklaracijom i njezinim amandmanima te je bilo odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu (br. 2181-198-03-04-13-0042). Svi ispitanici su prije uključivanja u istraživanje informirani o postupcima i ciljevima istraživanja. Potpisali su, potom, informirani pristanak i dali svoju suglasnost za prikupljanje uzoraka i njihovu analizu, te korištenje dobivenih podataka i njihovu objavu. Osobe koje su sudjelovale u ovom istraživanju jamčile su za sigurnost i tajnost svih podataka. Svi prikupljeni podaci su korišteni isključivo u istraživačke svrhe, bez navođenja bilo kakvih osobnih podataka o ispitanicima.

3.1. Ispitanici

Pretraživanje i probir (screening) potencijalnih zdravih ispitanika te ispitanika sa ŠBT2 provedeni su u odabranim ordinacijama obiteljske medicine u gradu Splitu i bližoj okolici te u dijabetološkoj ambulanti Zavoda za endokrinologiju, dijabetologiju i bolesti metabolizma Kliničkog bolničkog centra Split (KBC Split). Uključivanje ispitanika u istraživanje provedeno je u Zavodu za temeljnu i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Splitu.

Uključujući kriteriji za skupinu zdravih ispitanika i skupinu ispitanika sa ŠBT2 bili su sljedeći:

1. muški spol
2. dob od 40 do 65 godina
3. indeks tjelesne mase manji od 35 kg/m² (ITM < 35 kg/m²),
4. nepušenje
5. davanje suglasnosti za provođenje svih postupaka predviđenih dizajnom i protokolom istraživanja

Isključujući kriteriji za skupinu zdravih ispitanika i skupinu ispitanika sa ŠBT2 bili su sljedeći:

1. poznata/utvrđena aterosklerotska kardiovaskularna bolest
2. venski tromboembolizam u povijesti bolesti
3. trenutačni simptomi ili dokazi stanja akutne ili kronične upalne ili infektivne bolesti
4. bolest jetre
5. aktivna maligna bolest ili maligna bolest u povijesti bolesti
6. disregulacija homeostaze željeza (anemija, hemokromatoza)

7. prethodna zlouporaba alkohola ili drugih sredstava ovisnosti
8. uvođenje novog farmakološkog sredstva, odnosno lijeka za vrijeme trajanja istraživanja

Nakon provedenog postupka probira ispitanika detaljno su ispitani uključujući i isključujući kriteriji te je u istraživanje uključeno ukupno 36 ispitanika, od toga 15 zdravih ispitanika te 21 ispitanik s dijagnozom ŠBT2. Svakom ispitaniku je pomno objašnjeno o kakvom se istraživanju radi i što ono uključuje te je svaki ispitanik dobrovoljno pristupio istraživanju uz potpisan informirani pristanak. Svi su ispitanici kod uključivanja u istraživanje bili dobrog općeg zdravstvenog stanja te bez akutnih bolesti i infekcija. Zdravi ispitanici su bili dobrog općeg zdravstvenog stanja, anamnestičkim propitivanjem bez značajnijih ranijih i bez kroničnih bolesti te s izmjerenim vrijednostima glukoze u plazmi natašte manjim ili jednako 6,9 mmol/L ($GUP \leq 6,9$ mmol/L). Ispitanici s dijagnozom ŠBT2 bili su pogodni za uključivanje u istraživanje ako su imali zadovoljavajuće kontroliranu glikemiju s izmjerenim vrijednostima glikiranog hemoglobina manjim od 7,5% ($HbA1c < 7,5\%$) uz terapiju metforminom ili kombinacijom metformina s drugim antihiperглиkemijskim lijekovima ili inzulinom.

3.2. Postupci

3.2.1 Anamnestičko ispitivanje

Iz dostupne medicinske dokumentacije te iz razgovora s ispitanicima, prikupljeni su relevantni osobni podaci, anamnestički podatci o ranijim bolestima ili operacijama. Kod ispitanika sa ŠBT2 je propitano postojanje drugih bolesti i kroničnih komplikacija šećerne bolesti te je bila popisana sva kronična terapija. Ispitane su funkcionalne sposobnosti svih ispitanika, podnošenje tjelesnog napora i navike provođenja tjelesne aktivnosti. Također su ispitane prehrambene navike ispitanika i navike pijenja alkoholnih pića.

3.2.2. Antropometrijska mjerenja

Antropometrijska mjerenja uključila su mjerenje tjelesne mase i tjelesne visine. Na baždarenom stadiometru određena je visina, a pomoću baždarene vage izmjerena je tjelesna masa. Također, učinjeno je računanje indeksa tjelesne mase (ITM) dijeljenjem vrijednosti tjelesne mase (kg) s kvadriranom vrijednosti visine (m^2). Uz pomoć neelastične trake izmjereni su opsezi struka, bokova, vrata i nadlaktice. Ispitanici su prilikom mjerenja stajali uspravno, gledajući prema naprijed, opuštenih mišića ramenog obruča. Obujam nadlaktice mjeren je na nedominantnoj ruci, na polovici udaljenosti između ramena i lakta na srednjoj točki između akromiona i olekranona. Obujam struka mjeren je na srednjoj udaljenosti između donjeg ruba

rebrenog luka te gornjeg ruba grebena ilijačne kosti. Obujam bokova mjeren je na najširem dijelu bokova. Po završetku uključivanja, zdravi ispitanici su bili usklađeni po dobi i ITM s ispitanicima sa ŠBT2. Antropometrijska mjerenja i mjerenja arterijskog tlaka su bila provedena na kraju uvodnog razdoblja te u danu nakon razdoblja trotjedne intervencije s pijenjem crnog vina.

3.2.3. Protokol intervencije – trotjedna umjerena konzumacija crnog vina

Ispitanicima je bilo određeno uvodno razdoblje od dva tjedna u kojem je konzumacija bilo kojeg alkoholnog pića bila zabranjena (engl: *wash out period*). Na kraju uvodnog razdoblja svim ispitanicima urađeno je antropometrijsko mjerenje te su uzeti uzorci krvi za predviđenu laboratorijsku analizu. Potom, je svakom ispitaniku podijeljeno po 9 standardnih vinskih boca od 750 ml crnog vina proizvedenog od hrvatske autohtone crne sorte Plavac mali (*Vitis vinifera L.*). Ispitanicima iz obje skupine bilo je određeno piti 300 ml crnog vina dnevno tijekom slijedeća 3 tjedna. Navedena dnevna količina crnog vina se morala ravnomjerno raspodijeliti između ručka i večere te konzumirati uz obrok. Ispitanicima su date upute i preporuka održavanja ujednačenog načina prehrane, kao i drugih životnih navika, uključujući tjelesnu aktivnost, tijekom uvodnog razdoblja i tijekom razdoblja intervencije. U svrhu navedenog svima su podijeljeni dnevници prehrane u koje su ispitanici morali opisati vrstu hrane i okvirnu količinu sastojaka u svakom obroku koji su imali. Trebali su bilježiti vrijeme i količinu konzumiranog istraživanog vina. Također su bilježili količine popijene vode i nealkoholnih pića te su morali navesti razdoblja i intezitet tjelesne aktivnosti. Nakon razdoblja intervencije svim ispitanicima su uzeti uzorci krvi natašte za analizu te su provedena antropometrijska mjerenja. Vino korišteno u istraživanju je proizvedeno i pakirano 2016. godine u vinariji Volarević.

Ispitanici sa ŠBT2 su za vrijeme istraživanja trebali nastaviti uzimati svoju antihiperglikemijsku terapiju, bilo da su uzimali samo metformin ili su uzimali metformin u kombinaciji s drugim antihiperglikemijskim lijekovima iz različitih skupina (suflonilureja, inhibitor DPP-4, inhibitor SGLT2, bazalni inzulinski analog).

Prije uvodnog razdoblja jedan ispitanik iz skupine zdravih je isključen iz istraživanja zbog povišenih vrijednosti glikemije natašte, a dva ispitanika iz skupine sa ŠBT2 su isključena jer nisu imali zadovoljavajuću regulaciju glikemije određenu dizajnom istraživanja. Dva ispitanika su morali prekinuti svoje sudjelovanje u istraživanju tijekom razdoblja intervencije, jedan ispitanik iz skupine zdravih zbog produljenog febrilnog stanja te jedan ispitanik iz

skupine sa ŠBT2 zbog nepodnošenja vina. Ukupno 31 sudionik ispunio je predviđeni protokol istraživanja: 13 zdravih ispitanika i 18 ispitanika sa ŠBT2. (slika 11.)

3.2.4. Uzorkovanje krvi i laboratorijska analiza uzoraka

Uzorci krvi natašte uzeti su rano ujutro i, ovisno o vrsti laboratorijskih pokazatelja, analizirani su isti dan ili su bili pohranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ za kasniju analizu. Kako bi se spriječio mogući utjecaj dnevnih fluktuacija razine hepcidina u serumu, vrijeme prikupljanja krvi je standardizirano (203). Korištena su tri tipa vakutainera: (1) s K_3EDTA , za određivanje kompletne krvne slike i HbA1c, (2) s fluoridom/EDTA, za procjenu koncentracije glukoze u plazmi natašte, i (3) sa silicijevim dioksidom (aktivator ugrušaka)/gelom, za odvajanje seruma potrebnog za analizu pokazatelja funkcije jetre i bubrega, upale i serumskih pokazatelja statusa željeza (UIBC, TIBC, željezo, EPO, ERFE, hepcidin, feritin, sTfR) te kontrole glikemije (fruktozamin). Razine sTfR, koji odražavaju dostupnost funkcionalnog željeza, bili su izmjereni nefelometrijskom metodom na BN ProSpec analizatoru (Siemens, ProSpec, Erlangen, Njemačka). Hepcidin u serumu je kvantificiran prema uputama proizvođača u komercijalno dostupnom kompetitivnom ELISA testu [Hepcidin 25 (bioaktivni) HS, DRG Instruments GmbH, Marburg, Njemačka]. Koncentracije EPO i ERFE su izmjerene komercijalno dostupnim ELISA testovima: Quantikine® IVD® ELISA za ljudski eritropoetin (R& D Systems Inc) i intrinzični eritroferon IE TM ELISA (Intrinsic LifeSciences). Analiza je provedena prema uputama proizvođača.

Sva uzorkovanja krvi i mjerenja su obavljena u Laboratoriju za eksperimentalnu farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu te u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Split.

3.2.5. Statistička analiza podataka

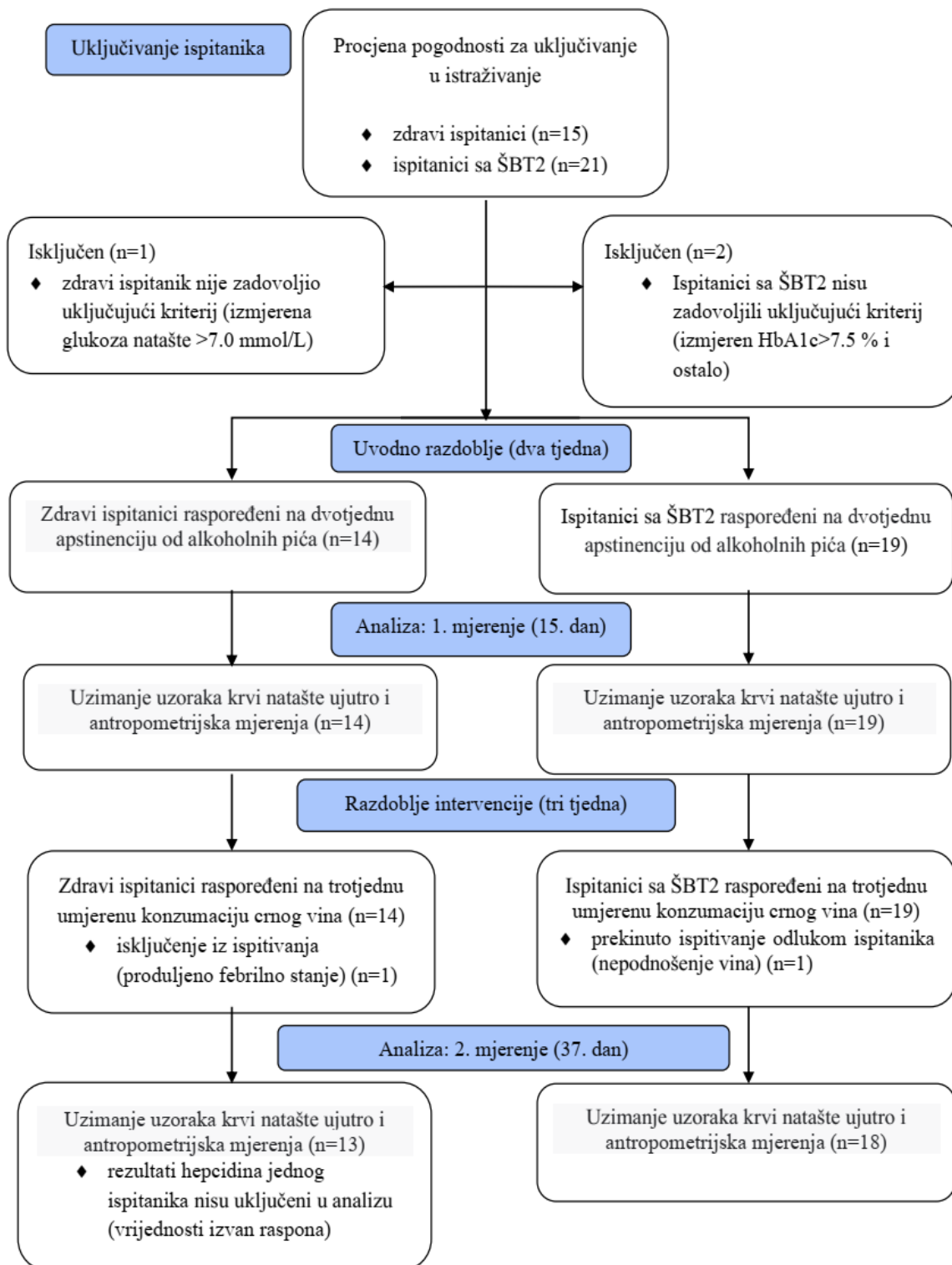
Ovisno o tome je li distribucija vrijednosti bila normalna ili ne, podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD) ili medijan s 95% intervalom pouzdanosti (CI). Normalnost distribucija provjerena je pregledom Q-Q dijagrama i uporabom Shapiro-Wilkovog testa. Usporedbe unutar grupe prije i poslije intervencije provedene su korištenjem Studentovog t-testa uparenih uzoraka ili njegovog neparametarskog ekvivalenta – Wilcoxonovog testa rangova s predznakom. Usporedbe između grupa napravljene su korištenjem Studentovog t-testa za neovisne uzorke ili njegovog neparametarskog ekvivalenta – Mann-Whitneyjevog testa. Usporedba apsolutnih vrijednosti parametara između skupina provedena je samo za

antropometrijska mjerenja prije intervencije. Svi ostali testovi između skupina uspoređivali su samo veličinu odgovora izazvanog liječenjem. *P*-vrijednosti niže od 0,05 smatrane su statistički značajnim. Za statističke analize i vizualizaciju podataka korišten je R programski jezik za statističko računalstvo verzija 4.2.1.

3.2.6 Izračun veličine uzorka

Veličina potrebnog uzorka izračunata je na temelju rezultata promjene serumske koncentracije hepcidina iz vlastitog pilot istraživanja. Minimalna veličina uzorka izračunata je pomoću internetskog kalkulatora *Sample Size Calculator for Comparing Paired Differences* (dostupno na adresi <https://statulator.com/SampleSize/ss2PM.html#>).

Veličina uzorka izračunata je uzimajući u obzir očekivanu varijabilnost glavne mjere ishoda (serumska koncentracija hepcidina) prije i nakon intervencije, a na temelju podataka iz prethodno napravljenog pilot-istraživanja koje je uključivalo 7 ispitanika sa ŠBT2 te 7 zdravih ispitanika. Na temelju izračunate aritmetičke sredine i standardne devijacije razlika koncentracija hepcidina prije i nakon intervencije izračunata je potrebna veličina uzorka u obje skupine. Za snagu testa od 80% (beta pogreška od 0,2) s alfa pogreškom od 0,05 (dvokračno) za prepoznavanje značajne razlike, potreban je minimalni broj od 8 ispitanika u skupini zdravih i 13 ispitanika u skupini sa ŠBT2.



Slika 11. Hodogram istraživanja

4. REZULTATI

4.1. Osnovne i antropometrijske karakteristike ispitanika

Osnovne antropometrijske karakteristike svih ispitanika mjereno na početku istraživanja i neposredno prije intervencije prikazani su u **Tablici 1**.

Tablica 1. Osnovne i antropometrijske karakteristike ispitanika (početne vrijednosti prije intervencije)

Parametar	Zdravi (n = 13)	ŠBT2 (n = 18)	P-vrijednost
Dob [godine]	50,5 ± 5,9	54,6 ± 6,2	0,075
Dob početka ŠBT2 [godine]	N/A	50,6 ± 6,7	N/A
Tjelesna masa [kg]	100,3 (84,7-105,5)	98,5 (87,2-107,0)	0,617
Visina [cm]	186,8 ± 5,6	184,5 ± 10,1	0,427
Opseg struka [cm]	106,0 (95,8-109,5)	107,0 (98,8-112,4)	0,458
Opseg kukova [cm]	108,0 ± 5,6	105,0 ± 7,5	0,237
Opseg nadlaktice [cm]	35,2 ± 2,9	32,2 ± 3,4	0,015*
Opseg vrata [cm]	42,0 (40,3-44,0)	38,5 (37,0-41,2)	0,051
ITM [kg/m ²]	27,2 ± 2,7	29,8 ± 4,1	0,062

Varijable s normalnom distribucijom prikazane su kao srednja vrijednost ± SD, dok su varijable s nenormalnom distribucijom prikazane kao medijan s 95% CI. P-vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim.

Kratice: CI – interval pouzdanosti; ITM – indeks tjelesne mase; N/A – nije primjenjivo; ŠBT2 – šećerna bolest tip 2.

Svi ispitanici su bili muškog spola. Prosječna dob svih ispitanika bila je 52,8 ± 6,3 godine te nije bilo značajne razlike između skupina ($P = 0,075$). U trenutku istraživanja prosječna dob ispitanika sa ŠBT2 bila je 4 godine viša od prosječne dobi u kojoj im je bila postavljena dijagnoza bolesti. Ispitanici iz skupine zdravih bili su usporedivi s ispitanicima iz skupine sa ŠBT2 obzirom na dob, tjelesnu masu, visinu, ITM, opseg struka i bokova. Ispitanici sa ŠBT2 su imali brožčano nešto veći ITM, razlika nije bila statistički značajna ($P = 0,062$), a s druge strane kod njih je izmjeren statistički značajno manji prosječni opseg nadlaktice ($P = 0,015$) i manji opseg vrata na granici statističke značajnosti ($P = 0,051$) što govori u prilog nepovoljnijeg odnosa mišićnog i masnog tkiva u odnosu na skupinu zdravih ispitanika.

4.2. Antihyperglikemijska terapija ispitanika sa šećernom bolešću tipa 2

U skupini sa ŠBT2 svih 18 ispitanika je uzimalo metformin. Od toga je njih 10 (55,6%) koristilo isključivo preparat metformina, a ostalih 8 ispitanika (44,4%) je koristilo metformin u kombinaciji s drugim antihyperglikemijskim lijekovima kako je prikazano u **Tablici 2**.

Tablica 2: Skupina ispitanika sa ŠBT2 – antihyperglikemijska terapija

Modalitet antihyperglikemijske terapije	N (%)
monoterapija (metformin)	10 (55,6 %)
kombinirana terapija (metformin + 1 AHL)	4 (22,2 %)
kombinirana terapija (metformin + 2 AHL)	4 (22,2 %)

Zastupljenost antihyperglikemijskih lijekova	N (%)
metformin	18 (100 %)
inhibitor DPP-4	6 (33,3 %)
inhibitor SGLT2	2 (11,1 %)
suflonilureja	3 (16,7 %)
inzulin	1 (5,6 %)

Kratice: AHL – antihyperglikemijski lijek; DPP-4 – dipeptidil-peptidaza 4; SGLT2 – suprijenosnik natrija i glukoze 2 (engl. *Sodium-glucose cotransporter 2*).

4.3. Biokemijski pokazatelji ispitanika

U **Tablici 3**. prikazani su osnovni biokemijski pokazatelji ispitanika iz obje skupine. Radi se o pokazateljima jetrene funkcije (aminotransferaze, albumin, ukupni bilirubin), pokazateljima bubrežne funkcije (ureja, kreatinin), pokazatelju stupnja upale visoke osjetljivosti (hsCRP) te metaboličkim pokazateljima (glukoza natašte, urati) na početku te nakon intervencije s crnim vinom.

Tablica 3. Biokemijski pokazatelji zdravih ispitanika i ispitanika sa ŠBT2 (prije i poslije intervencije)

Laboratorijski pokazatelj	Zdravi ispitanici (n = 13)			Ispitanici sa ŠBT2 (n = 18)		
	Prije intervencije	Poslije intervencije	<i>P</i> vrijednost	Prije intervencije	Poslije intervencije	<i>P</i> vrijednost
AST [IU/L]	27,1 ± 7,1	24,8 ± 5,6	0,324	22,1 ± 4,9	22,4 ± 5,2	0,740
ALT [IU/L]	25,0 (19,5-39,2)	24 (20,0-38,0)	0,321	25,5 (16,4-29,6)	22,5 (20,5-35,5)	0,868
GGT [IU/L]	28,0 (23,5-43,7)	31 (26-50)	0,074	25,5 (20,0-32,2)	27,5 (24,0-34,0)	0,486
albumin [g/L]	45,0 (45,0-46,0)*	45 (42,5-45,0)	0,012	43,0 (41,4-44,0)	42,0 (41,0-43,5)	0,164
ukupni bilirubin [μmol/L]	13,8 ± 4,0†	14,6 ± 6,7	0,441	12,4 ± 4,6	12,0 ± 4,6	0,559
urati [μmol/L]	328,9 ± 43,8	346 ± 38	0,078	359,6 ± 81,2	352 ± 56	0,543
hsCRP [mg/L]	1,3 (0,7-1,9)	1,2 (0,7-2,8)	0,129	1,5 (0,8-2,9)	1,3 (0,9-2,5)	0,918
urea [mmol/L]	5,8 ± 1,1	5,7 ± 1,4	0,250	6,2 ± 1,6	6,1 ± 1,3	0,84
kreatinin [μmol/L]	78,5 ± 8,1	83 ± 13	0,051	83,5 ± 9,2	80 ± 12	0,72
glukoza natašte [mmol/L]	5,3 ± 0,4	5,7 ± 0,4	0,115	7,5 ± 1,4	7,3 ± 1,4	0,294

Varijable s normalnom distribucijom prikazane su kao srednja vrijednost ± SD, dok su varijable s nenormalnom distribucijom prikazane kao medijan s 95% CI. *P*-vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim i odnose se na pokazatelje unutar skupine prije i poslije intervencije. Jedan ispitanik iz skupine zdravih ispitanika bio je isključen iz analize albumina*, a dva ispitanika iz iste skupine bila su isključena iz analize ukupnog bilirubina† zbog nedostatka podataka za 2. mjerenje.

Kratice: AST – aspartat aminotransferaza; ALT – alanin aminotransferaza; GGT – gama-glutamil transferaza; hsCRP – visokoosjetljivi C-reaktivni protein; ŠBT2 – šećerna bolest tip 2; CI – interval pouzdanosti.

Svi navedeni biokemijski pokazatelji u obje skupine, osim prosječne plazmatske koncentracije glukoze natašte kod ispitanika iz skupine ŠBT2, bili su unutar referentnog raspona vrijednosti na početku i ostali su uredni i uglavnom nepromijenjeni nakon intervencije.

4.4. Hematološki pokazatelji i biokemijski pokazatelji statusa željeza ispitanika

Hematološki pokazatelji i biokemijski pokazatelji statusa željeza u skupini zdravih ispitanika i u skupini ispitanika sa ŠBT2, na početku i nakon intervencije, prikazani su u **Tablici 4**.

Tablica 4. Hematološki pokazatelji i biokemijski pokazatelji statusa željeza u zdravih ispitanika i ispitanika sa ŠBT2 (prije i poslije intervencije)

Laboratorijski pokazatelj	Zdravi ispitanici (n = 13)			Ispitanici sa ŠBT2 (n = 18)		
	Prije intervencije	Poslije intervencije	<i>P</i> vrijednost	Prije intervencije	Poslije intervencije	<i>P</i> vrijednost
eritrociti [$\times 10^{12}/L$]	5,2 ± 0,5	5,1 ± 0,4	0,077	5,0 ± 0,3	4,9 ± 0,3	0,888
hematokrit [L/L]	0,45 ± 0,039	0,45 ± 0,034	0,388	0,44 ± 0,019	0,44 ± 0,021	0,749
hemoglobin [g/L]	154,2 ± 12,6	153,0 ± 10,6	0,348	151,4 ± 6,2	151,5 ± 6,5	0,969
retikulociti [$\times 10^9/L$]		/		60 ± 16	70 ± 15	0,005
RDW [%]	13,0 ± 0,5	13,2 ± 0,5	0,013	13,5 ± 0,4	13,6 ± 0,5	0,033
MCH [pg]	29,6 ± 1,0	29,9 ± 1,0	0,047	30,7 ± 1,3	30,7 ± 1,4	0,709
MCHC [g/L]	337,5 ± 7,3	339,5 ± 8,8	0,261	341,4 ± 5,5	342,7 ± 6,8	0,349
MCV [fL]	87,1 (84,9-90,1)	87,2 (85,2-91,5)	0,675	89,8 ± 3,6	89,6 ± 3,5	0,495
željezo [$\mu\text{mol}/L$]	21,8 ± 7,1	19,6 ± 6,9	0,328	15,0 (13,8-18,7)	16,4 (14,6-20,9)	0,177
TIBC [$\mu\text{mol}/L$]	54,2 ± 9,3	53,8 ± 12,1	0,767	57,8 ± 7,2	58,2 ± 7,6	0,434
UIBC [$\mu\text{mol}/L$]	31,6 ± 11,6	34,2 ± 11,4	0,109	39,4 (37,5-45,5)	41,6 (36,8-46,5)	0,453
saturacija transferina [%]	40,6 ± 12,9	37,0 ± 11,3	0,307	26,7 (22,6-29,9)	29,3 (24,5-32,7)	0,265
sTfR [mg/L]†	1,20 ± 0,22	1,24 ± 0,25	0,734	1,05 ± 0,17	1,04 ± 0,20	0,830
feritin [ng/mL]	173,0 (126,4-259,8)	118,0 (90,5-232,6)	0,017	209,5 ± 141,5	198,8 ± 139,4	0,215
eritropoetin [mIU/ml] *	10,6 (7,7-12,1)	12,5 (10,2-14,1)	0,001	7,6 (6,4-9,4)	8,9 (8,4-11,1)	0,024
eritroferon [ng/ml] *	0,11 ± 0,14	0,17 ± 0,19	0,270	0,044 ± 0,075	0,12 ± 0,12	0,028
hepcidin [ng/mL]	30,0 ± 17,3	21,0 ± 12,1	0,045	17,9 (11,9-25,2)	13,2 (8,2-18,3)	0,001

Varijable s normalnom distribucijom prikazane su kao srednja vrijednost ± SD, dok su varijable s nenormalnom distribucijom prikazane kao medijan s 95% CI. *P*-vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim i odnose se na parametre unutar skupine prije i poslije intervencije. U skupini zdravih

jedan je ispitanik imao nemjerljive razine sTfR, stoga je isključen iz analize†, a u jednog ispitanika su nedostajale početne vrijednosti eritropoetina i eritroferona zbog nedostatka uzorka *.

Kratice: MCH – prosječni hemoglobin u eritrocitu (engl. *mean corpuscular hemoglobin*); MCHC – prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu (engl. *mean corpuscular hemoglobin concentration*); MCV – prosječni volumen eritrocita (engl. *mean corpuscular volume*); RDW – širina distribucije volumena eritrocita (engl. *red cell distribution width*); sTfR – topljivi transferinski receptor; TIBC - ukupni kapacitet vezanja željeza (eng. *total iron binding capacity*); UIBC – nezasićeni kapacitet vezanja željeza (engl. *unsaturated iron-binding capacity*); ŠBT2 – šećerna bolest tipa 2; CI – interval pouzdanosti.

Nakon 3 tjedna umjerene konzumacije crnog vina, u skupini zdravih ispitanika izmjereno je statistički značajno smanjenje serumske koncentracije hepcidina ($30,0 \pm 17,3$ vs. $21,0 \pm 12,1$ ng/mL, $P = 0,045$). S još većom statističkom značajnošću nakon navedene intervencije izmjereno je smanjenje serumske koncentracije hepcidina ($17,9 [11,9-25,2]$ vs. $13,2 [8,2-18,3]$ ng/mL, $P = 0,001$) u skupini ispitanika sa ŠBT2.

Smanjenje serumske koncentracije hepcidina pratilo je značajno povećanje serumske koncentracije EPO ($10,6 [7,7-12,1]$ vs. $12,5 [10,2-14,1]$ mIU/ml, $P = 0,001$) u skupini zdravih ispitanika te ($7,6 [6,4-9,4]$ vs. $8,9 [8,4-11,1]$ mIU/ml, $P = 0,024$) u skupini ispitanika sa ŠBT2.

Povećanje koncentracije ERFE izmjereno je u obje skupine ispitanika i to u skupini zdravih ispitanika bez statističke značajnosti ($0,11 \pm 0,14$ vs. $0,17 \pm 0,19$ ng/ml, $P = 0,27$), a u skupini ispitanika sa ŠBT2 povećanje koncentracije je bilo statistički značajno ($0,044 \pm 0,075$ vs. $0,12 \pm 0,12$ ng/mL, $P = 0,028$). Smjer i veličina promjena u serumskim koncentracijama hepcidina, EPO i ERFE, kao odgovor na intervenciju s vinom, nije se razlikovala među skupinama (**Slika 12**).

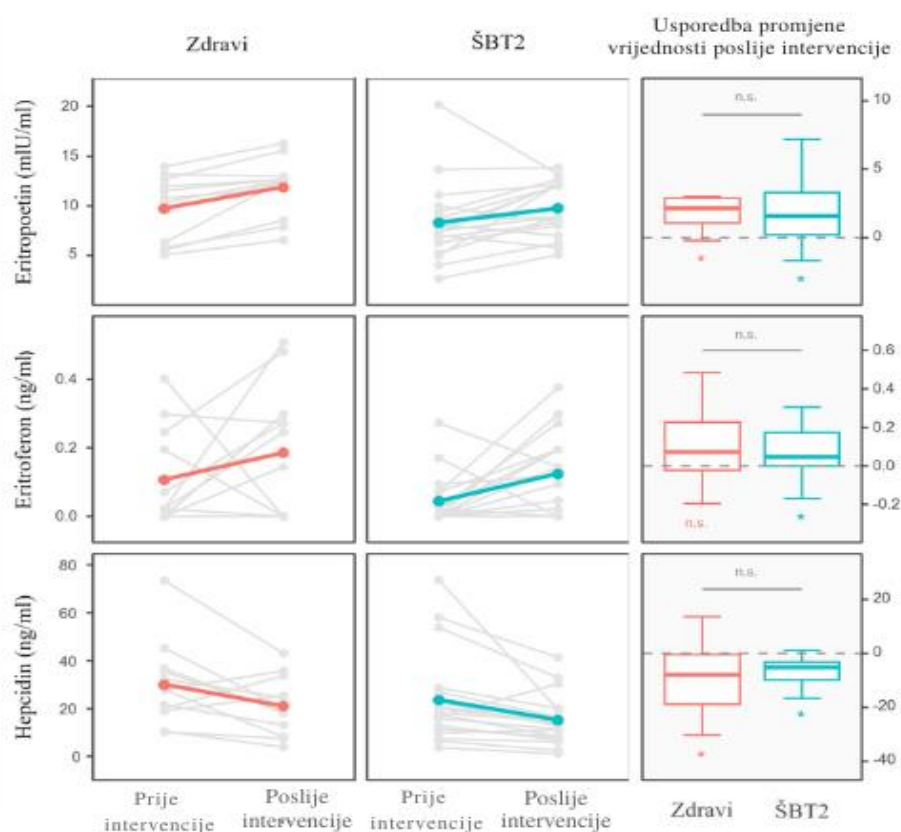
Smanjenje serumske koncentracije hepcidina nije bilo popraćeno značajnim promjenama u koncentracijama serumskog željeza. Nakon provedene intervencije koncentracije serumskog željeza bile su neznačajno promijenjene u obje skupine, i to u skupini zdravih ispitanika ($21,8 \pm 7,1$ vs. $19,6 \pm 6,9$ $\mu\text{mol/L}$, $P = 0,328$) te ($15,0 [13,8-18,7]$ vs. $16,4 [14,6-20,9]$ $\mu\text{mol/L}$, $P = 0,177$) u skupini ispitanika sa ŠBT2. Također, drugi značajni biokemijski pokazatelji povezani sa željezom ostali su uglavnom nepromijenjeni nakon intervencije, osim statistički značajnog pada serumske koncentracije feritina u skupini zdravih ispitanika ($173,0 [126,4-259,8]$ vs. $118,0 [90,5-232,6]$ ng/mL, $P = 0,017$). Treba napomenuti kako su hepcidin i feritin pokazali isti obrazac promjene u skupini ispitanika sa ŠBT2 u odnosu na skupinu zdravih ispitanika (**Slika 13**.), ali zbog šireg raspona vrijednosti feritina u skupini

ispitanika sa ŠBT2 nije bila postignuta statistička značajnost ($209,5 \pm 141,5$ vs. $198,8 \pm 139,4$ ng/mL, $P = 0,215$).

U mjerenjima nakon intervencije s vinom izmjereno je statistički značajno povećanje vrijednosti RDW u obje ispitivane skupine, u skupini zdravih ispitanika ($13,0 \pm 0,5$ vs. $13,2 \pm 0,5$ %, $P = 0,013$), te u skupini ispitanika sa ŠBT2 ($13,5 \pm 0,4$ vs. $13,6 \pm 0,5$ %, $P = 0,033$). Izmjeren je i značajan porast broja retikulocita u skupini ispitanika sa ŠBT2 (60 ± 16 vs. $70 \pm 15 \times 10^9$, $P = 0,005$). Broj retikulocita u skupini zdravih ispitanika nije bio mjeren.

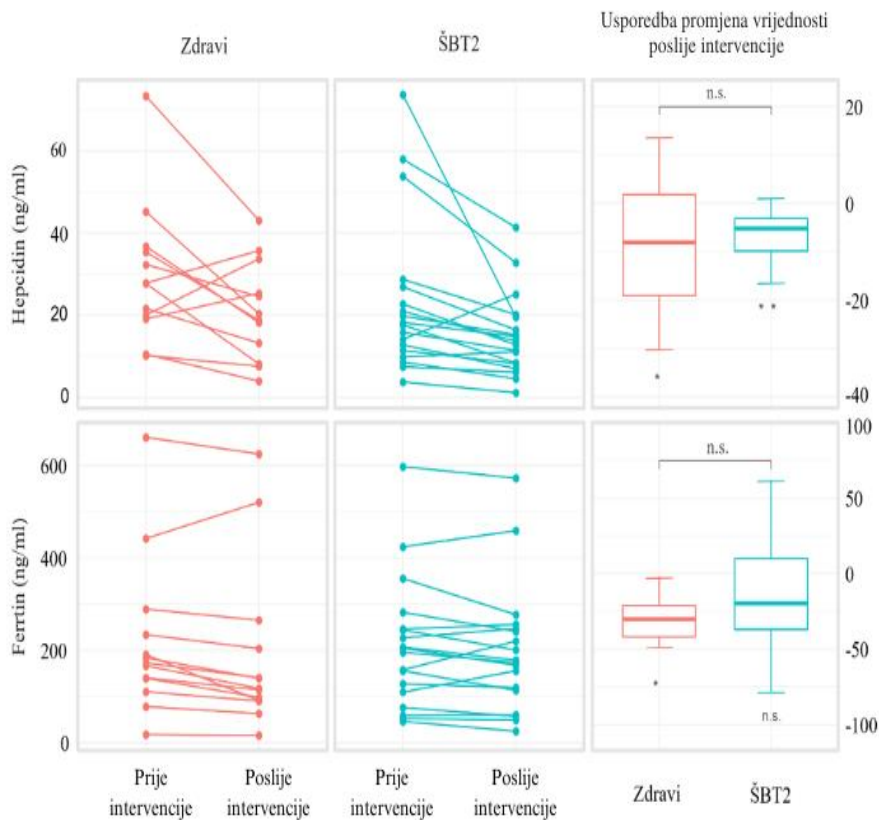
Nadalje, treba naglasiti kako linearna povezanost između ITM i hepcidina nije dokazana u nijednoj skupini (Pearsonov $r = 0,382$, $P = 0,220$ u skupini zdravih ispitanika; Pearsonov $r = 0,037$, $P = 0,883$ u skupini ispitanika sa ŠBT2).

Nakon intervencije s crnim vinom nisu bile zamijećene značajne promjene vrijednosti pokazatelja eritrocita (broj eritrocita, MCH, MCHC, MCV) niti značajne promjene vrijednosti hematoloških pokazatelja (hemoglobin, hematokrit).



Slika 12. Vrijednosti eritropoetina, eritroferona i hepcidina u skupini zdravih ispitanika i u skupini ispitanika sa ŠBT2 prije i poslije intervencije s crnim vinom

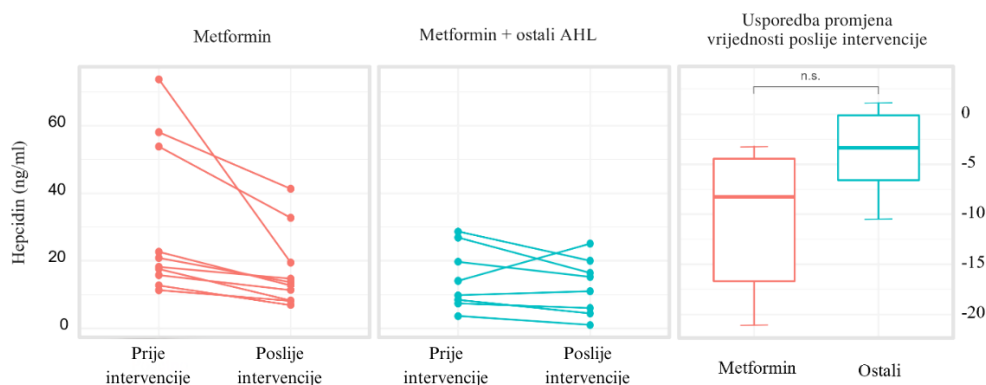
Prva dva stupca prikazuju vrijednosti pokazatelja prije i nakon intervencije za svaku skupinu. Sive linije povezuju odgovarajuća mjerenja za svakog pojedinog ispitanika. Kako bi se bolje prikazali ukupni trendovi, obojene linije su postavljene iznad pojedinačnih mjerenja, označavajući srednju vrijednost mjerenja za svaku skupinu. Krajnji desni stupac prikazuje dijagrame promjena vrijednosti uzrokovanih intervencijom. Kratica n.s. (nije značajno) označava P -vrijednost $>0,05$, a simbol * P -vrijednost $<0,05$. Simboli statističke značajnosti postavljeni ispod svakog pravokutnog dijagrama predstavljaju statističku značajnost učinka intervencije unutar svake skupine. Simbol iznad vodoravne sive linije između pravokutnih dijagrama označava značaj testa koji uspoređuje veličinu odgovora na intervenciju između dviju skupina.



Slika 13. Vrijednosti hepcidina i feritina u skupini zdravih ispitanika i u skupini ispitanika sa ŠBT2 prije i poslije intervencije s crnim vinom

Prva dva stupca prikazuju vrijednosti parametara prije i nakon intervencije za svaku skupinu. Linije u boji povezuju odgovarajuća mjerenja za svakog pojedinog ispitanika. Krajnji desni stupac prikazuje dijagrame promjena vrijednosti uzrokovanih intervencijom. Kratica n.s. označava $P > 0,05$; simbol * znači $P < 0,05$; simbol ** znači $P < 0,01$. Simboli statističke značajnosti postavljeni ispod svakog pravokutnog dijagrama predstavljaju statističku značajnost učinka intervencije unutar svake skupine. Simbol iznad vodoravne sive linije između pravokutnih dijagrama označava značaj testa koji uspoređuje veličinu odgovora na intervenciju između dviju skupina.

Nije bilo statističke značajne razlike u promjenama hepcidina između ispitanika sa ŠBT2 koji su uzimali samo metformin i onih koji su uzimali metformin u kombinaciji s drugim antihiperglikemijskim lijekovima ($P=0,062$), **Slika 14**.



Slika 14: Promjene u razini hepcidina kod ispitanika sa ŠBT2 koji uzimaju samo metformin i onih koji uzimaju metformin u kombinaciji s drugim antihiperglikemijskim lijekovima.

Kratice n.s. znači $P>0,05$; kratice AHL – antihiperglikemijska terapija

Što se tiče pokazatelja kontrole glikemije kod ispitanika sa ŠBT2, trodnevna konzumacija crnog vina nije utjecala na prosječnu koncentraciju serumske glukoze natašte ($7,5 \pm 1,4$ vs. $7,3 \pm 1,4$ mmol/L, $P=0,294$). Nije zabilježena značajna promjene vrijednosti HbA1c ($6,2$ [5,9 - 6,7] vs. $6,4$ [5,9 - 6,8] %, $P = 0,322$). Mjerene su razine fruktozamina, koji bolje odražava prosječne koncentracije glukoze u plazmi u kraćem vremenskom razdoblju (1-4 tjedna) u odnosu na HbA1c, a izmjerene vrijednosti bile su slične prije i poslije intervencije ($289,0$ [270,8 - 294,8] vs. $286,0$ [273,0 - 294,8] $\mu\text{mol/L}$, $P = 0,524$).

5. RASPRAVA

Ovo istraživanje je pokazalo kako trodnevna umjerena konzumacija crnog vina ima učinak u vidu sniženja serumske koncentracije hepcidina, u zdravih osoba i u osoba sa ŠBT2, ali bez značajnijeg učinka na promjene koncentracije serumskog željeza i druge povezane parametre. Zamijećen je, također, porast razina EPO i ERFE, najvažnijih regulatora sinteze hepcidina što ukazuje da bi smanjenje serumske koncentracije hepcidina moglo bilo povezano s aktivacijom eritropoetin-eritroferon-hepcidin eritropoetskog puta. Budući da nemamo čvrste dokaze o toj korelaciji te nije bio ispitan mehanizam na koji se način to događa, pretpostavka je kako umjerena konzumacija crnog vina potiče proizvodnju eritropoetina koji djeluje na eritroidne prekursore i potiče ih na proizvodnju eritroferona koji je glavni supresor sinteze hepcidina (204). Rezultati ovog istraživanja govore u prilog navedenog mehanizma. Nadalje, nakon intervencije kod ispitanika sa ŠBT2 utvrđen je statistički značajan porast broja retikulocita, a u obje skupine utvrđen je porast vrijednosti RDW. Navedeni parametri su rani pokazatelji aktivne hematopoeze (205, 206), što dodatno potvrđuje prethodne nalaze. Iako se povećanje RDW čini malim u smislu apsolutnih promjena, bilo je dovoljno dosljedno da dosegne statističku značajnost, osobito u skupini zdravih ispitanika. Nije vjerojatno da će opažene promjene u RDW biti od kliničke važnosti, no mogu se smatrati markerom promijenjene biologije eritrocita u kontekstu stimulacije eritropoetskog puta. U kontekstu dobivenih rezultata, bitno je napomenuti da je u nekim istraživanjima povećanje RDW-a bilo povezano s eritropoetskom aktivnošću koja je bila potaknuta egzogenim EPO-om u zdravih ispitanika (207), dok je u nekim patološkim stanjima, kao što je koronarna arterijska bolest, razina RDW-a bila povezana s razinama endogenog EPO-a (208).

Iako smanjenje koncentracije serumskog hepcidina nakon intervencije s vinom nije rezultiralo promjenama serumskih razina željeza, utvrđeno je kako su razine serumskog feritina bile snižene nakon konzumiranja crnog vina u obje skupine, sa statističkom značajnošću postignutom samo u skupini sa zdravim ispitanicima. Moguće objašnjenje ovog opažanja je da smanjenje razine hepcidina dovodi do povećanog staničnog izvoza željeza, što može biti povezano sa smanjenim stvaranjem feritina i nižim cirkulirajućim feritinom.

Učinci vina na status željeza i čimbenike homeostaze željeza općenito nisu još dobro istraženi. Jedno populacijsko istraživanje pokazalo je kako postoji povezanost između kronične dnevne konzumacije alkoholnih pića i zaliha željeza u tijelu, što je određeno razinom željeza u serumu, feritinom i zasićenošću transferina (122). Drugi mehanizmi koji također mogu utjecati na sniženje hepcidina mogu biti povezani sa samom konzumacijom vina i njegovim sastavom. Dokazano je da metabolizam etanola značajno smanjuje ekspresiju hepcidina na razini mRNA

i proteina pri čemu je olakšan membranski prijenos željeza preko feroportina i dolazi do porasta razine serumskog željeza (119, 121, 209). Suprotno tome, pokazalo se kako fenoli prisutni u vinu, smanjuju koncentracije serumskog željeza zbog svoje sposobnosti vezanja željeza i inhibiranjem njegove apsorpcije u dvanaesniku. Uz to, neizravno djeluju tako što inhibiraju ekspresiju TfR1 i feroportina 1, te potiču ekspresiju DMT-1 i transkripciju hepcidina (125). U istraživanju provedenom na štakorima tretiranim kvercetinom, najzastupljenijim polifenolom u prehrani, zabilježeno je smanjenje ekspresije feroportina te posljedično smanjena apsorpcija željeza (210). To potvrđuje i činjenica da je apsorpcija željeza dva do tri puta brža kada se konzumira bijelo vino koje sadrži znatno manje koncentracije polifenola od crnog vina koje je bogato polifenolima, slično vinu koje je korišteno u ovom istraživanju. Također, slično kao u našem istraživanju, učinci vina su bili ispitivani uz jelo, te je pokazano da su inhibitorni učinci crnog vina na apsorpciju željeza znatno izraženiji ako se ono uzima uz jelo (127).

Razumijevanje mehanizama interakcije između fenola iz vina, etanola i homeostaze željeza još uvijek je ograničeno, te su potrebna dodatna istraživanja. Suprotni učinci ograničene apsorpcije željeza u crijevima zbog učinka flavonoida i olakšanog izvoza željeza iz skladišnih stanica uslijed smanjenja razine hepcidina mogli bi biti objašnjenje zašto u našem istraživanju nisu zabilježene značajne promjene u razini serumskog željeza nakon trodnevne umjerene konzumacije crnog vina. Dodatna mogućnost je kako vremensko razdoblje od tri tjedna nije bilo dovoljno dugo kako bi uz navedenu intervenciju došlo do značajne promjene u serumskim razinama i zalihama željeza.

Unatoč očekivanom oslobađanju željeza u cirkulaciju zbog smanjenja hepcidina (211), nismo zabilježili povećanje zasićenja transferina. Štoviše, zasićenje transferina u obje skupine bilo je znatno ispod 70%, odnosno ispod praga nakon kojeg se najčešće može detektirati serumsko željezo nevezano za transferin, odn. NTBI (212). NTBI može potaknuti stvaranje ROS i biti povezano s različitim patološkim stanjima. Nakupljanje takvog željeza u endotelnim stanicama arterija dovodi do njihovog propadanja i pogoršanja funkcije, što uz nakupljanje u makrofazima, igra ključnu ulogu u egzacerbaciji aterosklerotske bolesti (213). Stoga bi umjerena konzumacija crnog vina mogla igrati ulogu u održavanju ravnoteže razine hepcidina potrebne za prevenciju oksidativnog stresa uzrokovanog željezom.

Nadalje, što se tiče povezanosti učinka konzumacije vina na upalu, broje studije su pokazale su kako vino u različitim patološkim stanjima ima protuupalni učinak smanjujući razine upalnih markera u krvi (214–216). Tijekom upale dolazi do porasta razina hepcidina i feritina koji se ubrajaju u proteine akutne faze (217, 218), dok je u ovom istraživanju

zamijećeno njihovo sniženje što bi mogla biti posljedica učinka umjerene konzumacije crnog vina. Neki autori predlažu da feritin raste posljedično staničnom oštećenju koje se događa tijekom faze upale (53), dok drugi smatraju da je on sam potencijalni rizični biomarker za nastanak metaboličkog sindroma, dislipidemije, hiperglikemije i inzulinske rezistencije (219). Dakle, povišeni serumski feritin može biti povezan s drugim patofiziološkim čimbenicima ŠBT2, koji nisu izravno povezani s preopterećenjem željezom (220), poput inzulinske rezistencije (221) i metaboličkog sindroma (222, 223). U našem istraživanju prosječne razine serumskog feritina smanjile su se nakon konzumacije crnog vina u obje skupine, ali je statistička značajnost postignuta samo u skupini zdravih ispitanika. To je vjerojatno posljedica činjenice kako je skupina ispitanika sa ŠBT2 bila premala da bi kompenzirala širu varijabilnost izmjerenih vrijednosti feritina. Usporedno smanjenje serumskog hepcidina i feritina koje je ovdje zabilježeno u skladu je s drugim istraživanjima koja pokazuju linearnu povezanost između razine hepcidina i feritina u serumu (69, 211). Povećani izvoz željeza može biti povezan sa smanjenom proizvodnjom feritina, što dovodi do nižih razina cirkulirajućeg feritina (224). Međutim, kako sve više istraživanja sugerira da serumski feritin nije idealan pokazatelj statusa željeza u tijelu, njegove razine u serumu treba tumačiti s oprezom (220, 225, 226). Kako pokazuju koncentracije topljivih serumskih transferinskih receptora (sTfR), stanične potrebe za željezom nisu se promijenile u obje skupine nakon konzumacije crnog vina. Za razliku od feritina koji nije toliko pouzdan pokazatelj statusa željeza, sTfR se smatra biokemijskim markerom statusa željeza koji nije osjetljiv na upalu (227).

Osim što je glavni regulator homeostaze željeza, hepcidin je i protein akutne faze tip II i njegova sinteza je potaknuta u upalnim stanjima (70). Potencijalan učinak ovakvog mehanizma na promjene u serumskom hepcidinu, u našem istraživanju nije vjerojatan. Naime, razine hsCRP-a ostale su snižene u obje skupine, ukazujući na odsutnost upalnog događanja u eksperimentalnom razdoblju.

Dokazano je da pretilost koju karakterizira stalno prisutna kronična upala niskog stupnja (228) može utjecati na promjene u razini hepcidina kod zdravih i kod osoba sa ŠBT2 (229, 230). Svi ispitanici u našem istraživanju su bili s vrijednostima $ITM < 35 \text{ kg/m}^2$ te su i dvije grupe ispitanika bile usklađene prema vrijednostima ITM. Naši rezultati nisu pokazali povezanost između $ITM < 35 \text{ kg/m}^2$ i promjena hepcidina ni u skupini zdravih ispitanika, kao ni u skupini ispitanika sa ŠBT2. Nalaz našeg istraživanja je u skladu s istraživanjem Vuppalachija, koje je pokazalo da su natprosječno povišene razine hepcidina uglavnom bile zabilježene kod osoba s $ITM \geq 35 \text{ kg/m}^2$ (231). Drugi patogeni mehanizam koji može utjecati na razine hepcidina u

serumu je kronična bolest bubrega koja može narušiti bubrežni klirens hepcidina (232). Ovaj mehanizam također se može isključiti kao čimbenik koji ometa opažene rezultate. Naime, početne izmjerene razine ureje i kreatinina bile su u referentnom rasponu i nisu se značajno mijenjale tijekom i nakon razdoblja intervencije što ukazuje na stabilnu bubrežnu funkciju sudionika našeg istraživanja.

U istraživanjima koja procjenjuju razine hepcidina kod pacijenata sa ŠBT2, informacije o njihovoj terapiji često su bile nedostatne (195, 230, 233). Pokazano je da metformin može suprimirati proizvodnju hepcidina pri čemu dolazi do porasta razine željeza (15, 86), dok je utjecaj drugih antihiperглиkemijskih lijekova na razine hepcidina bio uglavnom neistražen. U kliničkom razvoju inhibitora SGLT2 je uz njihov temeljni antihiperглиkemijski učinak te kliničke dokaze boljih ishoda kod bolesnika sa ŠBT2, bolesnika sa zatajivanjem srca kao i bolesnika s kroničnom bubrežnom bolešću izmjeren porast hemoglobina i hematokrita što je početno bilo tumačeno diuretskim učinkom ove skupine lijekova i posljedičnom hemokoncentracijom (234). No daljnja istraživanja su pokazala kako je u podlozi navedenog supresija hepcidina kao posljedica pojačanog eritropoetskog učinka uz primjenu SGLT2 inhibitora, mjereno povećanjem razina eritropoetina i eritroferona (200-202). Za vrijeme trajanja našeg istraživanja u grupi ispitanika sa ŠBT2 bilo je zabranjeno uvođenje novog farmakološkog sredstva, odnosno novog lijeka, kako bi se izbjegao potencijalni ometajući čimbenik koji bi mogao utjecati na dinamiku istraživanih pokazatelja homeostaze željeza. Nije uočena razlika u razinama hepcidina na početku istraživanja niti u dinamici promjena razine hepcidina nakon intervencije s crnim vinom između ispitanika sa ŠBT2 koji su uzimali samo metformin i onih koji su uzimali metformin u kombinaciji s drugim antihiperглиkemijskim lijekovima. Navedeno pokazuje kako za vrijeme istraživanja kronična farmakoterapija šećerne bolesti nije imala novi ili izmijenjeni učinak na hepcidin te nije utjecala na učinak intervencije s crnim vinom na hepcidin, eritropoetin i eritroferon. Slična redukcija razine hepcidina te zabilježen porast razine eritropoetina i eritroferona u serumu u skupini zdravih ispitanika koji nisu uzimali nikakve lijekove, također ukazuje kako je navedeni učinak prvenstveno bio uzrokovan trodnevnom umjerenom konzumacijom crnog vina uz obrok.

Ovo istraživanje ukazuje na novi biološki učinak vina koji bi mogao biti važan u stanjima i bolestima u podlozi kojih je poremećaj homeostaze željeza i funkcije hepcidina.

Ograničenja istraživanja

Objektivno ograničenje ovog istraživanja je mala veličina uzorka što je bio primarni razlog zašto se nisu uspoređivale apsolutne vrijednosti ispitivanih pokazatelja između skupina. Mali broj ispitanika u grupama nije bio dovoljan kako bi kompenzirao interindividualne razlike ispitanika, kao i razlike svojstvene zdravim od onih koji su svojstvene ispitanicima sa šećernom bolešću. Rezultati takvih usporedbi bili bi neuvjerljivi. Za razliku od usporedbe između skupina, svaki sudionik istraživanja bio je sam sebi kontrola, uz usporedbe dobivenih rezultata prije i nakon intervencije s vinom unutar svake skupine. Takav dizajn istraživanja eliminira interindividualnu varijabilnost dopuštajući donošenje razumnih pretpostavki čak i uz relativno malu veličinu uzorka. U istraživanju su pokazani statistički značajni učinci intervencije s crnim vinom u skupini zdravih ispitanika i u skupini ispitanika sa ŠBT2. To ukazuje na pouzdanost rezultata i smanjuje vjerojatnost da su dobiveni rezultati artefakt slučajnih nalaza zbog male veličine uzorka. Osim objektivnih statističkih pokazatelja, rezultati koji se tiču promjena razine hepcidina nakon konzumacije crnog vina bili su u skladu s prethodno dobro utvrđenim učincima alkohola na sintezu hepcidina. Stoga je, razumno pretpostaviti da su učinci intervencije na razine eritropoetina i eritroferona jednako pouzdani. Štoviše, kolika je vjerojatnost slučajnog nalaza da se razine tri različita parametra u serumu istovremeno promijene nakon intervencije s crnim vinom u smjeru koji ukazuju na aktivaciju eritropoetskog puta eritropoetin–eritroferon–hepcidin, te da se te promjene dogode u dvije neovisne skupine ispitanika. Unatoč nekim podacima koji nedostaju, promjene u nekoliko drugih parametara kao što su broj retikulocita, RDW i razine feritina ukazuju na stimulaciju eritropoetskog sustava. Razdoblje intervencije vjerojatno je bilo prekratko da bi se dogodile značajne promjene u pokazateljima statusa željeza i broja eritrocita kao dodatan pokazatelj aktivacije eritropoetskog puta.

Rezultati ovog istraživanja koji povezuju eritropoetski put eritropoetin–eritroferon–hepcidin i pokazatelje homeostaze željeza nakon konzumacije crnog vina tijekom 3 tjedna, u skladu su s rezultatima randomiziranih i placebo kontroliranih kliničkih ispitivanja koja su pokazala eritropoetske učinke SGLT2 inhibitora, farmakoloških sredstava nepovezanih s vinom. Pokazalo se da ovi lijekovi stimuliraju eritropoezu i povećavaju iskorištavanje željeza u bolesnika sa zatajenjem srca, sa i bez šećerne bolesti. U vremenskim točkama koje su usporedive trajanju intervencije s vinom, ovi lijekovi s potvrđenim eritropoetskim učinkom pokazali su obrazac promjena u razinama hepcidina, eritropoetina, eritroferona i indeksa statusa željeza vrlo sličan onom opaženom u ovom istraživanju (201, 235, 236). Također valja naglasiti, da je kod bolesnika s umjerenim, nekomplikiranim nedostatkom željeza liječenima

nadomjesnom terapijom obično potrebno oko 4 tjedna za objektivni klinički odgovor u pokazateljima statusa željeza (237).

6. ZAKLJUČCI

1. Trojtjedna umjerena konzumacija crnog vina dovela je do značajnog sniženja serumske koncentracije hepcidina u skupini zdravih ispitanika i u skupini ispitanika sa ŠBT2.
2. Trojtjedna umjerena konzumacija crnog vina dovela je do sniženja serumske koncentracije feritina u obje skupine, sa statističkom značajnošću postignutom samo u skupini sa zdravim ispitanicima.
3. Trojtjedna umjerena konzumacija crnog vina nije imala značajnog učinka na koncentracije serumskog željeza i druge biokemijske pokazatelje homeostaze željeza (transferin, UIBC, TIBC, saturacija transferina, sTfR) ni u jednoj skupini ispitanika.
4. Trojtjedna umjerena konzumacija crnog vina dovela je do značajnog porasta serumske koncentracije eritropoetina u obje skupine te eritroferona u skupini ispitanika sa ŠBT2, što uz zabilježeno sniženje razine hepcidina, ukazuje na aktivaciju eritropoetin-eritroferon-hepcidin eritropoetskog puta posljedično intervenciji s crnim vinom.
5. Zabilježen je značajan porast vrijednosti RDW u obje skupine ispitanika te značajan porast broja retikulocita u skupini ispitanika sa ŠBT2 što je dodatan pokazatelj aktivacije eritropoetskog puta posljedično intervenciji s crnim vinom.
6. Trojtjedna umjerena konzumacija crnog vina nije imala značajnog učinka na hematološke i eritrocitne pokazatelje (hemoglobin, hematokrit, broj eritrocita, MCV, MCH, MCHC) ni u jednoj skupini ispitanika.
7. Nije bilo značajne razlike u promjenama koncentracije hepcidina između ispitanika sa ŠBT2 koji su uzimali samo metformin i onih koji su uzimali metformin u kombinaciji s drugim antihiperглиkemijskim lijekovima.
8. Trojtjedna umjerena konzumacije crnog vina nije dovela do značajne promjene drugih istraživanih biokemijskih pokazatelja, uključujući pokazatelje glikemijske kontrole u skupini ispitanika sa ŠBT2.
9. Ovo je prvo istraživanje koje opisuje novi i važan biološki učinak umjerene konzumacije crnog vina. Ovaj rad može pridonijeti razumijevanju uloge umjerene konzumacije vina u stanjima koja su povezana s homeostazom i s poremećajem homeostaze željeza te biološkim učincima hepcidina općenito.

7. LITERATURA

1. Delijewski M, Bartoń A, Maksym B, Pawlas N. The Link between Iron Turnover and Pharmacotherapy in Transplant Patients. *Nutrients*. 2023;15:1453.
2. Yiannikourides A, Latunde-Dada GO. A Short Review of Iron Metabolism and Pathophysiology of Iron Disorders. *Medicines (Basel)*. 2019;6:85.
3. Anderson ER, Shah YM. Iron homeostasis in the liver. *Compr Physiol*. 2013;3:315-30.
4. Scott C, Arora G, Dickson K, Lehmann C. Iron Chelation in Local Infection. *Molecules*. 2021;26:189.
5. Barua S, Ciannella S, Tijani L, Gomez-Pastora J. Iron in blood cells: Function, relation to disease, and potential for magnetic separation. *Biotechnol Bioeng*. 2023;120:1707-24.
6. Ems T, St Lucia K, Huecker MR. Biochemistry, Iron Absorption. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448204/>
7. Firdose K, Firdose N. Dietary Iron. U: Biochemistry [Internet]. Rijeka: IntechOpen; 2021. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.101265>
8. Andrews NC. Disorders of Iron Metabolism. *N Engl J Med*. 1999;341:1986–95.
9. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*. 2010;142:24-38.
10. Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, Antiochos B, McDonald A, Chen J, i sur. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet*. 2005;37:1264–9.
11. Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Ponka P, Gros P. Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood*. 1999;93:4406–17.
12. Koorts AM, Viljoen M. Ferritin and ferritin isoforms I: Structure-function relationships, synthesis, degradation and secretion. *Arch Physiol Biochem*. 2007;113:30–54.
13. Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, i sur. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet*. 1999;21:195–9.
14. Yeh KY, Yeh M, Mims L, Glass J. Iron feeding induces ferroportin 1 and hephaestin migration and interaction in rat duodenal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296:G55-65.
15. Bjørklund G, Dadar M, Peana M, Rahaman MS, Aaseth J. Interactions between iron and manganese in neurotoxicity. *Arch Toxicol*. 2020;94:725-34.
16. Cabantchik ZI. Labile iron in cells and body fluids: physiology, pathology, and pharmacology. *Front Pharmacol*. 2014;5:45.

17. Porter JB, Cappellini MD, Kattamis A, Viprakasit V, Musallam KM, Zhu Z i sur. Iron overload across the spectrum of non-transfusion-dependent thalassaemias: role of erythropoiesis, splenectomy and transfusions. *Br J Haematol.* 2017;176:288-99.
18. Esposito BP, Breuer W, Sirankapracha P, Pootrakul P, Hershko C, Cabantchik ZI. Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. *Blood.* 2003;102:2670-77.
19. Wake H, Takahashi Y, Yoshii Y, et al. Histidine-rich glycoprotein possesses antioxidant activity through self-oxidation and inhibition of hydroxyl radical production via chelating divalent metal ions in Fenton's reaction. *Free Radic Res.* 2020;54:649-61.
20. Pramanik S, Chakraborty S, Sivan M, Patro BS, Chatterjee S, Goswami D. Cell Permeable Imidazole-Desferrioxamine Conjugates: Synthesis and In Vitro Evaluation. *Bioconjug Chem.* 2019;30:841-52.
21. Kakhlon O.; Cabantchik Z. I. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radical Biol. Med.* 2002;33:1037–46.
22. Dixon SJ, Stockwell BR. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat Chem Biol.* 2014;10:9–17.
23. Roemhild K, Maltzahn F von, Weiskirchen R, Knüchel R, Stillfried S von, Lammers T. Iron metabolism: pathophysiology and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2021;42:640-56.
24. de Jong G, van Dijk JP, van Eijk HG. The biology of transferrin. *Clin Chim Acta.* 1990;190:1–46.
25. Murakami Y, Saito K, Ito H, Hashimoto Y. Transferrin isoforms in cerebrospinal fluid and their relation to neurological diseases. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2019;95:198–210.
26. Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820:188–202.
27. He QY, Mason AB, Nguyen V, MacGillivray RT, Woodworth RC. The chloride effect is related to anion binding in determining the rate of iron release from the human transferrin N-lobe. *Biochem J.* 2000;350:909–15.
28. Knutson MD. Non-transferrin-bound iron transporters. *Free Radic Biol Med.* 2019;133:101-11.
29. Kawabata H. Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radic Biol Med.* 2019;133:46-54.
30. Lok CN, Loh TT. Regulation of transferrin function and expression: review and update. *Biol Signals Recept.* 1998;7:157-78.
31. Ponka P, Lok CN. The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999;31:1111–37.

32. Anthony DP, Hegde M, Shetty SS, Rafic T, Mutalik S, Rao BSS. Targeting receptor-ligand chemistry for drug delivery across blood-brain barrier in brain diseases. *Life Sci.* 2021;274:119326.
33. Candelaria PV, Leoh LS, Penichet ML, Daniels-Wells TR. Antibodies Targeting the Transferrin Receptor 1 (TfR1) as Direct Anti-cancer Agents. *Front Immunol.* 2021;12:607692.
34. Kawabata H, Germain RS, Ikezoe T, Tong X, Green EM, Gombart AF, et al. Regulation of expression of murine transferrin receptor 2. *Blood.* 2001;98:1949–54.
35. Trinder D, Baker E. Transferrin receptor 2: a new molecule in iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35:292-96.
36. Nai A, Lidonnici MR, Rausa M, Mandelli G, Pagani A, Silvestri L, et al. The second transferrin receptor regulates red blood cell production in mice. *Blood.* 2015;125:1170–9.
37. Worthen CA, Enns CA. The role of hepatic transferrin receptor 2 in the regulation of iron homeostasis in the body. *Front Pharmacol.* 2014;5:34.
38. Mahant H, Jain S, Patel A, Lapani B. Appropriate Method of TIBC Estimation in Reference to Serum Transferrin Levels. *J Lab Physicians.* 2022;15:25-30.
39. Kasvosve I, Delanghe J. Total iron binding capacity and transferrin concentration in the assessment of iron status. *Clin Chem Lab Med.* 2002;40:1014–18.
40. Yamanishi H, Iyama S, Yamaguchi Y, Kanakura Y, Iwatani Y. Modification of fully automated total iron-binding capacity (TIBC) assay in serum and comparison with dimension TIBC method. *Clin Chem.* 2002;48:1565-70.
41. Faruqi A, Zubair M, Mukkamalla SKR. Iron-Binding Capacity. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559119/>
42. Johnson-Wimbley TD, Graham DY. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in the 21st century. *Therap Adv Gastroenterol.* 2011;4:177–84.
43. Orino K, Watanabe K. Molecular, physiological and clinical aspects of the iron storage protein ferritin. *Vet J.* 2008;178:191–201.
44. Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood.* 2002;99:3505-16.
45. Wang W, Knovich MA, Coffman LG, Torti FM, Torti SV. Serum Ferritin: Past, Present and Future. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1800:760–9.
46. Chasteen ND, Harrison PM. Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *J Struct Biol.* 1999;126:182-94.
47. Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, Torti SV. Ferritin for the Clinician. *Blood Rev.* 2009;23:95–104.

48. La A, Nguyen T, Tran K, et al. Mobilization of iron from ferritin: new steps and details. *Metallomics*. 2018;10:154-68.
49. Mancias JD, Wang X, Gygi SP, Harper JW, Kimmelman AC. Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature*. 2014;509:105-9.
50. Asano T, Komatsu M, Yamaguchi-Iwai Y, Ishikawa F, Mizushima N, Iwai K. Distinct mechanisms of ferritin delivery to lysosomes in iron-depleted and iron-replete cells. *Mol Cell Biol*. 2011;31:2040–52.
51. Alkhateeb AA, Connor JR. Nuclear ferritin: A new role for ferritin in cell biology. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1800:793–7.
52. Surguladze N, Thompson KM, Beard JL, Connor JR, Fried MG. Interactions and reactions of ferritin with DNA. *J Biol Chem*. 2004;279:14694–702.
53. Kell DB, Pretorius E. Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells. *Metallomics*. 2014;6:748–73.
54. Kernan KF, Carcillo JA. Hyperferritinemia and inflammation. *Int Immunol*. 2017;29:401-9.
55. Alkhateeb AA, Connor JR. The significance of ferritin in cancer: anti-oxidation, inflammation and tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1836:245-54.
56. Anderson GJ, Frazer DM. Current understanding of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr*. 2017;106:1559S-66S.
57. Gao G, Li J, Zhang Y, Chang YZ. Cellular Iron Metabolism and Regulation. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1173:21–32.
58. Ganz T. Systemic Iron Homeostasis. *Physiol Rev*. 2013;93:1721-41.
59. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci*. 2014;19:164–74.
60. Frazer DM, Anderson GJ. The regulation of iron transport. *Biofactors*. 2014;40:206–14.
61. Hurrell R, Egli I. Iron bioavailability and dietary reference values. *Am J Clin Nutr*. 2010;91:1461S-67S.
62. Evstatiev R, Gasche C. Iron sensing and signalling. *Gut*. 2012;61:933–52.
63. Mastrogiannaki M, Matak P, Peyssonnaud C. The gut in iron homeostasis: role of HIF-2 under normal and pathological conditions. *Blood*. 2013;122:885–92.
64. Nemeth E, Ganz T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr*. 2006;26:323–42.

65. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM i sur. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306:2090–3.
66. Lieu PT, Heiskala M, Peterson PA, Yang Y. The roles of iron in health and disease. *Mol Aspects Med*. 2001;22:1–87.
67. Ganz T, Nemeth E. Heparin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823:1434-43
68. Valore EV, Ganz T. Posttranslational processing of heparin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Mol Dis*. 2008;40:132–8.
69. Ganz T. Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*. 2003.;102:783–8.
70. 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;101:2461–3.
71. Hawula ZJ, Wallace DF, Subramaniam VN, Rishi G. Therapeutic Advances in Regulating the Heparin/Ferroportin Axis. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019;12:170.
72. Vecchi C, Montosi G, Zhang K, Lamberti I, Duncan SA, Kaufman RJ i sur. ER stress controls iron metabolism through induction of heparin. *Science*. 2009;325:877–80.
73. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, i sur. The gene encoding the iron regulatory peptide heparin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*. 2002;110:1037–44.
74. Pasricha SR, McHugh K, Drakesmith H. Regulation of Heparin by Erythropoiesis: The Story So Far. *Annu Rev Nutr*. 2016;36:417–34.
75. Ganz T, Nemeth E. Heparin and Disorders of Iron Metabolism. *Annu Rev Med*. 2011;62:347-60.
76. Meynard D, Babitt JL, Lin HY. The liver: conductor of systemic iron balance. *Blood*. 2014;123:168-76.
77. Ganz T. Iron and infection. *Int J Hematol*. 2018;107:7–15.
78. Hocquellet A, le Senechal C, Garbay B. Importance of the disulfide bridges in the antibacterial activity of human heparin. *Peptides*. 2012.;36:303–7.
79. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011;34:637–50.
80. Armitage AE, Eddowes LA, Gileadi U, Cole S, Spottiswoode N, Selvakumar TA i sur. Heparin regulation by innate immune and infectious stimuli. *Blood*. 2011;118:4129-39.
81. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol*. 2010;22:347–52.

82. Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood*. 2006;108:3204–9.
83. Vyoral D, Petrák J. Hepcidin: a direct link between iron metabolism and immunity. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37:1768–73.
84. Brissot P, Pietrangelo A, Adams PC, de Graaff B, McLaren CE, Loréal O. Haemochromatosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18016.
85. Powell LW, Seckington RC, Deugnier Y. Haemochromatosis. *Lancet*. 2016;388:706-16.
86. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. *N Engl J Med*. 2004;350:2383–97.
87. Bomford A. Genetics of haemochromatosis. *Lancet*. 2002;360:1673-81.
88. Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, Dixon JL, Purdie DM, Crawford DHG i sur. Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet*. 2003;361:669–73.
89. Gleeson F, Ryan E, Barrett S, Russell J, Crowe J. Hepatic iron metabolism gene expression profiles in HFE associated hereditary hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis*. 2007;38:37–44.
90. Bothwell TH, MacPhail AP. Hereditary hemochromatosis: etiologic, pathologic, and clinical aspects. *Semin Hematol*. 1998;35:55–71.
91. Gutteridge JM, Rowley DA, Griffiths E, Halliwell B. Low-molecular-weight iron complexes and oxygen radical reactions in idiopathic haemochromatosis. *Clin Sci (Lond)*. 1985;68:463–7.
92. Loréal O, Gosriwatana I, Guyader D, Porter J, Brissot P, Hider RC. Determination of non-transferrin-bound iron in genetic hemochromatosis using a new HPLC-based method. *J Hepatol*. 2000;32:727–33.
93. Turner J, Parsi M, Badireddy M. Anemia. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499994/>.
94. Newhall DA, Oliver R, Lugthart S. Anaemia: A disease or symptom. *Neth J Med*. 2020;78:104–10.
95. Massey AC. Microcytic anemia. Differential diagnosis and management of iron deficiency anemia. *Med Clin North Am*. 1992;76:549–66.
96. DeLoughery TG. Iron Deficiency Anemia. *Med Clin North Am*. 2017;101:319–32.
97. Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC, Peyrin-Biroulet L. Iron deficiency anaemia. *Lancet*. 2016;387:907–16.
98. Wang M, Xin H, Tang W, Li Y, Zhang Z, Fan L i sur. AMPK Serves as a Therapeutic Target Against Anemia of Inflammation. *Antioxid Redox Signal*. 2017;27:251–68.

99. Poggiali E, Migone De Amicis M, Motta I. Anemia of chronic disease: a unique defect of iron recycling for many different chronic diseases. *Eur J Intern Med.* 2014;25:12–7.
100. Weiss G. Pathogenesis and treatment of anaemia of chronic disease. *Blood Rev.* 2002;16:87–96.
101. Madu AJ, Ughasoro MD. Anaemia of Chronic Disease: An In-Depth Review. *Med Princ Pract.* 2017;26:1–9.
102. Weiss G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1790:682–93.
103. Vodanović M, Radman I, Mandac-Rogulj I, Roganović J, Petranović D, Valković T i sur. Smjernice Hrvatskog društva za hematologiju HLZ-a i KROHEM-a za zbrinjavanje anemije uzrokovane manjkom željeza. *Liječnički Vjesnik.* 2019;141:1–13.
104. Pagani A, Nai A, Silvestri L, Camaschella C. Hepcidin and Anemia: A Tight Relationship. *Front Physiol.* 2019;10:1294.
105. Milman NT. A Review of Nutrients and Compounds, Which Promote or Inhibit Intestinal Iron Absorption: Making a Platform for Dietary Measures That Can Reduce Iron Uptake in Patients with Genetic Haemochromatosis. *J Nutr Metab.* 2020;2020:7373498.
106. Mascitelli L, Goldstein MR. Mediterranean diet, lower body iron stores and metabolic syndrome. *Int J Clin Pract.* 2011;65:1110.
107. Barbouti A, Lagopati N, Veroutis D, Goulas V, Evangelou K, Kanavaros P, Gorgoulis VG, Galaris D. Implication of Dietary Iron-Chelating Bioactive Compounds in Molecular Mechanisms of Oxidative Stress-Induced Cell Ageing. *Antioxidants (Basel).* 2021;10:491.
108. Scarano A, Laddomada B, Blando F, De Santis S, Verna G, Chieppa M, i sur. The Chelating Ability of Plant Polyphenols Can Affect Iron Homeostasis and Gut Microbiota. *Antioxidants.* 2023;12:630.
109. Charlton RW, Jacobs P, Seftel H, Bothwell TH. EFFECT OF ALCOHOL ON IRON ABSORPTION. *Br Med J.* 1964;2:1427–9.
110. Whitfield JB, Zhu G, Heath AC, Powell LW, Martin NG. Effects of alcohol consumption on indices of iron stores and of iron stores on alcohol intake markers. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001.;25:1037–45.
111. Ferrao K, Ali N, Mehta KJ. Iron and iron-related proteins in alcohol consumers: cellular and clinical aspects. *J Mol Med (Berl).* 2022;100:1673–89.
112. Suzuki Y, Saito H, Suzuki M, Hosoki Y, Sakurai S, Fujimoto Y i sur Up-regulation of transferrin receptor expression in hepatocytes by habitual alcohol drinking is implicated in hepatic iron overload in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res.* 2002;26:26S-31S.

113. Suzuki M, Fujimoto Y, Suzuki Y, Hosoki Y, Saito H, Nakayama K i sur. Induction of transferrin receptor by ethanol in rat primary hepatocyte culture. *Alcohol Clin Exp Res.* 2004;28:98S-105S.
114. Harrison-Findik DD. Is the iron regulatory hormone hepcidin a risk factor for alcoholic liver disease? *World J Gastroenterol.* 2009;15:1186–93.
115. Harrison-Findik DD. Role of alcohol in the regulation of iron metabolism. *World J Gastroenterol.* 2007;13:4925–30.
116. Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology.* 2011;141:1572-85.
117. Milman N, Kirchhoff M. Relationship between serum ferritin, alcohol intake, and social status in 2235 Danish men and women. *Ann Hematol.* 1996;72:145–51.
118. Milman N, Byg KE, Ovesen L, Kirchhoff M, Jørgensen KSL. Iron status in Danish men 1984-94: a cohort comparison of changes in iron stores and the prevalence of iron deficiency and iron overload. *Eur J Haematol.* 2002;68:332–40.
119. Bridle K, Cheung TK, Murphy T, Walters M, Anderson G, Crawford DG i sur. Hepcidin is down-regulated in alcoholic liver injury: implications for the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006;30:106–12.
120. Ohtake T, Saito H, Hosoki Y, Inoue M, Miyoshi S, Suzuki Y, Fujimoto Y, Kohgo Y. Hepcidin is down-regulated in alcohol loading. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007;31:S2-8.
121. Harrison-Findik DD, Klein E, Crist C, Evans J, Timchenko N, Gollan J. Iron-mediated regulation of liver hepcidin expression in rats and mice is abolished by alcohol. *Hepatology.* 2007;46:1979–85.
122. Ioannou GN, Dominitz JA, Weiss NS, Heagerty PJ, Kowdley KV. The effect of alcohol consumption on the prevalence of iron overload, iron deficiency, and iron deficiency anemia. *Gastroenterology.* 2004;126:1293–301.
123. Basli A, Soulet S, Chaher N, Méryllon JM, Chibane M, Monti JP, Richard T. Wine polyphenols: potential agents in neuroprotection. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:805762.
124. Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys.* 2009;53:75–100.
125. Wang X, Li Y, Han L, Li J, Liu C, Sun C. Role of Flavonoids in the Treatment of Iron Overload. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:685364.
126. Kim EY, Ham SK, Shigenaga MK, Han O. Bioactive dietary polyphenolic compounds reduce nonheme iron transport across human intestinal cell monolayers. *J Nutr.* 2008;138:1647-51.
127. Cook JD, Reddy MB, Hurrell RF. The effect of red and white wines on nonheme-iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 1995;61:800–4.

128. Bezwoda WR, Torrance JD, Bothwell TH, Macphail AP, Graham B, Mills W. Iron absorption from red and white wines. *Scand J Haematol.* 1985;34:121–7.
129. de Lorgeril M, Salen P, Boucher F, de Leiris J, Paillard F. Effect of wine ethanol on serum iron and ferritin levels in patients with coronary heart disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2001;11:176–80.
130. Bayele HK, Balesaria S, Srail SK. Phytoestrogens modulate hepcidin expression by Nrf2: Implications for dietary control of iron absorption. *Free Radic Biol Med.* 2015;89:1192–202.
131. Tang Y, Li Y, Yu H, Gao C, Liu L, Chen S, et al. Quercetin prevents ethanol-induced iron overload by regulating hepcidin through the BMP6/SMAD4 signaling pathway. *J Nutr Biochem.* 2014;25:675–82.
132. Li J, Wang S, Duan J, Le P, Li C, Ding Y, et al. The protective mechanism of resveratrol against hepatic injury induced by iron overload in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2021;424:115596.
133. Wang H, Jiang C, Yang Y, Li J, Wang Y, Wang C, Gao Y. Resveratrol ameliorates iron overload induced liver fibrosis in mice by regulating iron homeostasis. *PeerJ.* 2022;10:e13592
134. Tang P, Wang H. Regulation of erythropoiesis: emerging concepts and therapeutic implications. *Hematology.* 2023;28:2250645.
135. Higgs DR, Roy N, Hay D. Erythropoiesis. In: *Postgraduate Haematology* [Internet]. 7. izdanje. New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd; 2015 . str. 11–20. Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118853771.ch2>
136. Gifford SC, Derganc J, Shevkoplyas SS, Yoshida T, Bitensky MW. A detailed study of time-dependent changes in human red blood cells: from reticulocyte maturation to erythrocyte senescence. *Br J Haematol.* 2006;135:395–404.
137. Kautz L, Nemeth E. Molecular liaisons between erythropoiesis and iron metabolism. *Blood.* 2014;124:479–82.
138. Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med* (Maywood). 2003;228:1–14.
139. Shih HM, Wu CJ, Lin SL. Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells. *J Formos Med Assoc.* 2018;117:955–63.
140. Zivot A, Lipton JM, Narla A, Blanc L. Erythropoiesis: insights into pathophysiology and treatments in 2017. *Mol Med.* 2018;24:11.
141. Liu Q, Davidoff O, Niss K, Haase VH. Hypoxia-inducible factor regulates hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis. *J Clin Invest.* 2012;122:4635–44.
142. Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet.* 2014;46:678–84.

143. Choi D, Schroer SA, Lu SY, Wang L, Wu X, Liu Y, i sur. Erythropoietin protects against diabetes through direct effects on pancreatic β cells. *J Exp Med*. 2010;207:2831–42.
144. Srole DN, Ganz T. Erythroferrone structure, function, and physiology: Iron homeostasis and beyond. *J Cell Physiol*. 2021;236:4888–901.
145. Coffey R, Ganz T. Erythroferrone: An Erythroid Regulator of Hepcidin and Iron Metabolism. *Hemasphere*. 2018;2:e35.
146. Kautz L, Jung G, Nemeth E, Ganz T. Erythroferrone contributes to recovery from anemia of inflammation. *Blood*. 2014;124:2569–74.
147. Sikalidis AK, Kelleher AH, Kristo AS. Mediterranean Diet. *Encyclopedia*. 2021; 1:371-87.
148. Giacosa A, Barale R, Bavaresco L, Faliva MA, Gerbi V, La Vecchia C i sur. Mediterranean Way of Drinking and Longevity. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016;56:635–40.
149. Hrelia S, Di Renzo L, Bavaresco L, Bernardi E, Malaguti M, Giacosa A. Moderate Wine Consumption and Health: A Narrative Review. *Nutrients*. 2022;15:175.
150. Giacosa A, Barale R, Bavaresco L i sur. Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice. *Eur J Cancer Prev*. 2013;22:90-95.
151. Serio F, Imbriani G, Acito M, Moretti M, Fanizzi FP, De Donno A, i ostali. Moderate red wine intake and cardiovascular health protection: a literature review. *Food Funct*. 2023;14:6346–62.
152. Rimm EB, Williams P, Fosher K, Criqui M, Stampfer MJ. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *BMJ*. 1999;319:1523–8.
153. German JB, Walzem RL. THE HEALTH BENEFITS OF WINE. *Annu. Rev. Nutr*. 2000;20:561–93.
154. Sharpe PC, McGrath LT, McClean E, Young IS, Archbold GP. Effect of red wine consumption on lipoprotein (a) and other risk factors for atherosclerosis. *QJM*. 1995;88:101–8.
155. Serafini M, Laranjinha JA, Almeida LM, Maiani G. Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *J Nutr Biochem*. 2000.;11:585–90.
156. Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr*. 1995;61:549–54.
157. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005;45:287–306.
158. López-Vélez M, Martínez-Martínez F, Del Valle-Ribes C. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2003;43:233–44.

159. Castaldo L, Narváez A, Izzo L, Graziani G, Gaspari A, Minno GD, Ritieni A. Red Wine Consumption and Cardiovascular Health. *Molecules*. 2019;24:3626.
160. Di Renzo L, Marsella LT, Carraro A, Valente R, Gualtieri P, Gratteri S, i sur. Changes in LDL Oxidative Status and Oxidative and Inflammatory Gene Expression after Red Wine Intake in Healthy People: A Randomized Trial. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:317348.
161. Gál R, Halmosi R, Gallyas F, Tschida M, Mutirangura P, Tóth K, i ostali. Resveratrol and beyond: The Effect of Natural Polyphenols on the Cardiovascular System: A Narrative Review. *Biomedicines*. 2023;11:2888.
162. Leighton F, Cuevas A, Guasch V, Pérez DD, Strobel P, San Martín A, i ostali. Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans. *Drugs Exp Clin Res*. 1999;25:133–41.
163. Maxwell S, Cruickshank A, Thorpe G. Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet*. 1994;344:193–4.
164. Cao G, Russell RM, Lischner N, Prior RL. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J Nutr*. 1998;128:2383–90.
165. Cuevas AM, Guasch V, Castillo O, Irribarra V, Mizon C, San Martin A, i sur. A high-fat diet induces and red wine counteracts endothelial dysfunction in human volunteers. *Lipids*. 2000;35:143–8.
166. Forman HJ, Davies KJA, Ursini F. How Do Nutritional Antioxidants Really Work: Nucleophilic Tone and Para-Hormesis Versus Free Radical Scavenging in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2014;66:24-35.
167. Forman HJ, Ursini F. Para-hormesis: An innovative mechanism for the health protection brought by antioxidants in wine. *Nutrition and Aging* .2014;2:117–24.
168. Yamagata K. Polyphenols Regulate Endothelial Functions and Reduce the Risk of Cardiovascular Disease. *Curr Pharm Des*. 2019;25:2443–58.
169. Harms LM, Scalbert A, Zamora-Ros R, et al. Plasma polyphenols associated with lower high-sensitivity C-reactive protein concentrations: a cross-sectional study within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort. *Br J Nutr*. 2020;123:198-208.
170. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, i ostali. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003.;107:499–511.
171. Golan R, Gepner Y, Shai I. Wine and Health-New Evidence. *Eur J Clin Nutr*. 2019;72:55–9.
172. Gepner Y, Golan R, Harman-Boehm I, Henkin Y, Schwarzfuchs D, Shelef I, i ostali. Effects of Initiating Moderate Alcohol Intake on Cardiometabolic Risk in Adults With

- Type 2 Diabetes: A 2-Year Randomized, Controlled Trial. *Ann Intern Med.* 2015;163:569–79.
173. Golan R, Shelef I, Shemesh E, Henkin Y, Schwarzfuchs D, Gepner Y, i ostali. Effects of initiating moderate wine intake on abdominal adipose tissue in adults with type 2 diabetes: a 2-year randomized controlled trial. *Public Health Nutr.* 2017;20:549-55.
174. Blomster JI, Zoungas S, Chalmers J, Li Q, Chow CK, i sur. The Relationship Between Alcohol Consumption and Vascular Complications and Mortality in Individuals With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2014;37:1353-59.
175. Drel VR, Sybirna N. Protective effects of polyphenolics in red wine on diabetes associated oxidative/nitrative stress in streptozotocin-diabetic rats. *Cell Biol Int.* 2010;34:1147-53.
176. Baliunas DO, Taylor BJ, Irving H, Roerecke M, Patra J, Mohapatra S, i ostali. Alcohol as a risk factor for type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care.* 2009;32:2123–32.
177. Beulens JWJ, van der Schouw YT, Bergmann MM, Rohrmann S, Schulze MB, Buijsse B, i sur. Alcohol consumption and risk of type 2 diabetes in European men and women: influence of beverage type and body size The EPIC-InterAct study. *J Intern Med.* 2012;272:358–70.
178. Hodge AM, English DR, O’Dea K, Giles GG. Alcohol intake, consumption pattern and beverage type, and the risk of Type 2 diabetes. *Diabet Med.* 2006;23:690–7.
179. Martin MA, Goya L, Ramos S. Protective effects of tea, red wine and cocoa in diabetes. Evidences from human studies. *Food Chem Toxicol.* 2017;109:302–14.
180. Robertson RP. Red wine and diabetes health: getting skin in the game. *Diabetes.* 2014;63:31-8.
181. Ceriello A, Bortolotti N, Motz E, Lizzio S, Catone B, Assaloni R, Tonutti L, Taboga C. Red wine protects diabetic patients from meal-induced oxidative stress and thrombosis activation: a pleasant approach to the prevention of cardiovascular disease in diabetes. *Eur J Clin Invest.* 2001;31:322-8.
182. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2010;33 Suppl 1:S62-9.
183. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care.* 2022;45:S17-38.
184. Hu FB. Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes Care.* 2011;34:1249–57.
185. Chan JCN, Malik V, Jia W, Kadowaki T, Yajnik CS, Yoon KH, i ostali. Diabetes in Asia: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *JAMA.* 2009;301:2129–40.
186. Leahy JL. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res.* 2005;36:197–209.

187. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am.* 2004;88:787–835.
188. DeFronzo RA. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes.* 2009;58:773-95.
189. Harrison AV, Lorenzo FR, McClain DA. Iron and the Pathophysiology of Diabetes. *Annu Rev Physiol.* 2023;85:339–62.
190. Hansen JB, Moen IW, Mandrup-Poulsen T. Iron: the hard player in diabetes pathophysiology. *Acta Physiol (Oxf).* 2014;210:717-32.
191. Lee HJ, Choi JS, Lee HJ, Kim WH, Park SI, Song J. Effect of excess iron on oxidative stress and gluconeogenesis through hepcidin during mitochondrial dysfunction. *J Nutr Biochem.* 2015;26:1414–23.
192. Huang J, Jones D, Luo B, Sanderson M, Soto J, Abel ED i sur. Iron overload and diabetes risk: a shift from glucose to Fatty Acid oxidation and increased hepatic glucose production in a mouse model of hereditary hemochromatosis. *Diabetes.* 2011;60:80–7.
193. Brudevold R, Hole T, Hammerstrøm J. Hyperferritinemia is associated with insulin resistance and fatty liver in patients without iron overload. *PLoS One.* 2008;3:e3547.
194. Fernández-Real JM, Peñarroja G, Castro A, García-Bragado F, Hernández-Aguado I, Ricart W. Blood letting in high-ferritin type 2 diabetes: effects on insulin sensitivity and beta-cell function. *Diabetes.* 2002;51:1000–4.
195. Liu J, Li Q, Yang Y, Ma L. Iron metabolism and type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis and systematic review. *J Diabetes Investig.* 2020;11:946–55.
196. Miao R, Fang X, Zhang Y, Wei J, Zhang Y, Tian J. Iron metabolism and ferroptosis in type 2 diabetes mellitus and complications: mechanisms and therapeutic opportunities. *Cell Death Dis.* 2023;14:186.
197. Backe MB, Moen IW, Ellervik C, Hansen JB, MandrupPoulsen T. Iron regulation of pancreatic beta-cell functions and oxidative stress. *Annu Rev Nutr.* 2016;36:241–73.
198. Najeeb T, Soomro Late MS, Fawwad A, Waris N, Nangrejo R, Siddiqui IA, i ostali. Association of Hepcidin levels in Type 2 Diabetes Mellitus treated with metformin or combined anti-diabetic agents in Pakistani population. *J Pak Med Assoc.* 2023;73:313–18.
199. Suárez-Ortegón MF, Moreno M, Arbeláez A, Xifra G, Mosquera M, Moreno-Navarrete JM, i ostali. Circulating hepcidin in type 2 diabetes: A multivariate analysis and double blind evaluation of metformin effects. *Mol Nutr Food Res.* 2015;59:2460–70.
200. Ghanim H, Abuaysheh S, Hejna J, Green K, Batra M, Makdissi A i sur. Dapagliflozin Suppresses Hepcidin And Increases Erythropoiesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105:dgaa057.

201. Fuchs Andersen C, Omar M, Glenthøj A, El Fassi D, Møller HJ, Lindholm Kurtzhals JA, i ostali. Effects of empagliflozin on erythropoiesis in heart failure: data from the Empire HF trial. *Eur J Heart Fail.* 2023;25:226–34.
202. Docherty KF, Welsh P, Verma S, De Boer RA, O'Meara E, Bengtsson O, i sur. Iron Deficiency in Heart Failure and Effect of Dapagliflozin: Findings From DAPA-HF. *Circulation.* 2022;146:980-94.
203. Busbridge M, Griffiths C, Ashby D, Gale D, Jayantha A, Sanwaiya A i sur. Development of a novel immunoassay for the iron regulatory peptide hepcidin. *Br J Biomed Sci.* 2009;66:150–7.
204. Ganz T. Erythropoietic regulators of iron metabolism. *Free Radic Biol Med.* 2019;133:69–74.
205. Piva E, Brugnara C, Spolaore F, Plebani M. Clinical utility of reticulocyte parameters. *Clin Lab Med.* 2015;35:133-63.
206. Roberts GT, El Badawi SB. Red blood cell distribution width index in some hematologic diseases. *Am J Clin Pathol.* 1985;83:222-6.
207. Miller GD, Husk J, Crouch AK, Eichner D. EPO and the athlete biological passport: Hematological results from a placebo-controlled, boosting and microdose EPO administration in male recreational athletes. *Drug Test Anal.* 2022;14:1962-73
208. Li Y, Li M, Teng Y, Zhang C, Liu Q, Hou H. The association between red cell distribution width, erythropoietin levels, and coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2018;29:74-80.
209. Harrison-Findik DD, Schafer D, Klein E, Timchenko NA, Kulaksiz H, Clemens D, i sur. Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *J Biol Chem.* 2006;281:22974–82.
210. Lesjak M, Hoque R, Balesaria S, Skinner V, Debnam ES, Srail SK, Sharp PA. Quercetin inhibits intestinal iron absorption and ferroportin transporter expression in vivo and in vitro. *PLoS One.* 2014;9:e102900.
211. Galesloot TE, Vermeulen SH, Geurts-Moespot AJ, Klaver SM, Kroot JJ, van Tienoven D, i ostali. Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood.* 2011;117:e218-25.
212. Sugiura T, Dohi Y, Takase H, Fujii S, Seo Y, Ohte N. Analytical evaluation of serum non-transferrin-bound iron and its relationships with oxidative stress and cardiac load in the general population. *Medicine (Baltimore).* 2021;100:e24722.
213. Vinchi F. Non-Transferrin-Bound Iron in the Spotlight: Novel Mechanistic Insights into the Vasculotoxic and Atherosclerotic Effect of Iron. *Antioxid Redox Signal.* 2021;35:387-414.

214. Li J, Lee DH, Hu J, Tabung FK, Li Y, Bhupathiraju SN, i ostali. Dietary Inflammatory Potential and Risk of Cardiovascular Disease Among Men and Women in the U.S. *J Am Coll Cardiol.* 2020;76:2181–93.
215. Imhof A, Woodward M, Doering A, Helbecque N, Loewel H, Amouyel P, i ostali. Overall alcohol intake, beer, wine, and systemic markers of inflammation in western Europe: results from three MONICA samples (Augsburg, Glasgow, Lille). *Eur Heart J.* 2004.;25:2092–100.
216. van Bussel BCT, Henry RMA, Schalkwijk CG, Dekker JM, Nijpels G, Feskens EJM i sur. Alcohol and red wine consumption, but not fruit, vegetables, fish or dairy products, are associated with less endothelial dysfunction and less low-grade inflammation: the Hoorn Study. *Eur J Nutr.* 2018;57:1409–19.
217. Fry MM, Liggett JL, Baek SJ. Molecular cloning and expression of canine hepcidin. *Vet Clin Pathol.* 2004;33:223–7.
218. Thachil J. The beneficial effect of acute phase increase in serum ferritin. *Eur J Intern Med.* 2016;35:e16–7.
219. Al Akl NS, Khalifa O, Errafii K, Arredouani A. Association of dyslipidemia, diabetes and metabolic syndrome with serum ferritin levels: a middle eastern population-based cross-sectional study. *Sci Rep.* 2021;11:24080.
220. Adams PC. Diabetes: Serum ferritin levels and T2DM--are body iron stores elevated? *Nat Rev Endocrinol.* 2012.;8:573–5.
221. Pham NM, Nanri A, Yi S, Kurotani K, Akter S, Foo LH, i ostali. Serum ferritin is associated with markers of insulin resistance in Japanese men but not in women. *Metabolism.* 2013;62:561–7.
222. Vari IS, Balkau B, Kettaneh A, André P, Tichet J, Fumeron F, i ostali. Ferritin and transferrin are associated with metabolic syndrome abnormalities and their change over time in a general population: Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR). *Diabetes Care.* 2007;30:1795–801.
223. Park SK, Ryoo JH, Kim MG, Shin JY. Association of Serum Ferritin and the Development of Metabolic Syndrome in Middle-Aged Korean Men. *Diabetes Care.* 2012;35:2521–6.
224. Peng YY, Uprichard J. Ferritin and iron studies in anaemia and chronic disease. *Ann Clin Biochem.* 2017;54:43–8.
225. Garcia-Casal MN, Peña-Rosas JP, Pasricha SR. Rethinking ferritin cutoffs for iron deficiency and overload. *Lancet Haematol.* 2014;1:e92-94.
226. Ho JC, Stevic I, Chan A, Lau KK, Chan HHW. Serum Ferritin Is Not Sensitive or Specific for the Diagnosis of Iron Deficiency in Patients with Normocytic Anemia. *Blood.* 2015;126:955.
227. Skikne BS, Punnonen K, Caldron PH, Bennett MT, Rehu M, Gasior GH, i sur. Improved differential diagnosis of anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: a

- prospective multicenter evaluation of soluble transferrin receptor and the sTfR/log ferritin index. *Am J Hematol.* 2011;86:923–7.
228. Coimbra S, Catarino C, Santos-Silva A. The role of adipocytes in the modulation of iron metabolism in obesity. *Obes Rev.* 2013;14:771–9.
229. Andrews M, Soto N, Arredondo-Olguín M. Association between ferritin and hepcidin levels and inflammatory status in patients with type 2 diabetes mellitus and obesity. *Nutrition.* 2015;31:51–7.
230. Ndevahoma F, Mukesi M, Dlodla PV, Nkambule BB, Nepolo EP, Nyambuya TM. Body weight and its influence on hepcidin levels in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of clinical studies. *Heliyon.* 2021;7:e06429.
231. Vuppalanchi R, Troutt JS, Konrad RJ, Ghabril M, Saxena R, Bell LN, i ostali. Serum hepcidin levels are associated with obesity but not liver disease. *Obesity (Silver Spring).* 2014;22:836–41.
232. Peters HP, Laarakkers CM, Pickkers P, Masereeuw R, Boerman OC, Eek A, i ostali. Tubular reabsorption and local production of urine hepcidin-25. *BMC Nephrol.* 2013;14:70.
233. Karamzad N, Eftekhari A, Ashrafi-Asgarabad A, Sullman MJM, Sahebkar A, Safiri S. Serum Hepcidin, the Hepcidin/Ferritin Ratio and the Risk of Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Curr Med Chem.* 2021;28:1224–33.
234. Sano M, Takei M, Shiraishi Y, Suzuki Y. Increased Hematocrit During Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Therapy Indicates Recovery of Tubulointerstitial Function in Diabetic Kidneys. *J Clin Med Res.* 2016;8:844–7.
235. Ghanim H, Abuaysheh S, Hejna J, et al. Dapagliflozin Suppresses Hepcidin And Increases Erythropoiesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105:dga057.
236. Mazer CD, Hare GMT, Connelly PW, Gilbert RE, Shehata N, Quan A i sur. Effect of Empagliflozin on Erythropoietin Levels, Iron Stores, and Red Blood Cell Morphology in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Coronary Artery Disease. *Circulation.* 2020;141:704-7.
237. Alleyne M, Horne MK, Miller JL. Individualized treatment for iron-deficiency anemia in adults. *Am J Med.* 2008;121:943-948.

8. SAŽETAK

Uvod i ciljevi istraživanja: Smanjena ekspresija hepcidina, ključnog regulatora sustavne homeostaze željeza, važan je dio patogeneze nakupljanja željeza u tijelu povezanim s konzumacijom alkohola. Visoka razina željeza predstavlja čimbenik rizika za nastanak šećerne bolesti tipa 2 (ŠBT2) jer utječe na važne sastavnice patogeneze bolesti kao što su inzulinska rezistencija, pojačana glukoneogeneza i smanjeno lučenje inzulina. Više epidemioloških istraživanja je pokazalo kako je umjerena konzumacija crnog vina povezana s nižim rizikom razvoja ŠBT2, pri čemu se naglašava uloga polifenola prisutnih u crnom vinu. Navedeni spojevi pokazuju učinke na ekspresiju hepcidina i apsorpciju željeza suprotne učincima alkohola. S obzirom na opisane fiziološke učinke hepcidina kao i njegovu potencijalnu ulogu u patofiziologiji ŠBT2, glavni cilj istraživanja bio je ispitati učinak umjerene konzumacije crnog vina na serumske koncentracije hepcidina u skupini zdravih ispitanika i u skupini ispitanika sa ŠBT2. Kako je hepcidin najvažniji čimbenik regulacije homeostaze željeza, u ovom istraživanju također je ispitano utjecaj umjerene konzumacije vina i na druge pokazatelje homeostaze željeza. Budući da je eritropoeza dominantni potrošač željeza kod ljudi, ispitao se učinak umjerene konzumacije crnog vina na glavni eritropoetski put eritropoetin-eritroferon-hepcidin.

Ispitanici i postupci: Radi se o prospektivnom, nerandomiziranom, kliničkom istraživanju učinka prehrambenog proizvoda na ispitanike. Bile su određene dvije skupine ispitanika, skupina zdravih ispitanika i skupina ispitanika sa ŠBT2 bez drugih značajnih komorbiditeta i bez anamneze ranije zlorabe alkohola. Ispitanicima je nakon njihovog pristanka nakon uvodnog razdoblja od 2 tjedna bez konzumacije alkoholnih pića određena dnevna konzumacija 300 ml studijskog crnog vina podijeljeno uz 2 dnevna obroka tijekom slijedeća 3 tjedna. Neposredno prije i poslije opisane intervencije svim ispitanicima su urađena antropometrijska mjerenja i uzorkovanje krvi te laboratorijska analiza uzoraka. Analizirane su serumske razine hepcidina, biokemijski pokazatelji statusa željeza, hematološki parametri, eritropoetski parametri te ostali značajni biokemijski parametri. Ukupno je 31 ispitanik ispunio predviđeni protokol istraživanja, od čega 13 zdravih ispitanika te 18 ispitanika sa ŠBT2.

Rezultati: Rezultati istraživanja pokazali su kako je trotjedna umjerena konzumacija crnog vina dovela do sniženja serumske koncentracije hepcidina. Statistički značajno smanjenje koncentracije serumskog hepcidina je izmjereno u skupini zdravih ispitanika ($30,0 \pm 17,3$ vs. $21,0 \pm 12,1$ ng/mL, $P = 0,045$) i u skupini ispitanika sa ŠBT2 ($17,9 [11,9-25,2]$ vs. $13,2 [8,2-18,3]$ ng/mL, $P = 0,001$). Pad serumskih koncentracija hepcidina nije se odrazio na serumsko željezo, njegove razine ostale su nepromijenjene u obje skupine, u skupini zdravih ispitanika ($P=0,328$) i u skupini ispitanika sa ŠB ($P=0,177$). Drugi značajni pokazatelji povezani sa

željezom ostali su uglavnom nepromijenjeni nakon intervencije, osim statistički značajnog pada razine feritina u skupini zdravih ispitanika (173,0 [126,4-259,8] vs. 118,0 [90,5-232,6] ng/mL, $P = 0,017$). Smanjenje hepcidina bilo je popraćeno povećanjem razine eritropoetina (10,6 [7,7-12,1] vs. 12,5 [10,2-14,1] mIU/ml, $P = 0,001$) u skupini zdravih ispitanika te (7,6 [6,4-9,4] vs. 8,9 [8,4-11,1] mIU/ml, $P = 0,024$) u skupini ispitanika sa ŠBT2, dok je povećanje eritroferona doseglo statističku značajnost samo u skupini ispitanika sa ŠBT2 ($0,044 \pm 0,075$ vs. $0,12 \pm 0,12$ ng/mL, $P = 0,028$). Veličina i smjer promjena u razinama EPO, ERFE i hepcidina kao odgovor na intervenciju s vinom nisu se razlikovala između skupina. U konačnici, primijećeno je statistički značajno povećanje RDW u obje ispitivane skupine, u skupini zdravih ispitanika ($13,0 \pm 0,5$ vs. $13,2 \pm 0,5$ %, $P = 0,013$) te u skupini ispitanika sa ŠBT2 ($13,5 \pm 0,4$ vs. $13,6 \pm 0,5$ %, $P = 0,033$) uz značajno povećanje broja retikulocita (60 ± 16 vs. $70 \pm 15 \times 10^9$, $P = 0,005$) u skupini ispitanika sa ŠBT2.

Zaključak: Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pokazuju kako promijenjena kinetika hepcidina, eritropoetina i eritroferona uz utvrđene promjene eritrocitnih parametara (RDW, retikulociti) ukazuje na aktivaciju puta eritropoetin-eritroferon-hepcidin što se može objasniti učinkom provedene intervencije, trodnevne umjerene konzumacije crnog vina. Ovo istraživanje ukazuje na novi biološki učinak vina koji bi mogao biti važan u stanjima i bolestima u podlozi kojih je poremećaj homeostaze željeza i funkcije hepcidina.

Ključne riječi: hepcidin, željezo, eritropoetin, eritroferon, crno vino, šećerna bolest tip 2.

9. SUMMARY

Title: Effect of Moderate Consumption of Red Wine on Serum Hepcidin Concentrations and Other Iron Homeostasis Parameters in Healthy Subjects and Individuals with Type 2 Diabetes

Background and aim: Reduced expression of hepcidin, a key regulator of systemic iron homeostasis, is an important element in the pathogenesis of iron accumulation in the body associated with alcohol consumption. High levels of iron are a risk factor for type 2 diabetes mellitus (T2DM) as it affects important components of the pathogenesis of the disease such as insulin resistance, increased gluconeogenesis and reduced insulin secretion. Several epidemiological studies have shown that moderate consumption of red wine is associated with a lower risk of developing T2DM, indicating potential role of the polyphenols present in red wine. These compounds exhibit effects on hepcidin expression and iron absorption opposite to those of alcohol. Given the described physiological effects of hepcidin as well as its potential role in the pathophysiology of T2DM, the main objective of the study was to examine the effect of moderate consumption of red wine on serum concentrations of hepcidin in the group of healthy subjects and in the group of subjects with T2DM. As hepcidin is the most important factor in the regulation of iron homeostasis, this study also examined the effect of moderate wine consumption on other indicators of iron balance. Since erythropoiesis is the main iron consumer in humans, the study examined how moderate red wine consumption affected the main erythropoietic pathway: erythropoietin-erythroferrone-hepcidin.

Subjects and methods: This was a prospective, non-randomized, clinical study of the effect of a food product. Two groups of participants were established, a group of healthy subjects and a group of subjects with T2DM with no other significant comorbidities and without a history of previous alcohol abuse. After a drive-in period of 2 weeks, in which consumption of any alcoholic beverage was prohibited, subjects were instructed to drink 300 mL of red wine daily, split between lunch and dinner and consumed with meals, for 3 weeks. Immediately before and after the intervention, every participant underwent anthropometric measurements and blood sampling, as well as laboratory analysis of samples. Analyzed were serum levels of hepcidin, biochemical markers of iron status, hematological parameters, erythropoietic parameters, and other important biochemical markers. A total of 31 subjects completed the study protocol, of which 13 were healthy subjects and 18 subjects were with T2DM.

Results: The results of the study showed that three weeks of moderate consumption of red wine led to a decrease in serum hepcidin concentration in both the group of healthy subjects ($30,0 \pm 17,3$ vs. $21,0 \pm 12,1$ ng/mL, $P = 0,045$) and in the group of subjects with T2DM ($17,9$ [11,9-

25,2] vs. 13,2 [8,2-18,3] ng/mL, $P = 0,001$). The decrease in serum hepcidin concentrations was not reflected in serum iron as its levels remained unchanged in both groups (healthy: $P=0.328$; diabetics: $P=0.177$). Other iron-related indicators also remained largely unchanged after the intervention, except for a statistically significant decrease in ferritin levels in the group of healthy subjects (173,0 [126,4-259,8] vs. 118,0 [90,5-232,6] ng/mL, $P = 0.017$). The decrease in hepcidin was accompanied by an increase in the level of erythropoietin in both groups, in the group of healthy subjects (10,6 [7,7-12,1] vs. 12,5 [10,2-14,1] mIU/ml, $P = 0,001$) and (7,6 [6,4-9,4] vs. 8,9 [8,4-11,1] mIU/ml, $P = 0,024$) in the group of subjects with T2DM, while the increase in erythroferrone reached statistical significance only in the group of subjects with T2DM ($0,044 \pm 0,075$ vs. $0,12 \pm 0,12$ ng/mL, $P = 0,028$). The magnitude and direction of change in the levels of EPO, ERFE and hepcidin in response to the wine intervention did not differ between groups. Finally, a statistically significant increase in RDW was observed in both study groups, in the group of healthy subjects ($13,0 \pm 0,5$ vs. $13,2 \pm 0,5$ %, $P = 0,013$) and ($13,5 \pm 0,4$ vs. $13,6 \pm 0,5$ %, $P = 0,033$) in the group of subjects with T2DM with increase in the reticulocytes count (60 ± 16 vs. $70 \pm 15 \times 10^9$, $P = 0,005$) in the T2DM group.

Conclusion: Our results indicate activation of the erythropoietin-erythroferrone-hepcidin pathway by moderate red wine consumption for 3 weeks. As an indicator of erythropoietic response to the activation of erythropoietin-erythroferrone-hepcidin pathway two significant increases were observed: of the red cell distribution width in both groups, and of the reticulocyte count in the T2DM group. This study reveals a novel biological effect of wine that may be important in conditions influencing iron homeostasis and functions of hepcidin in general.

Keywords: hepcidin, iron, erythropoietin, erythroferrone, red wine, type 2 diabetes mellitus.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Jurica Nazlić

Adresa: Smaićeva 32, Podstrana

Telefon: +38598352249

Elektronička pošta: jnazlic@gmail.com; jnazlic@kbsplit.hr

Državljanstvo: hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 27. travnja 1978., Split

IZOBRAZBA

1984. – 1992. osnovna škola

1992. – 1996. 4. gimnazija „Marko Marulić“ Split

1996. – 2002. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Područni studij u Splitu – doktor medicine

2008. – 2012. Poslijediplomski specijalistički studij „Klinička farmakologija“, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2009. – Poslijediplomski sveučilišni studij "Klinička medicina utemeljena na dokazima", Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

2012. specijalist kliničke farmakologije s toksikologijom

2018. – 2019. Poslijediplomski specijalistički studij „Endokrinologija i dijabetologija“, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2020. specijalist endokrinologije i dijabetologije

MATERINSKI JEZIK

- Hrvatski jezik

OSTALI JEZICI

- Engleski jezik (aktivno)
- Talijanski jezik

OSTALE AKTIVNOSTI

- Višegodišnji član višestruko nagrađivane klape Šufit iz Splita