

IMEVÄISIÄN OHIMENEVÄN TESTOSTERONIERITYKSEN YHTEYS
HEPSIDIINIIN JA PUNAISEEN VERENKUVAAN PIENILLÄ KES-
KOSILLA

Heljä Laitinen

Tutkielma
Lääketieteen koulutusohjelma
Itä-Suomen yliopisto
Terveystieteiden tiedekunta
Lääketieteen laitos / lastentaudit
Toukokuu 2014

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos

Lääketieteen koulutusohjelma

LAITINEN, HELJÄ T.: Imeväisiän ohimenevän testosteronierityksen yhteys hepsidiiniin ja punaiseen verenkuvaan pienillä keskosilla

Opinnäytetutkielma, 58 sivua

Tutkielman ohjaajat: Ulla Sankilampi, dosentti, lastentautien erikoislääkäri, neonatologi, oyl; Tanja Kuiri-Hänninen, LL, erikoistuva lääkäri

Toukokuu 2014

Avainsanat: Hepsidiini – testosteroni – keskonen – minipuberteetti

Vuosikymmeniä on tiedetty, että testosteroni lisää erytropoiesia. Tarkka mekanismi on kuitenkin edelleen tuntematon. Uusien tutkimusten mukaan testosteroni vaikuttaa maksan tuottamaan proteiiniin hepsidiiniin, joka säätelee rauta-aineenvaihduntaa. Hepsidiini vähentää sekä raudan imeytymistä ohutsuolesta että varastoraudan vapautumista ja siten laskee plasman rautapitoisuutta. Testosteroni estää hepsidiinin muodostumista, jolloin veren rautapitoisuus nousee. Syntymän jälkeen vastasyntyneillä aktivoituu hypotalamus-aivolisäke-sukupuolirauhanen (HPG) -akseli, minkä seurauksena sukupuolihormonipitoisuudet ovat ohimenevästi koholla. Tätä vaihetta kutsutaan minipuberteetiksi. Keskosilla HPG-akselin aktivaatio on voimakkaampi kuin täysiaikaisilla lapsilla, ja sekä pojilla että tytöillä on havaittu koholla olevia androgeenitasoja.

Tämän työn tavoitteena oli selvittää, onko minipuberteetin aikaisella testosteronierityksellä yhteyttä seerumin ja virtsan hepsidiinipitoisuuteen, rautamerkkiaineisiin, punaiseen verenkuvaan ja seerumin erytropoietiiniin (EPO). Tavoitteena oli kuvata virtsan testosteroni- ja gonadotropiinitasoa, punaisen verenkuvan muutoksia, rautamerkkiainepitoisuuksia ja hepsidiinitasoa ennen 32+0 raskausviikkoa syntyneillä pienillä keskosilla 3–9 viikon iässä.

Tutkimukseen osallistui 57 pientä keskosta, joista poikia oli 33 ja tyttöjä 24. Virtsa- ja verinäytteitä otettiin syntymän jälkeen 2 viikon välein. Tätä työtä varten analysoitiin näytteet 3, 5, 7 ja 9 viikon iässä, jolloin aiempien tutkimusten perusteella minipuberteetti on voimakkaimmillaan.

Keskosten hemoglobiinitaso laski jyrkästi ensimmäisten elinviikkojen aikana laskettua aikaa lähestyttäessä, minkä jälkeen se alkoi taas nousta. Seerumin ja virtsan hepsidiini käyttäytyivät samalla tavalla kuin hemoglobiini, mutta pysyivät lasketun ajan jälkeen varsin tasaisina. Lutenisoivan hormonin (LH) ja follikkelia stimuloiva hormonin (FSH) pitoisuudet olivat pojilla matalammat kuin tytöillä 3 viikon iästä 9 viikon ikään. Testosteronissa havaittiin merkitsevä sukupuoliero ainoastaan 9 viikon iässä, jolloin pojilla oli korkeampi testosteroni kuin tytöillä. 9 viikon iässä pojilla oli myös matalampi seerumin ferritiini kuin tytöillä sekä korkeampi seerumin ja virtsan hepsidiini. Seerumin hepsidiini korreloi negatiivisesti EPO:n kanssa 7 viikon iässä. Virtsan hepsidiini korreloi negatiivisesti EPO:n kanssa 5, 7 ja 9 viikon iässä. Testosteroni ja seerumin hepsidiini korreloivat positiivisesti 5 ja 9 viikon iässä. Testosteronilla ja EPolla ei havaittu yhteyttä.

Virtsan hepsidiini korreloi useassa aikapisteessä negatiivisesti EPO:n kanssa. Punasoluja saamattomilla pojilla havaittiin tutkimushypoteesin mukainen negatiivinen korrelaatio testosteronin ja seerumin hepsidiinin välillä 5 viikon iässä.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Health Sciences
School of Medicine
Medicine

LAITINEN, HELJÄ T.: Association of the transient testosterone secretion with hepcidin and red blood count in very preterm infants

Thesis, 58 pages

Tutors: Ulla Sankilampi, dosentti, lastentautien erikoislääkäri, neonatologi, oyl; Tanja Kuirri-Hänninen, LL, erikoistuva lääkäri

May 2014

Keywords: Hepcidin – testosterone – preterm infant – minipuberty

It has been known for decades that testosterone stimulates erythropoiesis, but the underlying mechanism is still unknown. Recent studies suggest that testosterone affects hepcidin, a protein that is produced by the liver and regulates iron homeostasis. Hepcidin reduces iron absorption in the small intestine and also reduces iron release from the storage leading to decreasing iron concentration in plasma. Testosterone suppresses hepcidin production leading to a rise in iron concentration in plasma. After birth, the hypothalamic – pituitary – gonadal (HPG) axis is activated, resulting in a transient elevation of circulating sex hormone levels. This episode is referred to as minipuberty. HPG axis activation is more pronounced in preterm infants than in full-term infants and elevated androgen levels have been found in both boys and girls.

The purpose of this work was to clarify whether testosterone secretion during minipuberty is associated with changes in serum or urine hepcidin levels, iron markers, red blood count or serum erythropoietin (EPO) in very preterm infants at the age of 3 to 9 weeks.

The study included 57 preterm infants (born before 32+0 weeks of gestation), of which 33 were boys and 24 girls. Blood and urine samples were taken after birth at every two weeks. This work included the analysis of samples at 3, 5, 7 and 9 weeks of age, at the time when the postnatal HPG-axis activation peaks.

Blood hemoglobin level decreased sharply during the first weeks of life and towards term, whereafter it began to rise again. Serum and urine hepcidin levels showed similar pattern with hemoglobin level until term, but after term levels remained relatively constant. Luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) levels were lower in boys than in girls from 3 to 9 weeks of age. The gender difference in testosterone was only observed at the age of 9 weeks with boys having higher levels than girls. At the age of 9 weeks, boys had also lower serum ferritin but higher serum and urine hepcidin than girls. Serum hepcidin correlated negatively with serum EPO at the age of 7 weeks. Urine hepcidin correlated negatively with EPO at 5 to 9 weeks of age. Serum hepcidin and testosterone correlated positively at 5 and 9 weeks of age. No correlation was found between testosterone and EPO.

Urine hepcidin correlated negatively with EPO at several time points. In boys who had not received any red blood cell transfusions there was a negative correlation between serum hepcidin and testosterone at the age of 5 weeks supporting our hypothesis.

SISÄLTÖ

1. JOHDANTO.....	6
2. PUNASOLUJEN TUOTANTO	8
2.1 Punasolujen tuotanto sikiöaikana.....	8
2.2 Hemoglobiinin vaihdos.....	10
2.3 Erytropoieesin säätely.....	12
3. ELIMISTÖN RAUTA.....	13
3.1 Rauta-aineenvaihdunnan merkkiaineet.....	13
3.2 Solukalvon raudankuljettajaproteiinit.....	13
3.3 Sikiöaikaisten rautavarastojen muodostuminen.....	14
3.4 Fysiologinen anemia ja keskosen anemia.....	16
3.5 Imeväisiän rautatasapaino.....	16
3.6 Rautatasapainon säätely.....	18
3.6.1 Hepsidiini.....	18
3.6.2 Hepsidiini raskauden aikana.....	20
3.6.3 Hepsidiini imeväisiässä.....	20
4. ANDROGEENIT ERYTROPOIEESIN JA HEPSIDIININ SÄÄTELYSSÄ.....	23
4.1 Androgeenit ja erytropoieesi.....	23
4.1.1 Androgeenien vaikutus hematopoiettiseen solukkoon.....	23
4.1.2 Erytropoieesin muutokset puberteetissa ja IGF-1-vaikutus.....	24
4.1.3 Androgeenit ja erytropoietiini.....	25
4.1.4 Testosteronin yhteys rautatasapainoon.....	26
4.2 Hepsidiini ja testosteroni.....	27
5. MINIPUBERTEETTI.....	29
6. HYPOTEESI.....	31
7. TAVOITTEET.....	32
8. AINEISTO JA MENETELMÄT.....	33
8.1 Aineisto.....	33
8.2 Menetelmät.....	33
9. TULOKSET.....	36
9.2 Rautatasapainon muutokset.....	37
9.3 Virtsan ja seerumin hepsidiinikonsentraatioiden muutokset.....	39
9.4 Sukupuolihormonit.....	40

9.5 Testosteronin ja hepsidiinin yhteys.....	43
9.6 Erytropoietiinin ja hepsidiinin yhteys.....	44
9.7 Testosteronin ja erytropoietiinin yhteys.....	44
9.8 Erot punasolusiirtoja saaneilla ja ei saaneilla pojilla.....	44
10. POHDINTA.....	47
11. JOHTOPÄÄTÖS.....	50
12. LÄHTEET.....	51

1. JOHDANTO

Rauta on välttämätön ravintoaine. Ihmisen elimistössä suurin osa raudasta on punasolujen hemoglobiinissa (Ganz 2004, Ganz ja Nemeth 2012, Gkouvatsos ym. 2012). Rautaa tarvitaan erityisesti nopean kasvun ja kehityksen aikana, kuten sikiönkehityksen aikana sekä imeväisiässä (Rao ja Georgieff 2002, Domellöf 2007, Rao ja Georgieff 2007, Collard 2009). Sikiön rautavarastot muodostuvat pääosin raskauden viimeisen kolmanneksen aikana (Rao ja Georgieff 2002; 2007). Keskokset kärsivät usein raudanpuutteesta (Rao ja Georgieff 2002, Rao ja Georgieff 2007, Collard 2009). Syntymän jälkeen varhaisessa imeväisiässä lapsi ei pysty vielä säätelemään raudan imeytymistä suolesta, koska mekanismi alkaa kehittyä vasta noin 5–6 kuukauden iässä (Domellöf 2007).

Hepsidiini on hiljattain löydetty maksan proteiini, joka säätelee systeemistä rauta-aineenvaihduntaa sitoutumalla varastorautaa sisältävän solun ferroportiini-reseptoriin, jolloin varastorauta ei siirry plasmaan. Hepsidiini sitoutuu myös ohutsuolen epiteelisolun ferroportiini-reseptoriin, mikä estää raudan imeytymistä. Hepsidiini laskee plasman rautapitoisuutta (Domellöf 2007, Collard 2009, Kroot ym. 2011, Ganz ja Nemeth 2012, Gkouvatsos ym. 2012). Hepsidiinin erityksen säätelyyn vaikuttavat mm. erythropoiesiaktiivisuus ja elimistön rautavarastot (Ganz 2004, Collard 2009, Kroot ym. 2011, Ganz ja Nemeth 2012, Gkouvatsos ym. 2012). Toisaalta myös inflammaatio ja infektio vaikuttavat hepsidiinin eritykseen (Müller ym. 2012, Basseri ym. 2013, Cangemi ym. 2013). Hepsidiinin merkitystä vastasyntyneen rauta-aineenvaihdunnan säätelyssä ei vielä tunneta (Collard 2009). Seerumin hepsidiini kuitenkin reagoi rautatasapainoon jo 12 viikon ikäisillä lapsilla (Berglund ym. 2011). Keskosilla hepsidiinitaso on matalampi kuin täysiaikaisilla vastasyntyneillä (Müller ym. 2012).

Miehillä on korkeampi hemoglobiinitaso kuin naisilla. Ero syntyy murrosiässä (Shahani ym. 2009). Testosteroni aktivoi miehillä punasolumuodostusta (Coviello ym. 2008, Maggio ym. 2013, Bachman ym. 2014). Miehillä lääkkeenä annettu testosteroni alentaa seerumin hepsidiinitasoa annosriippuvaisesti (Bachman ym. 2010). Hiirikokeissa on havaittu, että testosteroni estää hepsidiinin transkriptiota (Guo ym. 2013, Latour ym. 2014). Syntymän jälkeen imeväisillä aktivoituu HPG-akseli (Forest ym. 1974, Forest ym. 1980, Shinikawa ym. 1983, Forest ja Ducharme 1993, Andersson ym. 1998, Chellakooty ym. 2003, Grumbach 2005, Jospe 2006, Kuiri-Hänninen ym. 2011a, Kuiri-Hänninen ym. 2011b, de Jong ym. 2012, de Jong ym. 2013). Keskosilla aktivaatio on voimakkaampi kuin täysiai-

kaisilla vastasyntyneillä (Shinkawa ym. 1983, Kuiri-Hänninen ym. 2011a, Kuiri-Hänninen ym. 2011b). Tapahtumaa kutsutaan minipuberteetiksi, jonka aikana imeväisillä on veressä korkeat gonadotropiinitasot (Grumbach 2005). Pojilla myös testosteronipitoisuus nousee (Forest ym. 1974, Forest ym. 1980, Forest ja Ducharme 1993, Andersson ym. 1998, Grumbach 2005, Kuiri-Hänninen ym. 2011b). Tässä työssä oli tavoitteena selvittää, onko keskosten minipuberteetin aikainen androgeenitasojen nousu yhteydessä hepsidiinitasoihin ja heijastuuko tämä elimistön rautatasapainoa kuvaavissa merkkiaineissa ja punaisessa verenkuvassa.

2. PUNASOLUJEN TUOTANTO

Punasolut syntyvät myelooisen solulinjan kautta. Tapahtumaa kutsutaan erytropoiesiksi. Myelooisiin kantasoluihin kuuluu useita erilaisten kantasolulinjan soluja. Osa näistä erilaistuu suoraan erytroidiseen solulinjaan (BFU-E) ja osa megakaryosyytti-erytroidisen kantasolun kautta. BFU-E-vaiheesta punasolujen muodostumiseen kuluu noin 2 viikkoa (Siitonen ja Koistinen 2007). Erytroidiseen linjaan suuntautuneet kantasolut kypsyvät edelleen CFU-E-kantasoluiksi (Siitonen ja Koistinen 2007, Lodish ym. 2010). Varsinaisten punasolujen kypsyminen jaetaan 6 vaiheeseen. Kypsymisen aikana solujen koko pienenee, tuma tiivistyy kunnes häviää, hemoglobiinituotanto lisääntyy ja solu menettää jakautumiskykynsä. Retikulosyytti on ensimmäinen tumaton punasolun erilaistumisvaihe ja viimeinen kehitysvaihe ennen kypsää punasolua. Retikulosyytit ovat muutaman päivän luuytimessä, minkä jälkeen ne siirtyvät verenkierron mukana pernaan. Pernassa ne kypsyvät edelleen muutaman päivän ajan, minkä jälkeen ne siirtyvät kypsinä punasoluina verenkiertoon (Siitonen ja Koistinen 2007).

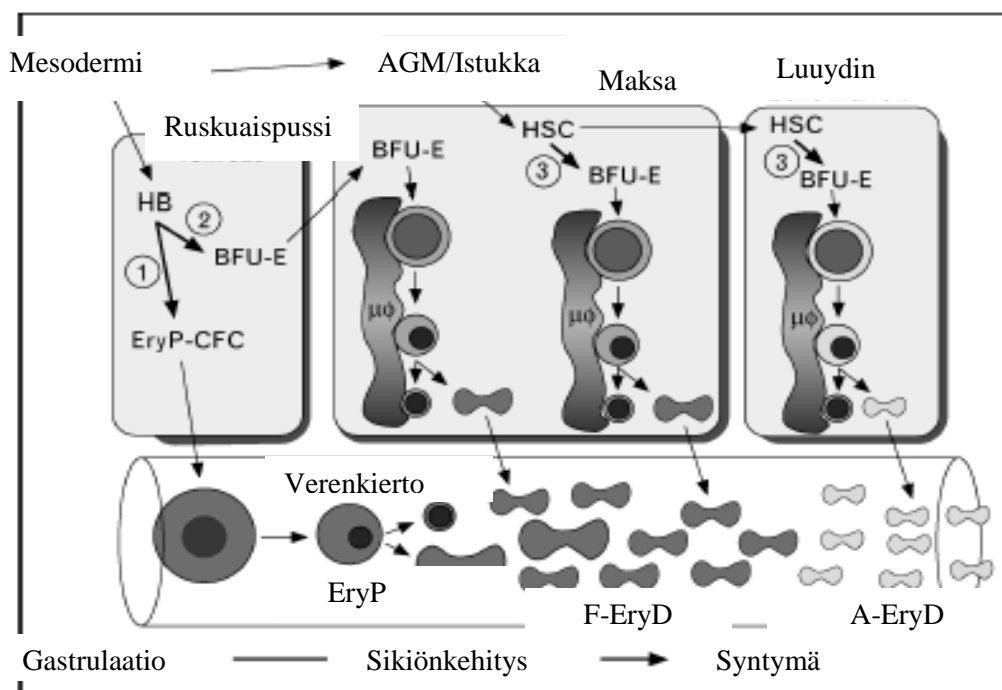
2.1 Punasolujen tuotanto sikiöaikana

Sikiön verisolut syntyvät mesodermistä. Gastrulaatiossa epäkypsät punasoluaiheet kerääntyvät ruskuaispussissa saarekkeiksi. Kun endoteelisolut reunustavat verisolusaarekkeet, muodostuu ruskuaispussin ensimmäinen suonipunos. Pitkään ajateltiin, että verisolut ja verisuonten seinämien solut syntyvät erilaistumalla yhteisen hemangioblastisen esiasteen kautta. Kuitenkin uuden tutkimusnäytön mukaan on todennäköistä, että hemangioblastisista esiasteista muodostuu hematopoieettisia kantasoluja, kun taas ainakin osa verisuonten seinämäsoluista muodostuu angioblastisista esiasteista (Palis 2008).

Nisäkkäiden punasolumuodostuksen kypsyminen sikiöaikana voidaan jakaa 3 kehitysvaiheeseen (kuva 1). 1. vaiheessa ihmisalkion raskauden keston ollessa 3–4 viikkoa ruskuaispussin hemangioblastisista esiasteista (HB) muodostuu blastinkaltaisia primitiivisiä erytroidisia esiasteita (EryP-CFC). Ne lisääntyvät ja siirtyvät verenkiertoon, jolloin ne menettävät jakaantumiskykynsä. Solut kypsyvät ja erilaistuvat verenkierrossa enukleaatiovaiheeseen, jolloin niistä muodostuu alkiokautisia erytrosyyttejä (EryP). Tätä tapahtumaa kutsutaan alkiokautiseksi erytropoiesiksi. Raskauden edetessä sikiön kasvuun ja kehitykseen vaaditaan enemmän punasoluja, jolloin käynnistyy sikiökautinen erytropoiesi. Sen 2. vaihe alkaa ihmisikiöllä noin 4. raskausviikolla. Tässä vaiheessa ruskuaispussissa muodostuu BFU-E-soluja. Sikiökautinen erytropoiesi siirtyy kehittyvään maksaan, josta on löydetty

BFU-E-soluja noin 5.–6. raskausviikon kohdalla. Ne lisääntyvät ja kypsyvät sikiön maksassa. E nukleaation myötä muodostuvat varsinaiset sikiökautiset punasolut (F-EryD), jotka siirtyvät sikiön verenkiertoon (Palis 2008, Baron 2013). Maksan erytropoieesi aktivoituu keskiraskauden jälkeen. Alkiokautinen ja sikiökautinen erytropoieesi ovat tässä vaiheessa osin päällekkäiset ja sikiön verenkierron EryP-solut korvautuvat F-EryD-soluilla (Baron 2013).

3. punasolumuodostuksen kehitysvaihe tapahtuu loppuraskaudessa. Sen kautta syntyvät punasolut ovat joko F-EryD-soluja tai aikuistyyppisiä punasoluja (A-EryD). F-EryD-solut syntyvät maksassa ja A-EryD:t luuytimessä. 3. vaiheessa punasolujen kehitys alkaa aikuistyyppisistä hematopoieettisista kantasoluista (HSC) (Palis 2008). Näiden solujen ajatellaan syntyvän aorta–sukurauhaset–mesonefroni-alueella (AGM), istukassa ja suurten suonien ympärillä. Ne leviävät sikiön maksaan, luuytimeen, pernaan ja kateenkorvaan, joissa hematopoieesi tapahtuu (Baron 2013). Sikiön maksassa BFU-E-linjan kautta syntyy F-EryD-soluja. Luuytimessä käynnistyy erytropoieesi, josta syntyy BFU-E-soluja ja edelleen A-EryD-soluja. F-EryD- ja A-EryD-solut kypsyvät kudoksissa erytroblastisaarekkeissa kosketuksissa toisiinsa, makrofageihin ja stroomasolukkaan, minkä merkitystä ei vielä tiedetä (Palis 2008, Baron 2013). Sikiön kehityksen aikana luuytimestä muodostuu tärkein verisoluja tuottava elin. Hematopoieettiset kantasolut sijaitsevat pääosin syntyvän lapsen luuytimessä. Lapsella verisoluja muodostetaan kaikkien luiden luuydinontelossa (Siitonen ja Koistinen 2007).



KUVA 1. Yksinkertaistettu kuva nisäkkään punasolumuodostuksen kypsymisestä sikiönkehityksen aikana.

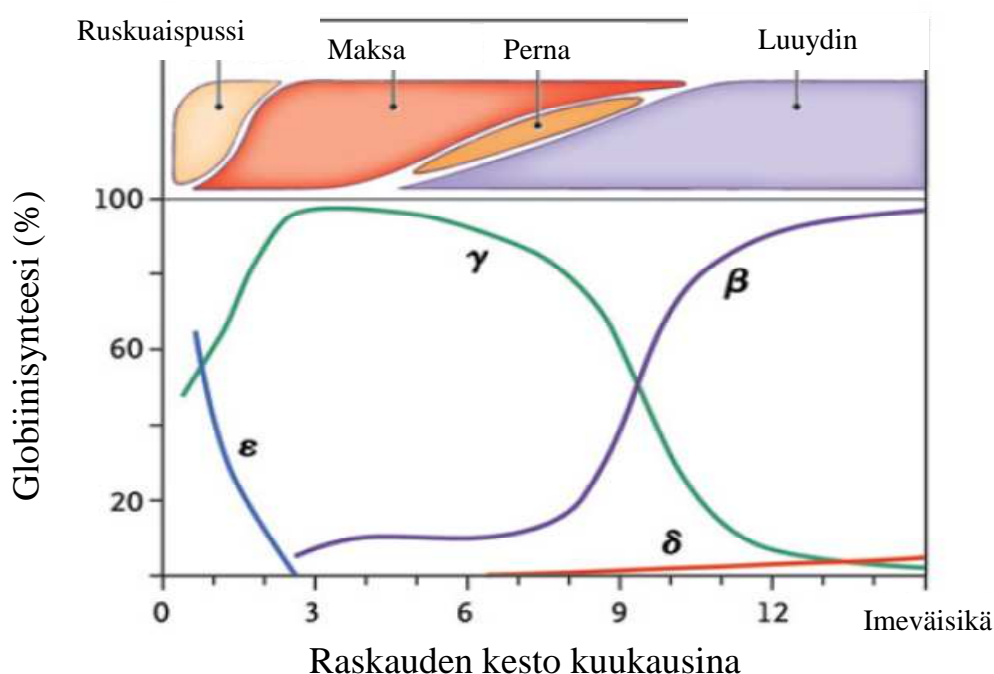
Muokattu lähteestä: Palis J. Ontogeny of erythropoiesis. Erythropoiesin ontogeneesi. Curr Opin Hematol 2008;15:155-161.

2.2 Hemoglobiinin vaihdos

Aikuistyyppinen hemoglobiinimolekyyli (HbA) koostuu 2:sta α - ja 2:sta β -polypeptidiketjusta (Sankaran ja Nathan 2010, Sankaran ym. 2010). Hemoglobiinin rakenne muuttuu 1. kerran (Hb-switch) sikiönkehityksen aikana punasolumuodostuksen kypsyessä alkioaikaisesta sikiöaikaiseen erythropoieesiin (Palis 2008, Sankaran ja Nathan 2010, Sankaran ym. 2010). Alkioaikaisessa erythropoieesissa esiintyy hemoglobiinin ϵ -polypeptidiketju (Palis 2008, Sankaran ja Nathan 2010, Sankaran ym. 2010). Sikiöaikainen hemoglobiini (HbF) koostuu 2:sta aikuistyyppin α - ja 2 sikiöaikaisesta γ -polypeptidiketjusta (Sankaran ja Nathan 2010). Diabetesta sairastavien äitien raskauksissa ϵ -globiiniketju säilyi raskauden viimeiselle kolmannekselle asti ja γ -globiiniketjun osuus oli suurempi kuin verrokkiryhmässä (Al-Mufti ym. 2004). 2. muutos hemoglobiiniketjun rakenteessa tapahtuu imeväisiässä HbF:n muuttuessa HbA:ksi, mikä tapahtuu 6 kuukauden ikään mennessä

(Sankaran ym. 2010). HbF:n osuus on suurin alkuraskauden aikana ja vähenee raskauden edetessä (Bard ym. 1970, Bard 1975, Shiao ja Ou 2006) (kuva 2).

Keskosilla on havaittu, että syntymä ei vaikuta hemoglobiinin muuttumiseen. Syntymästä riippumatta hedelmöityksen jälkeiselle viikolle 37 asti suurin osa hemoglobiinista on sikiöaikaista muotoa (Bard 1973). Bard ym. (1970) osoittivat, että vastasyntyneillä, jotka olivat kärsineet kohdunsisäisestä kasvuhäiriöstä, on suurempi HbF-osuus kuin normaalipainoisena samoilla raskausviikoilla syntyneillä. Sukupuoli tai etninen tausta ei vaikuta hemoglobiinin osuuksiin (Shiao ja Ou 2006). Syntymän jälkeisen hemoglobiinin vaihdoksen merkitystä ei vielä tunneta, ja se on ihmisrodulla ainutlaatuinen muihin nisäkkäisiin verrattuna. Sen säätelyyn vaikuttavat useat transkriptiofaktorit (Sankaran ym. 2010).



KUVA 2. Hemoglobiiniten muuttuminen raskauden keston mukaan.

Muokattu lähteestä: Sankaran VG, Nathan DG. Reversing the hemoglobin switch. Hemoglobiinin käänteinen vaihtuminen. N Engl J Med 2010;363:2258-2260.

2.3 Erytropoieesin säätely

Erythropoietiini (EPO) on tärkein erytropoieesia tehostava hormoni (Lodish ym. 2010, Haase 2013). Aikuisilla EPOa tuottaa pääasiassa munuainen, mutta myös maksa osallistuu tuotantoon. Sikiöaikana maksa on tärkein EPOa tuottava elin (Haase 2013). EPO:n päävaikutus kohdistuu CFU-E-vaiheen kantasoluihin sekä varhaisvaiheen erythroblasteihin, jotka eivät vielä syntetisoi hemoglobiinia (Lodish ym. 2010, Haase 2013). Hiiritutkimuksessa ihmisen rekombinantti EPO- β lisäsi luuytimen ja pernan CFU-E-solukkoa (Sasaki ym. 2012). Uusien tutkimusten mukaan myös soluvälitilan fibronektiini osallistuu erytropoieesin säätelyyn yhdessä EPO:n kanssa (Lodish ym. 2010). Hypoksian aikaansaamat tekijät (hypoxia-inducible factors, HIFs) lisäävät EPO:n tuotantoa ja tehostavat raudan imeytymistä suolesta. Lisäksi ne tehostavat raudan käyttöä. Luuytimessä HI-tekijät saavat aikaan erytroidisten esiasteiden kypsymisen ja jakautumisen. Hypoksia lisää luuytimessä EPO-reseptorien (EPOR) ilmentymistä ja vaikuttaa hemoglobiinin synteesiin. Pienet rautavarastot vähentävät HIF-2:n kautta EPO:n tuotantoa (Haase 2013). Hiirillä hematokriitti (Hkr) vaikutti oleellisesti EPO-tuotantoon (Koury ym. 1989). Hemoglobiini korreloi EPOon myös imeväisillä. Terveillä imeväisillä havaittiin EPO:n itsenäinen negatiivinen korrelaatio rautavarastoihin. EPO-aktiivisuus nousi raudanpuutteessa jo ennen kuin hemoglobiini oli laskenut (Berglund ym. 2011).

EPO:n lisäksi muutkin tekijät osallistuvat erytropoieesin säätelyyn. BFU-E-vaiheen kantasoluja säätelevät mm. insuliinin kaltainen kasvutekijä (IGF-1), kantasolutekijä (SCF), kortikosteroidit ja interleukiinit (IL-3 ja IL-6). Äkillinen punasolujen menetys johtaa ns. stressierytropoieesiin, jota säätelevät EPO:n lisäksi SCF ja glukokortikoidit (Lodish ym. 2010). Tutkimusten mukaan reniini–angiotensiini-järjestelmä (RA) osallistuu verenpaineen säätelyn ohella myös erytropoieesin säätelyyn. Angiotensiini-2 toimii kasvutekijänä erytroidisille esiasteille, tehostaa EPO:n eritystä ja yhdessä EPO:n kanssa lisää punasolujen määrää. Muita erytropoieesin säätelyyn osallistuvia tekijöitä ovat granulosityttimakrofagikasvutekijä (GM-CSF), TNF- α ja interferoni- γ (Vlahakos ym. 2010). Napaverta tutkittaessa useat steroidit ja kilpirauhashormonit vaikuttivat punasolujen esiasteiden proliferaatioon ja erilaistumiseen (Leberbauer ym. 2005).

3. ELIMISTÖN RAUTA

Ihmiselimistöön tulee rautaa ravinnon mukana. Elimistön rautaa myös kierrätetään. Aikuisella kokonaisrautamäärä on noin 3–5 g, josta suurin osa on punasolujen hemoglobiinissa. Ferritiini on raudan varastoproteiini. Varastorautaa on pääasiassa maksassa hepatosyyteissä sekä makrofageissa pernan punaisessa ytimestä. Hedelmällisessä iässä olevan naisen rautavarastot ovat pienemmät kuin miesten. Plasmassa rauta on sidottuna transferriniin (Tf), jota muodostuu pääosin maksassa. Kudokset ja erytropoiesi käyttävät Tf:iin sitoutunutta rautaa (Ganz 2004, Ganz ja Nemeth 2012, Gkouvatsos ym. 2012). Tf:iin sitoutunut rauta siirtyy soluun reseptorivälitteisen endosytoosin kautta (Gkouvatsos ym. 2012). Elimistö menettää rautaa pienten vuotojen, suolen ja ihon epiteelisolujen hilseilyn myötä sekä hedelmällisessä iässä olevien naisten kuukautisvuotojen yhteydessä (Ganz 2004, Ganz ja Nemeth 2012, Gkouvatsos ym. 2012).

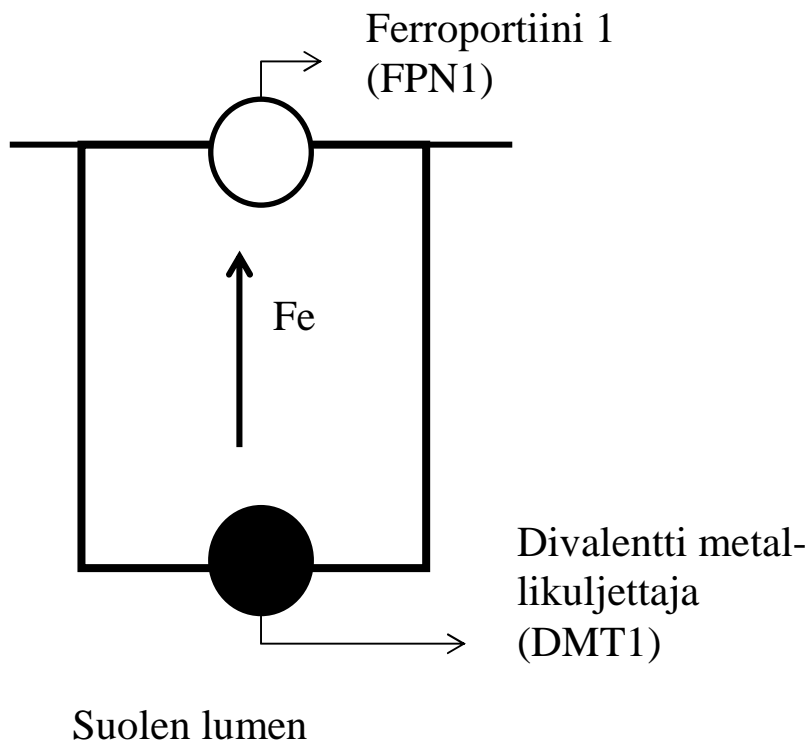
3.1 Rauta-aineenvaihdunnan merkkiaineet

Tf ja maidon laktoferrini ovat rautaa sitovia glykoproteiineja. Transferrinin saturaatio kuvaa elimistön rautavarastoja. Se tarkoittaa Tf:n rautakylläisyyttä ja on normaalitilanteessa 15–45 %. Transferrinireseptorit (TfR) sijaitsevat solukalvolla. TfR-määrä on suurin soluissa, jotka tarvitsevat paljon rautaa (Gkouvatsos ym. 2012). Raudanpuuteanemiassa seerumin TfR-pitoisuus suurenee. Seerumin rauta ja Tf eivät ole luotettavia raudanpuutteen merkkiaineita anemiatilailta (Punnonen ym. 1997). Elimistön rautatasapainon mittareina käytetään hemoglobiinia, seerumin ferritiiniä ja seerumin TfR:a (S-TfR) (Domellöf 2007). Ferritiini lisääntyy myös infektioiden ja inflammaation yhteydessä, mikä rajoittaa sen käyttöä (Punnonen ym. 1997, Domellöf 2007). TfR sen sijaan oli hyvä raudanpuutteen mittari myös infektioiden ja inflammatorisissa tiloissa. Tutkijat ovat ehdottaneet, että TfR:n ja ferritiinin logaritmin suhde (TfR-F) olisi paras raudanpuutteen mittari. Sukupuolieroa ei ole havaittu seerumin ferritiinissä eikä TfR:ssa anemiatilailta (Punnonen ym. 1997).

3.2 Solukalvon raudankuljettajaproteiinit

Ferroportiini on solukalvolla sijaitseva raudan kuljettajaproteiini. Ferroportiineja on löydetty ohutsuolen alkuosan enterosyyttien basolateraalista solumembraaneilta, pernan ja maksan makrofageista sekä hepatosyyteistä. Lisäksi niitä on löydetty keuhkoista, munuais-tubuluksista ja luuytimen erytrosyyttisistä esiasteissa. Ohutsuolen alkuosan enterosyyttien apikaalisella solumembraanilla on oma raudankuljettaja DMT1 (divalent metal 1 transpor-

ter), joka vastaa raudan imeytymisestä suolen lumenista enterosyyttiin. Tämän kuljettajan toimintaa säätelevät elimistön rautavarastot sekä basolateraalisen membraanin ferroportiini (FPN1) (Ganz ja Nemeth 2012) (kuva 3).



KUVA 3. Yksinkertaistettu kuva suolen enterosyyttistä ja raudankuljettajista.

3.3 Sikiöaikaisten rautavarastojen muodostuminen

Sikiön rautavarastot muodostuvat pääosin raskauden viimeisen kolmanneksen aikana. Rauta siirtyy aktiivisesti istukan kautta sikiöön. Sikiön rautavarastojen muodostumista säätelee raudan tarve. Yli 70 % sikiön rautamäärästä on sidottuna hemoglobiiniin. Muu rauta on varastorautana tai osana toiminnallisia proteiineja, kuten sytokromeissa ja myoglobiinissa (Rao ja Georgieff 2002; 2007). Sikiön maksa muodostaa Tf:a, jonka määrä lisääntyy syntymään asti, minkä jälkeen se jää korkealle tasolle (Gkouvatsos ym. 2012). Keskosilla havaittiin seerumin Tf:n lisääntyminen raskauden keston pidentyessä (Lackmann ym. 1998). Raskauden aikana sikiön raudanpuute on yleisempää kuin raudan liiallinen kertyminen (Rao ja Georgieff 2002; 2007). Sikiön rautavarastoja ei pystytä luotettavasti mittaamaan. Mahdollisesti heti syntymän jälkeen mitattu ferritiini kuvastaa parhaiten raskauden aikana kerrytettyjä rautavarastoja. Toisaalta ferritiini reagoi myös inflammatioon (Rao ja

Georgieff 2007), ja onkin esitetty, ettei se käy keskosten rautavarastojen mittariksi (Mäkelä ym. 2008).

Hiljattain tehdyssä tutkimuksessa osoitettiin, että täysiaikaisilla kohdunsisäisestä kasvuhäiriöstä kärsineillä (IUGR) vastasyntyneillä oli raudanpuute verrattuna normaalipainoisiin vastasyntyneisiin. IUGR-ryhmässä napaveren ferritiinipitoisuus oli matalampi ja EPO- sekä TfR-pitoisuudet olivat korkeammat verrattuna normaalipainoisiin vastasyntyneisiin (Briana ym. 2013). Länsimaissa täysiaikaisena syntyneiden lasten raudanpuute johtuu yleensä äidin diabeteksesta tai kohonneesta verenpaineesta, joka aiheuttaa IUGR:n. Tiloihin liittyy krooninen kohdunsisäinen hypoksia ja kompensatorisesti kiihtynyt erytropoiesi, jolloin sikiön raudantarve kasvaa. Istukan toiminta ja raudankuljetus häiriintyy, mikä estää adekvaatin rautavarastojen täytön raskauden aikana (Rao ja Georgieff 2002; 2007). Raskauden aikainen tupakointi vaikuttaa samalla tavalla (Rao ja Georgieff 2007). Kehittyvissä maissa äidin raudanpuute on sikiön raudanpuutteen yleinen syy (Rao ja Georgieff 2002; 2007). Kohdunsisäinen verenvuoto on harvinainen syy sikiön raudanpuutteeseen (Rao ja Georgieff 2002).

Keskokset ovat täysiaikaisia vastasyntyneitä alttiimpia rauta-aineenvaihdunnan häiriöille, koska raskauden kesto on lyhempi (Rao ja Georgieff 2002; 2007). Keskosilla on syntyessään pienemmät rautavarastot kuin täysiaikaisilla lapsilla (Sweet ym. 2001, Rao ja Georgieff 2002, Collard 2009). Täysiaikaisilla lapsilla on syntyessään korkeampi hemoglobiini sekä seerumin ferritiini kuin keskosilla (Rao ja Georgieff 2002, Rao ja Georgieff 2007, Mäkelä ym. 2008, Takala ym. 2010). Sweetin ym. (2001) tutkimuksessa seerumin rauta ja ferritiini olivat korkeampia täysiaikaisilla lapsilla kuin keskosilla, mutta raskauden kesto ei vaikuttanut hemoglobiiniin. Retikulosyyttien määrä laski raskauden keston pidentyessä (Sweet ym. 2001). Suomalaisessa tutkimuksessa keskosten retikulosyyttien hemoglobiinipitoisuus oli suurempi kuin täysiaikaisilla lapsilla (Makela ym. 2008, Takala ym. 2010). Keskosilta tutkittiin syntymän jälkeen rautatasapainoa, jolloin sukupuolieroa ei havaittu seerumin raudassa eikä ferritiinissä, mutta pojilla seerumin Tf oli korkeampi kuin tytöillä (Lackmann ym. 1998).

3.4 Fysiologinen anemia ja keskosan anemia

Hemoglobiini laskee pian syntymän jälkeen, kun erytropoieesi hidastuu, sikiöaikaiset punasolut hajoavat ja verisuonten tilavuus kasvaa (Rao ja Georgieff 2007). Vastasyntyneillä seerumin rautapitoisuus nousee sikiöaikaisten punasolujen hemolysoituessa (Rao ja Georgieff 2007, Collard 2009). HbF luovuttaa herkemmin rautaa kuin HbA (Collard 2009). Syntymän jälkeistä hemoglobiinin laskua kutsutaan fysiologiseksi anemiaksi, jolloin hemoglobiini laskee 30–50 %. Täysiaikaisilla lapsilla hemoglobiini on matalimmillaan 6–8 viikon iässä (Rao ja Georgieff 2007). Täysiaikaisilla vastasyntyneillä rautaparametrit, hemoglobiini, Hkr, punasolujen keskitilavuus (MCV) ja retikulosyytit ovat korkeimmillaan ensimmäisellä elinvuorokaudella, jonka jälkeen ne laskevat (Takala ym. 2010). Vastaavasti Mäkelän ym. (2008) keskostutkimuksessa hemoglobiini, Hkr, TfR ja ferritiini olivat korkeimmillaan syntymässä ja laskevat pian syntymän jälkeen. Keskosilla hemoglobiini laskee voimakkaammin syntymän jälkeen kuin täysiaikaisilla lapsilla ja puhutaan keskosan anemiasta (Rao ja Georgieff 2007). Syntymän jälkeinen fysiologinen anemia ja edelleen erytropoieesin aktivoituminen alkaa keskosilla 1–2 kuukautta aiemmin kuin täysiaikaisilla lapsilla (Rao ja Georgieff 2002).

3.5 Imeväisiän rautatasapaino

Ihmisen suurin raudantarve on imeväisajan loppupuolella, ja sen ajatellaan johtuvan nopeasta kasvusta (Domellöf 2007). Imeväisiässä 25–85 %:lla keskosina syntyneistä on jossain vaiheessa raudanpuute. Verinäytteiden otot, EPO:n anto ja riittämätön rautakorvaus altistavat keskoset raudanpuutteelle. Keskoset tarvitsevat rautaa myös nopeaan kasvuun (Rao ja Georgieff 2002; 2007). Imeväisiässä pojilla on suurempi riski kuin tytöillä kehittää raudanpuuteanemia (Domellöf ym. 2002, Wieringa ym. 2007). On esitetty, että seerumin ferritiini olisi imeväisikäisillä mahdollisesti hemoglobiinia parempi rautatasapainon mittari (Hicks ym. 2006, Domellöf 2007).

Aikuisilla tunnetaan suolen enterosyytin apikaalisella puolella ainoastaan yksi raudan kuljettajamolekyylillä DMT1 (Domellöf 2007) (Kuva 3). Tämä aktiivinen kuljettaja on myös vastasyntyneillä tärkein raudankuljettaja (Collard 2009). Imeväisikäisten lasten sekä sikiöiden suolesta on löydetty lisäksi laktoferriniinireseptori, joka voi liittyä raudan imeytymiseen (Domellöf 2007). Reseptorin merkitystä ihmisillä ei vielä tunneta (Domellöf 2007, Collard 2009). Rintamaidon sisältämä rauta on pääasiassa sitoutunut laktoferriniiniin. Imeväisikäisillä raudan hyötyosuudesta 50 % tulee rintamaidosta ja 10 % muusta ruuasta (Do-

mellöf 2007). Laktoferriini myös sitoo suolessa vapaata rautaa ja siten vähentää sen imeytymistä (Collard 2009).

Eläinkokeissa on havaittu, että suolen enterosyytin DMT1 ja FPN1 reagoivat elimistön rautatasapainoon vasta myöhemmässä imeväisiässä (Leong ym. 2003). Pienten imeväisten kyvyttömyys säädellä suolen kautta imeytyvän raudan määrää altistaa heidät ravinnon rautapitoisuuden mukaan joko raudanpuutteelle tai raudan liialliselle imeytymiselle (Collard 2009). Hicksin ym. (2006) tutkimuksessa perulaiset raudanpuutteesta kärsivät lapset pysyvät jo 5–6 kuukauden iässä lisäämään raudan imeytymistä suoletta. Seerumin ferritiini sääteli raudan imeytymistä. Sen sijaan hemoglobiini ei vaikuttanut raudan imeytymiseen (Hicks ym. 2006). Toisaalta raudan imeytyminen suoletta ei kuitenkaan vähene rautalisää saavilla imeväisillä yhtä tehokkaasti kuin aikuisilla (Domellöf 2007). Eläinkokeissa kuitenkin maksan DMT1-geeni-ilmentyminen reagoi elimistön rautatasapainoon varhaisessa vaiheessa syntymän jälkeen. Tutkijat ehdottivat, että vastasyntyneisyyskauden alussa maksa voi säädellä rautatasapainoa (Leong ym. 2003).

Domellöf ym. (2002) tutkivat ruotsalaisten ja hondurasilaisten täysiaikaisten lasten rautatasapainoa 4–9 kuukauden iässä. Tutkimuksessa imeväisiän rautatasapainossa oli olennainen sukupuoliero 4, 6 ja 9 kuukauden iässä. Hemoglobiini, MCV ja ferritiini olivat pojilla matalammat kuin tytöillä. Lisäksi TfR oli pojilla korkeampi kuin tytöillä. Pojat olivat tyttöjä alttiimpia raudanpuutteen kehittymiselle. Tutkimuksessa havaittiin, että 9 kuukauden iässä riippumatta rautakorvauksesta ruotsalaisilla ja hondurasilaisilla pojilla oli matalampi MCV kuin tytöillä. Lisäksi ruotsalaisilla pojilla oli matalampi ferritiinipitoisuus 9 kuukauden iässä kuin tytöillä riippumatta rautakorvauksesta. Tutkijoiden mukaan raudanpuute, kasvu eikä ravinto selittänyt tätä, vaan mahdollisesti se johtuu toistaiseksi tuntemattomista geneettisistä tai hormonaalisista tekijöistä (Domellöf ym. 2002).

Samansuuntaisia tutkimustuloksia saivat Wieringa ym. (2007), kun he tutkivat rautatasapainoa imeväisillä Indonesiassa, Thaimaassa ja Vietnaminissa. Heidän tutkimuksessaan pojilla oli 5 kuukauden iässä hieman matalampi hemoglobiini ja selvästi matalampi ferritiini kuin tytöillä. Pojilla oli myös matalammat hemoglobiini- ja ferritiini-pitoisuudet kuin tytöillä 11 kuukauden iässä ryhmässä, joka ei saanut rautalisää. Rautalisä nosti hemoglobiinitasoa pojilla ja tytöillä. Raudanpuuteanemia korjaantui rautalisällä, mutta 29 % lapsista jäi aneemisiksi rautakorvauksen jälkeen. Tutkijat esittivät sen johtuvan mahdollisesti talassemioista, vitamiinipuutoksesta tai kroonisesta inflammaatiosta (Wieringa ym. 2007).

Takala ym. (2010) tutkivat keskosten ja täysiaikaisten lasten verenkuvaa ja rautatasapainoa määrittääkseen viitearvoja. Tutkimus tehtiin ensimmäisen elinvuoden aikana 20 viikon iästä 12 kuukauden ikään asti ja keskokset saivat rautalisää (n. 2 mg/kg/vrk). Keskosilla oli matalampi keskimääräinen hemoglobiini ja Hkr 20 viikon iässä kuin täysiaikaisilla lapsilla. Kuitenkin jo 30 viikon iästä alkaen keskosena syntyneillä oli korkeampi keskimääräinen hemoglobiini kuin täysiaikaisena syntyneillä. Keskosilla punasolujen määrä lisääntyi iän myötä enemmän ja retikulosyyttien määrä oli korkeampi kuin täysiaikaisilla lapsilla. Sekä keskosilla että täysiaikaisilla lapsilla MCV laski 40–45 viikon ikään asti, minkä jälkeen se alkoi taas nousta. Ferritiinipitoisuus oli aluksi keskosilla matalampi kuin täysiaikaisilla lapsilla. Ferritiinitaso laski iän mukana kaikilla vastasyntyneillä ja seerumin TfR-pitoisuus pysyi varsin tasaisena. Kuitenkin täysiaikaisilla vastasyntyneillä TfR-taso pyrki kohoamaan iän myötä. Erytropoieesiaktiivisuus vaikutti olevan suurin pienillä keskosilla, mikä selittyy suuremmalla kasvulla. Rautalisä oli keskosilla riittävä turvaamaan normaalin erytropoieesin (Takala ym. 2010).

3.6 Rautatasapainon säätely

Solun rauta-aineenvaihduntaan vaikuttavat transkription jälkeiset mekanismit, kuten rautaan reagoiva tekijä (iron responsive element IRE) ja rautaa säätelevä proteiini (iron regulatory protein IRP). Rauta-aineenvaihdunta, inflammaatio ja HI-tekijät vaikuttavat näihin mekanismeihin. Samat tekijät vaikuttavat maksan Tf:n muodostumiseen. Raudanpuutteessa ja hypoksiassa maksan Tf-muodostus lisääntyy (Gkouvatsos ym. 2012). Plasman rautapitoisuuden tasaisena pysyminen on tärkeää elimistön normaalille toiminnalle (Ganz 2004, Ganz ja Nemeth 2012, Gkouvatsos ym. 2012).

3.6.1 Hepsidiini

Hepsidiini on vasta löydetty pääasiassa maksan tuottama peptidihormoni, joka säätelee systeemisesti rauta-aineenvaihduntaa (Ganz 2004, Domellöf 2007, Collard 2009, Kroot ym. 2011, Ganz ja Nemeth 2012, Gkouvatsos ym. 2012). Hepsidiiniä voidaan mitata verestä ja virtsasta, tosin virtsan hepsidiini ei välttämättä heijasta seerumin hepsidiinitasoa, koska mm. paikallinen hepsidiinituotanto, glomerulusfiltraatio sekä reabsorptiomekanismit vaikuttavat virtsan hepsidiinipitoisuuteen (Kroot ym. 2011). Hepsidiini vaikuttaa plasman rautapitoisuuteen säätelemällä ferroportiineja (kuva 3). Se sitoutuu ferroportiinireseptoriin, jolloin reseptorin toiminta sammuu ja raudan siirtyminen enterosyyteistä, makrofageista ja hepatosyyteistä plasmaan estyy. Hepsidiini laskee plasman rautapitoisuutta. Elimistön rau-

tavarastojen ollessa runsaat hepsidiinipitoisuus on korkea (Domellöf 2007, Collard 2009, Kroot ym. 2011, Ganz ja Nemeth 2012, Gkouvatsos ym. 2012).

Hepsidiinisynteesin säätelyä ei vielä tunneta tarkasti. On esitetty, että intra- ja ekstrasellulaariset rautavarastot (ferritiini ja Tf), erytropoieesin vaatimukset (EPO), hypoksia sekä inflammaatio pääasiassa IL-6-välitteisesti vaikuttavat hepsidiiniin (Ganz 2004, Collard 2009, Kroot ym. 2011, Ganz ja Nemeth 2012, Gkouvatsos ym. 2012). Useat krooniset sairaudet ja maligniteetit ovat yhteydessä anemiaan ja raudanpuutteeseen (Kroot ym. 2011, Ganz ja Nemeth 2012). Crohnin -tautia sairastavilla aikuisilla hepsidiini korreloi positiivisesti IL-6:n ja ferritiiniin sekä negatiivisesti hemoglobiiniin (Basseri ym. 2013). Idiopaattista juveniilia artriittia (JIA) ja sen pohjalta kroonisen taudin anemiaa sairastavilla lapsilla havaittiin kohonnut seerumin hepsidiini. Hepsidiinipitoisuus laski, kun lapsia hoidettiin anti-interleukiini-1-reseptorin estäjällä (Cangemi ym. 2013). Toisaalta alle 16-vuotiailla Afrikan pakolaislapsilla hepsidiini tai raudanpuute eivät korreloineet sytokiineihin (IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN γ) (Cherian ym. 2008).

Voimakkaan erytropoieesiaktiivisuuden on epäilty olevan tärkeämpi hepsidiinin säätelytekijä kuin rautaylimäärä. Talassemiaassa hepsidiini on matala raudan liiallisesta kerääntymisestä huolimatta (Nemeth 2010). Hiiritutkimuksessa anti-EPO-vasta-aine tehosti lyhytaikaisesti maksan hepsidiini-mRNA ilmentymistä (Guo ym. 2013). Toisessa hiiritutkimuksessa säteilyllä aiheutettu erytropoieesin loppuminen nosti seerumin hepsidiiniä. Tutkimuksessa havaittiin myös EPOa stimuloivien tekijöiden laskevan seerumin hepsidiiniä. Tutkijat esittivät, että näiden tekijöiden vaikutus hepsidiiniin välittyy epäsuorasti luuytimen hematopoieettisen aktiivisuuden kautta (Sasaki ym. 2012).

Lapsilla on tehty vain muutamia hepsidiinitutkimuksia. Cangemin ym. (2013) tutkimuksessa osa rautaparametreista korreloi hepsidiiniin. Kuitenkaan terveillä lapsilla seerumin hepsidiini ei korreloinut seerumin ferritiiniin. Esimurrosikäisillä tytöillä osoitettiin positiivinen korrelaatio hepsidiinin ja Tf-saturaation välillä. Lisäksi hepsidiini korreloi negatiivisesti EPOon. Murrosikäisillä terveillä tytöillä havaittiin positiivinen korrelaatio hepsidiinin ja Tf:n välillä. Tutkimuksessa hepsidiinitaso ei merkitsevästi poikennut terveiden ja raudanpuuteanemiaa sairastavien lasten välillä, minkä ajateltiin johtuvan rautalisästä, joka oli käytössä raudanpuuteanemiaa sairastavilla (Cangemi ym. 2013). Toisessa tutkimuksessa Afrikasta muuttaneilla alle 16-vuotiailla lapsilla raudanpuuteanemia oli yhteydessä alentuneeseen virtsan hepsidiinitasoon. Virtsan hepsidiini korreloi ferritiiniin, seeru-

min rautaan ja Tf-saturaatioon positiivisesti, mutta Tf:iin negatiivisesti. Verenkuvaa tutkittaessa virtsan hepsidiini korreloi myös hemoglobiiniin ja MCV:heen positiivisesti (Cherian ym. 2008).

3.6.2 Hepsidiini raskauden aikana

Tiedetään, että hepsidiini sitoutuu istukan ferroportiiniin ja estää raudan kuljetusta (Collard 2009). On ehdotettu, että sikiön hepsidiini säätelee raudan siirtymistä istukan kautta sikiöön. Raskaana olevien naisten seerumin hepsidiini oli matalampi kuin vastasyntyneen napaveren hepsidiini, minkä merkitykseksi ajateltiin äidin tarjoavan sikiölle mahdollisimman paljon rautaa. Tutkimuksessa sikiön napaveren hepsidiini oli yhteydessä napaveren rautaparametreihin. Löydös osoitti, että hepsidiinivälitteinen rautatasapainon säätely toimii jo sikiöllä. Äidin hepsidiini oli yhteydessä hänen rautatasapainonsa mittareihin. Tutkimus osoitti, että äidin ja sikiön rautasäätely on itsenäistä (Rehu ym. 2010).

3.6.3 Hepsidiini imeväisiässä

Hepsidiinin muodostumisesta ja toiminnasta vastasyntyneillä tiedetään vielä vähän (Collard 2009). Hiljattain kuitenkin osoitettiin, että hepsidiini käyttäytyy terveillä pienipainoisena syntyneillä imeväisillä kuten aikuisilla. Seerumin hepsidiini reagoi raudanpuutteen, rautalisään sekä rautaylimäärään jo 12 viikon ikäisillä lapsilla (Berglund ym. 2011). Keskosten hepsidiinin eritykseen vaikuttavat monet tekijät, kuten EPO:n anto, rautalisä, verensiirrot, infektiot ja inflammaatio. Riittämätön kudoshapetus ja anemia vähentävät hepsidiinin eritystä. Toisaalta heikko erythropoieesiaktiivisuus liittyen keskosen anemiaan mahdollisesti kumoaa hepsidiinin eritystä vähentävää vaikutusta (Collard 2009).

Hepsidiinin esiasteen prohepsidiinin yhteyttä rauta-aineenvaihduntaan ei ole havaittu vastasyntyneillä täysiaikaisilla eikä keskosilla (Tiker ym. 2006, Yapakçi ym. 2009a, Yapakçi ym. 2009b). Tosin Kitajima ym. (2011) osoittivat prohepsidiinin yhteyden osaan rautaparametreista heti syntymän jälkeen. Tutkimuksessa prohepsidiini ei kuitenkaan korreloinut ferritiiniin. Kuukauden kuluttua synnytyksestä merkittäviä eroja rauta-aineenvaihdunnan merkkiaineiden ja prohepsidiinin välillä ei enää havaittu (Kitajima ym. 2011). Prohepsidiinipitoisuuden ja raskauden keston yhteydestä on ristiriitaista näyttöä. Tiker ym. (2006) totesivat, ettei prohepsidiini korreloi raskauden keston keskosilla. Kitajima ym. (2011) taas osoittivat, että prohepsidiini oli matalampi keskosilla kuin täysiaikaisilla vastasynty-

neillä. Yapakçin ym. (2009b) tutkimuksessa sepsikseen sairastuneilla keskosilla ja täysiaikaisilla vastasyntyneillä prohepsiidiini oli korkeampi kuin terveillä vastasyntyneillä.

Raskausviikolla 23–32 syntyneillä keskosilla, jotka tarvitsivat punasolusiirtoja, tutkittiin rautatasapainoa ja hepsiidiinin yhteyttä siihen. Seerumin ja virtsan hepsiidiini korreloivat positiivisesti seerumin ferritiiniin sekä retikulosyyttien hemoglobiinipitoisuuteen ja negatiivisesti TfR/ferritiini-suhteeseen (Müller ym. 2012). Toisessa tutkimuksessa täysiaikaisena syntyneillä IUGR-lapsilla ja normaalipainoisena syntyneillä lapsilla napaveren hepsiidiinissä ei ollut eroa ryhmien välillä, vaikka IUGR-ryhmän lapsilla oli pienemmät rautavarastot. Tutkimuksessa hepsiidiini ei korreloinut rautaparametreihin eikä EPOon (Briana ym. 2013).

Müllerin ym. (2012) tutkimuksessa hepsiidiini oli korkein lapsilla, joilla oli systeeminen inflammaatio. Korkeat seerumin hepsiidiinipitoisuudet mitattiin myös nuorimpana syntyneiltä keskosilta. Tutkijoiden mukaan tässä tutkimuksessa keskosilta mitattu seerumin hepsiidiini oli noin 30 % matalampi kuin aiemmassa tutkimuksessa täysiaikaisilta vastasyntyneiltä mitattu, minkä ajateltiin johtuvan keskosten pienemmistä rautavarastoista ja raudan menetyksestä verinäytteiden oton yhteydessä (Müller ym. 2012). Toisessa tutkimuksessa infektio vaikutti hepsiidiinitasoon. Hepsidiini korreloi positiivisesti CRP-tasoon alle 1500 g painaneilla vastasyntyneillä, joilla epäiltiin tehohoidossa saatua sepsistä (Wu ym. 2013).

Berglund ym. (2011) tutkivat rautatasapainon yhteyttä seerumin hepsiidiiniin ja EPOon pienipainoisena (2000g–2500g) syntyneillä terveillä imeväisillä. Tutkittavista lapsista 56 % oli syntynyt keskosina eli ennen raskausviikkoa 37. Lapset jaettiin kontrolliryhmään ja kahteen rautalisää saavaan ryhmään (1 tai 2 mg/kg/vrk). Tutkimuksen alkaessa 6 viikon iässä ryhmien välillä ei ollut eroa hepsiidiinissä eikä EPOssa. 6 kuukauden iässä tutkimuksen päättyessä rautalisää saavilla lapsilla oli korkeampi hepsiidiini ja matalampi EPO kuin kontrolliryhmällä. Rautalisää saavilla lapsilla oli korkeampi hepsiidiini jo 12 viikon iässä verrattuna kontrolliryhmään. Hepsidiini korreloi annosriippuvaisesti laskennalliseen arviointiin raudan kokonaisvuorokausisaannista. Tutkimuksessa hepsiidiini ei korreloinut hemoglobiiniin, mutta EPO korreloi negatiivisesti hemoglobiiniin 6 viikon ja 6 kuukauden iässä. Hepsidiini korreloi paremmin rautavarastoihin kuin EPOon. 6 kuukauden iässä hepsiidiini korreloi positiivisesti ferritiiniin, MCV:hen, Tf-saturaatioon ja seerumin rautaan sekä negatiivisesti TfR:iin, Tf:iin ja EPOon. Lisäksi hepsiidiini korreloi osaan rautaparametreista jo 6 ja 12 viikon iässä. Tutkimuksessa hepsiidiini korreloi parhaiten ferritiiniin, minkä vuoksi

tutkijat ehdottivat hepsidiinin mahdollisesti kuvaavan parhaiten imeväisen rautavarastoja (Berglund ym. 2011).

4. ANDROGEENIT ERYTROPOIEESIN JA HEPSIDIININ SÄÄTELYSSÄ

Vuosikymmeniä on tiedetty, että androgeenit tehostavat erytropoieesia, mutta tarkkaa mekanismia ei edelleenkään tunneta. Testosteroni lisää miehillä punasolujen määrää (Coviello ym. 2008, Maggio ym. 2013, Bachman ym. 2014). Hiirillä testosteroni nosti hemoglobiinia, Hkr:ää, retikulosyyttien määrää ja retikulosyyttien hemoglobiinipitoisuutta (Guo ym. 2013). Hepsidiinin käyttäytymisestä iän ja sukupuolen suhteen on rajoitetusti, ja osin ristiriitaistakin tutkimusnäyttöä. Kuitenkin uusissa hiiritutkimuksissa testosteroni vähensi hepsidiinin transkriptiota (Guo ym. 2013, Latour ym. 2014). Bachmanin ym. (2010 ja 2014) tutkimuksissa testosteroni laski miehillä seerumin hepsidiinitasoa.

4.1 Androgeenit ja erytropoieesi

Punainen verenkuvareagoi jo ensimmäisten hoitokuukausien aikana testosteroniin. Bachmanin ym. (2014) tutkimuksessa yli 65-vuotiaille miehille 6 kuukauden ajan päivittäin annettu testosteronigeeli nosti hemoglobiinin ja Hkr:n huippuunsa 3 kuukauden kohdalla. Ne pysyivät samalla tasolla koko tutkimuksen ajan ja palasivat lähtötasolle 3 kuukauden kuluttua tutkimuksen päättymisestä (Bachman ym. 2014). Hypogonadaalisilla miehillä transdermaalinen testosteroni nosti hemoglobiinia ja Hkr:a tehokkaasti ensimmäisen 3 kuukauden aikana (Snyder ym. 2000). Bhasinin ym. (2005) tutkimuksessa nuorilla miehillä testosteronitaso oli korkeampi kuin vanhemmilla miehillä, mutta hemoglobiinissa ja Hkr:ssa ei ollut eroa. Toisessa tutkimuksessa vanhempien miesten hemoglobiini ja Hkr reagoivat voimakkaammin testosteroniin kuin nuorilla miehillä (Coviello ym. 2008).

4.1.1 Androgeenien vaikutus hematopoieettiseen solukoon

Testosteroni stimuloi ihmisen luuytimen punasolumuodostusta (Moriyama ja Fisher 1975). Miehillä ja naisilla on luuytimen hematopoieettisessa ja stroomasolukossa runsaasti androgeenireseptoreja (AR), mikä viittaa androgeenien suoraan hematopoieettiseen vaikutukseen. Immunohistokemiallisessa tutkimuksessa ikä ei vaikuttanut AR:en esiintymiseen, vaikka luuytimen solukko väheni ikääntyessä. Myöskään sukupuolten välillä ei ollut eroa AR:en esiintymisessä. Stroomasolukon AR:t sijaitsivat pääosin stroomasolujen, makrofagien ja endoteelisolujen tumissa (Mantalaris ym. 2001). Toisessa tutkimuksessa havaittiin myös AR:en esiintyminen luuytimen mononukleaari- ja endoteelisoluissa (Abu ym. 1997). Hematopoieettisen solukon AR:t sijaitsivat myelosyyttien ja myeloblastien sytoplasmassa,

neutrofiilien tumissa ja sytoplasmassa sekä megakaryosyyteissa perinukleaarisesti. AR:ta ei havaittu kypsävissä tumallisissa punasoluissa, kypsissä punasoluissa eikä lymfosyyteissä (Mantalaris ym. 2001).

Nuorilla ja seniileillä hiirillä anabolinen steroidi 19-nandrolonidekanoaatti lisäsi luuytimen ja pernan CFU-E- ja BFU-E-solujen määrää sekä granulositytti-makrofagikantasoluja (CFU-GM). Hematopoeettinen vaste ei riippunut hiirten iästä (Saitoh ym. 1999). Ihmisen napaverta tutkittaessa havaittiin, että vain naispuolisen luovuttajan napaveren punasoluesiasteet reagoivat dihydrotestosteroniin proliferaatiolla. Testosteroniantagonisti syproteroniasetaatti kumosi tämän vaikutuksen. Dihydrotestosteroni tai syproteroniasetaatti ei vaikuttanut millään tavalla miespuolisen luovuttajan napaveren punasoluesiasteisiin. Tutkimuksessa estrogeenilla tai progesteronilla ei ollut vaikutusta kummankaan sukupuolen punasoluesiasteisiin (Leberbauer ym. 2005). Uudessa hiiritutkimuksessa testosteroni tehosti erytropoieesia uros- ja naarashiirillä, mutta muutokset hemoglobiinissa ja Hkr:ssä olivat suurempia naarashiirillä (Guo ym. 2013).

4.1.2 Erytropoieesin muutokset puberteetissa ja IGF-1-vaikutus

Ensimmäisissä ihmisillä tehdyissä tutkimuksissa havaittiin, että miehillä on korkeampi hemoglobiini ja suurempi punasolumäärä kuin naisilla (Shahani ym. 2009). Pojilla on esimurrosiän lopulla suuremmat androgeenipitoisuudet kuin tytöillä (Dunkel ja Tapanainen 1997). Ennenaikainen adrenarke lisää punasolujen määrää tytöillä. Tutkijoiden mukaan on mahdollista, että ennenaikaisen adrenarken aiheuttama pienikin seerumin androgeeninousu tehostaa erytropoieesia. Tämä voi johtua androgeenien ja IGF-1:n yhteisvaikutuksesta (Utriainen ym. 2013). Heron ym. (2005) tutkimuksessa murrosikäisillä pojilla hemoglobiinin nousu ja erytropoieesin tehostuminen normaalissa puberteetissa olivat androgeenivälitteisiä. Kuitenkin erytropoieesin tehostuminen lisääntyneen testosteronierityksestä on voimakkain vasta murrosiän loppupuolella (14,6–16,6 vuoden iässä). Arvioitu punasolujen määrä sen sijaan nousi tasaisesti koko murrosiän ajan. Vaikka pojilla erytropoieesin tehostuminen liittyi ajallisesti murrosiän kasvupyrähdykseen, kasvuhormoni (GH)-IGF1-systeemi ei vaikuttanut erytropoieesin kiihtymiseen (Hero ym. 2005).

Esimurrosikäisillä lapsilla IGF-1 korreloi positiivisesti dehydroepiandrosteroniin (DHEA) ja sen sulfaattimuotoon (DHEAS) ja androsteenidioniin. Lisäksi hemoglobiini korreloi positiivisesti IGF-1- ja DHEAS-pitoisuuksiin, kun taas punasolujen määrä korreloi ainoastaan IGF-1-pitoisuuteen (Utriainen ym. 2013). Eturauhassyöpöpotilailla on tutkittu antian-

drogeenien vaikutusta erytropoieesiin ja IGF-1:een. Potilaat saivat GnRH-agonistia (gosereliiniasetaattia) ja antiandrogenia (flutamidia tai bikalutamidia). Ennen hoidon aloitusta IGF-1 korreloi positiivisesti punasolujen määrään, hemoglobiiniin ja MCV:hen. Hoidon aikana IGF-1-pitoisuus nousi, vaikka hemoglobiini sekä punasolujen määrä ja MCV laskivat. Antiandrogenihoito ei vaikuttanut kasvuhormonin eritykseen (Hara ym. 2010).

4.1.3 Androgeenit ja erytropoietiini

Aiemmin ajateltiin, että androgeenit tehostavat erytropoieesia lähinnä lisäämällä EPO:n eritystä. Uusissa tutkimuksissa EPO:n roolista on kuitenkin ristiriitaista näyttöä. Tämänhetkisen tutkimustiedon valossa ei tiedetä, onko ihmisen EPOa tuottavissa soluissa AR:ta. Ihmisillä AR:ta löydettiin munuaisten distaalisisista tubuluksista sekä maksan hepatosyyttien tumista (Kimura ym. 1993). Hiirikokeissa ei myöskään ole tutkittu AR:en esiintymistä EPOa tuottavissa soluissa, mutta erillisiä tutkimuksia on tehty. Kun hiirillä tutkittiin sukupuolihormoneja sitovaa proteiinia (SHBG), löydettiin proksimaalisen kierteisen tubuluksen epiteelisolujen tumista AR:ta (Hong ym. 2011). Hiirillä maksan epiteeli- ja ei-epiteelisolut sekä munuaisten interstiaaliset solut tuottivat EPOa (Koury ym. 1989, Koury ym. 1991). Toisessa hiiritutkimuksessa EPOa tuottavat solut sijaitsivat munuaiskorteksin proksimaalisissa tubuluksissa. Kuitenkaan kaikki tubulussolut eivät ilmentäneet EPO-mRNA:ta (Shanks ym. 1996).

1960-luvun potilastapausselosteessa 5 eri tyyppin anemiaa sairastavaa potilasta saivat testosteronijohdosta, minkä seurauksena kaikilla potilailla EPO-pitoisuus nousi. EPO-pitoisuus palasi alkuperäiselle tasolle pian testosteronijohdoksen annon lopettamisen jälkeen (Rishpon-Meyerstein ym. 1968). 1990-luvun hiirikokeissa anabolinen steroidi 19-nandrolonidekanoaatti lisäsi EPO:n eritystä, mutta ei vaikuttanut IL-3- eikä GM-CSF-pitoisuuksiin (Saitoh ym. 1999). Guon ym. (2013) hiirikokeessa testosteroni tehosti munuaisten EPO-mRNA:n ilmentymistä ja nosti seerumin EPO-tasoja. Testosteronilla ja EPOlla on osoitettu olevan synergistinen vaikutus luuytimessä (Moriyama ja Fisher 1975). Synerginen vaikutus todettiin myös loppuvaiheen munuaisten vajaatoimintaa sairastavilla potilailla, jotka saivat rekombinanttia ihmiserytropoietiinia (rHuEPO) ja androgenia (nandrolonidekanoaatti) (Gaughan ym. 1997). Pelekanou ym. (2010) havaitsivat, että solukalvoja läpäisemätön testosteronianalogi (testosteroni-BSA) vaikuttaa suoraan EPO-reseptoriin käynnistäen EPOsta riippuvat toiminnot.

Useissa tutkimuksissa on kuitenkin havaittu, että testosteroni ei vaikuta EPO-eritykseen (Hero ym. 2005, Coviello ym. 2008, Hara ym. 2010, Maggio ym. 2013). Antiandrogeenihoito eturauhassyöpöpotilailla ei vaikuttanut EPO-pitoisuuksiin, vaikka hemoglobiini, punasolujen määrä ja MCV laskivat (Hara ym. 2010). Pojilla, joilla oli viivästynyt murrosikä ja joita hoidettiin testosteronilla ja aromataasi-inhibiittorilla (letrotsoli) tai testosteronilla ja plasebolla, sekä kontrolliryhmällä EPO-tasot eivät muuttuneet tutkimuksen aikana. Tutkimuksessa EPO ei myöskään korreloinut hemoglobiiniin eikä arvioituun punasolujen määrään (Hero ym. 2005). Coviello ym. (2008) osoittivat, että nuorilla ja vanhemmilla miehillä testosteronienantaatti nostaa annosriippuvaisesti hemoglobiinia ja Hkr:a, mutta ei lisää EPO:n eritystä. Maggion ym. (2013) tutkimuksessa 36 kuukauden transdermaalinen testosteronin anto yli 65-vuotiaille miehille nosti hemoglobiinia EPOsta riippumatta. Hiljattain julkaistussa Bachmanin ym. (2014) tutkimuksessa testosteroni vaikutti EPOon vain aluksi. 6 kuukauden testosteronitutkimuksessa miehille päivittäin annettu testosteronigeeli nosti seerumin EPO-tasoa ensimmäisen 3 kuukauden aikana, minkä jälkeen EPO-pitoisuus laski kohti lähtötasoa.

4.1.4 Testosteronin yhteys rautatasapainoon

Eläinkokeista tiedetään, että testosteroni tehostaa raudan kulkua punasoluihin (Shahani ym. 2009, Guo ym. 2013). Testosteroni tehosti hiirillä pernan ferroportiiniaktiivisuutta, minkä seurauksena pernan rautavarastot pienenevät ja seerumiin siirtyi rautaa. Lisäksi testosteroni nosti hiirillä myös Tf-saturaatiota (Guo ym. 2013). Bachmanin ym. (2014) tutkimuksessa miehillä testosteroniryhmässä TfR-taso oli korkeampi 1, 3 ja 6 kuukauden kohdalla kuin kontrolliryhmällä. Samalla ajanjaksolla ferritiini laski ja hemoglobiini nousi. TfR-tasoa pidetään erytropoieesiaktiivisuuden mittarina, kun raudanpuutetta ei ole (Huebers ym. 1990). Bachmanin tutkimusryhmä (2014) esitti, että testosteronin vaikutuksesta erytropoieesin raudankäyttö lisääntyy. Samanlainen yhteys havaittiin Heron ym. (2005) tutkimuksessa. Pojilla, joita hoidettiin viivästyneen murrosiän vuoksi testosteronilla ja aromataasi-inhibiittorilla, havaittiin erytropoieesin tehostumisen myötä lisääntynyt raudan tarve. Testosteroni korreloi negatiivisesti ferritiiniin ja positiivisesti seerumin TfR:iin (Hero ym. 2005). Coviellon ym. (2008) tutkimuksessa miehille annettu testosteronienantaatti ei kuitenkaan vaikuttanut seerumin TfR-tasoon.

4.2 Hepsidiini ja testosteroni

Ganz ja Nemeth (2012) totesivat, että useissa tutkimuksissa naisilla on havaittu matalampi hepsidiinitaso kuin miehillä. Krootin ym. (2011) mukaan tutkimuksissa ei ole havaittu selvää sukupuolieroa. He totesivat, että premenopausaalisilla naisilla hepsidiinitaso on matalampi kuin postmenopausaalisilla naisilla. Miehillä hepsidiinitaso ei riippunut iästä (Kroot ym. 2011).

Guo ym. (2013) osoittivat hiiritutkimuksessa, että testosteroni rajoittaa hepsidiinin transkriptiota. Vaikutus välittyy AR:n sekä BMD/Smad-solusignaalintireitin kautta. Testosteroni esti hepsidiinituotantoa myös anti-EPO-vasta-aineen läsnä ollessa, joten testosteronin vaikutus hepsidiiniin ei riippunut EPOsta. Lisäksi he osoittivat, että testosteronin vaikutus hepsidiiniin ei riippunut maksan tai munuaisen hypoksiaa aistivista mekanismeista. He esittivät, että testosteroni tehostaa erytropoieesia sekä vaikuttaa elimistön rautatasapainoon hepsidiinin kautta (Guo ym. 2013). Toisessa hiiritutkimuksessa testosteroni lisäsi maksan EGFR (epidermaalinen kasvutekijä reseptori) -viestitystä, mikä vähensi hepsidiinin transkriptiota (Latour ym. 2014).

Cangemi ym. (2013) tutkivat 86 terveeltä lapselta seerumin hepsidiinitasoja. Heidän tutkimuksessaan pojilla oli merkittävästi korkeampi hepsidiinitaso kuin tytöillä. Lasten iän suhteen merkittäviä eroja hepsidiinissä ei havaittu. Murrosiän ohittaneilla tytöillä oli hieman matalampi hepsidiinitaso kuin esimurrosikäisillä. Ero ei kuitenkaan ollut merkitsevää. Murrosiän ohittaneilla tytöillä hepsidiinitasot olivat matalammat kuin pojilla. Tutkimuksessa poikia ei jaettu eri ryhmiin murrosiän mukaan (Cangemi ym. 2013).

Bachmanin ym. (2010) tutkimuksessa terveet nuoret miehet (19–35 vuotta) ja vanhemmat miehet (59–75 vuotta) jaettiin ryhmiin, jotka saivat 20 viikon ajan eri määrän testosteronienantaattia pistoksena. Lisäksi he saivat kuukausittain GnRH-agonisti-pistoksen estämään endogeenisen testosteronituotannon. Alkutilanteessa nuorilla miehillä testosteroni oli hieman korkeampi kuin vanhemmilla miehillä, hemoglobiinissa ja Hkr:ssä ei ollut eroa (Bhasin ym. 2005). Vanhemmilla miehillä hepsidiinitaso ja seerumin ferritiinipitoisuus olivat korkeampia kuin nuorilla miehillä. Tutkimuksen aikana korkea testosteronipitoisuus laski hepsidiiniä 60 % jo viikon aikana. Kaikissa testosteroniannosryhmissä seerumin hepsidiini laski vähintään 50 %. Nuorilla miehillä vain suuret testosteroniannokset alensivat hepsidiiniä annosriippuvaisesti, kun taas vanhemmilla miehillä kaikki testosteroniannokset alensivat hepsidiiniä annosriippuvaisesti. Tutkijat osoittivat, että testosteroni alentaa hepsi-

diiniä annos- ja ikäriippuvaisesti. Vanhemmilla miehillä testosteronilisä laski hepsidiiniä enemmän kuin nuorilla miehillä (Bachman ym. 2010).

Toisessa tutkimuksessa Bachman ym. (2014) tutkivat testosteronin yhteyttä hepsidiinin ja EPOon. Tutkimukseen osallistui yli 65-vuotiaita liikuntarajoitteisia miehiä, joilla useilla oli kroonisia sairauksia. Miehet jaettiin kontrolli- ja testosteroniryhmään. Testosteroniryhmä sai 10 g testosteronigeeliä päivittäin 6 kuukauden ajan. Tutkimuksen alkaessa seerumin hepsidiini eikä ferritiini eronnut ryhmien välillä. Kuukauden ja 3 kuukauden kuluttua seerumin hepsidiini oli testosteroniryhmällä matalampi kuin kontrolliryhmällä, mutta 6 kuukauden kohdalla merkittävää eroa ei ollut. Seerumin testosteronin muutokset korreloivat negatiivisesti seerumin hepsidiinin muutoksiin 6 kuukauden aikana. Seerumin ferritiini käyttäytyi samalla tavalla kuin hepsidiini eli laski testosteroniryhmässä (Bachman ym. 2014).

5. MINIPUBERTEETTI

Hypotalamuksen gonadoliberiini (GnRH) erittyy porttilaskimojärjestelmän kautta aivolisäkkeen etulohkoon. Aivolisäkkeen etulohkossa se lisää gonadotropiinien lutenisoivan hormonin (LH) ja follikkelia stimuloivan hormonin (FSH) muodostumista ja erittymistä verenkiertoon. Gonadotropiinit vaikuttavat edelleen kohde-eliimiinsä munasarjaan ja kivekseen, jossa ne lisäävät sukupuolihormonien testosteronin, estrogeenin ja progesteronin eritystä. Tytöillä FSH ja LH tehostavat munasarjan estrogeenieritystä. Pojilla LH lisää kiveksen testosteronieritystä (Jospe 2006). Kiveksen ja munasarjan sukupuolihormonieritys vaikuttaa negatiivisen palautevaikutuksen kautta aivolisäkkeeseen ja hypotalamukseen hilliten GnRH:n ja gonadotropiinien eritystä (Dunkel ja Tapanainen 1997, Jospe 2006).

Sikiön ulkoiset ja sisäiset sukupuolirakenteet muodostuvat raskauden alussa viikkojen 9 ja 13 välillä (Jospe 2006). Sikiön kehityksen aikana 14 viikon iässä hypotalamuksen rakenteet ja 1. trimesterin lopussa aivolisäkkeen rakenteet ovat täysin erilaistuneet (Forest ja Ducharme 1993). GnRH-pulssieritys toimii sikiöaikana (Dunkel ja Tapanainen 1997, Grumbach 2005, Jospe 2006). Tyttösiikiöillä LH- ja FSH-pitoisuus aivolisäkkeessä on korkeampi ja nousee aiemmin kuin poikasikiöillä. Tyttösiikiöillä myös seerumin FSH-pitoisuus on korkeampi kuin poikasikiöillä. Seerumin LH- ja FSH-pitoisuudet ovat korkeimmillaan keskiraskaudesta, jonka jälkeen ne laskevat (Forest ja Ducharme 1993). Laskun syyksi ajatellaan istukan hormonien, erityisesti estrogeenien negatiivista palautevaikutusta (Varvarigou ym. 2009). Vastasyntyneen gonadotropiinipitoisuudet ovat hyvin matalat eikä sukupuoliero ole. Alkuraskaudessa poikasikiön seerumin testosteronipitoisuus on korkeampi kuin tyttösiikiöllä. Poikasikiöiden testosteroni saavuttaa huippupitoisuuden 14–18 raskausviikon aikana, minkä jälkeen se laskee. Raskausviikkojen 22–28 jälkeen sukupuoliero häviää (Forest ja Ducharme 1993).

Syntymän jälkeen LH ja FSH nousevat nopeasti ja saavuttavat huippupitoisuuden 3 kuukauden ikään mennessä (Andersson ym. 1998). LH nousee pojilla enemmän kuin tytöillä, kun taas FSH nousu on tytöillä voimakkaampi kuin pojilla (Forest ym. 1974, Forest ja Ducharme 1993, Grumbach 2005). Testosteronipitoisuus nousee pojilla voimakkaasti syntymän jälkeen, kunnes noin 3 kuukauden iässä se alkaa laskea (Forest ym. 1974, Forest ym. 1980, Forest ja Ducharme 1993, Andersson ym. 1998, Grumbach 2005, Kuiri-Hänninen ym. 2011b). Vastaavasti tytöillä estrogeenipitoisuus nousee syntymän jälkeen (Chellakooty ym. 2003, de Jong ym. 2013, Kuiri-Hänninen ym. 2013). Pojilla 6 kuukauden

iässä gonadotropiini- ja testosteronipitoisuus ovat jo matalat (Grumbach 2005), mutta tytöillä vaihteleva FSH-pitoisuus säilyy 2–3 vuoden ikään asti (Forest ja Ducharme 1993, Andersson ym. 1998). Vaihteleva virtsan estrogeenipitoisuus säilyy tytöillä 14 kuukauden ikään asti (Kuiri-Hänninen ym. 2013). Imeväisiän HPG-aktivaatiota kutsutaan myös minipuberteetiksi (Grumbach 2005).

Keskosten minipuberteetissa on eroavaisuuksia verrattuna täysiaikaisiin vastasyntyneisiin. Kun pienillä keskosilla määritettiin gonadotropiinien viitearvoja, heillä oli 6 ensimmäisen elinviikon aikana vaihteleva gonadotropiinipitoisuus, mutta selvää huippua ei havaittu (Greaves ym. 2008). Toisessa tutkimuksessa pienillä keskostytöillä gonadotropiinien huippupitoisuus oli noin 4 viikon iässä ja pienillä keskospojilla 1–4 viikon iässä (de Jong ym. 2012, de Jong ym. 2013). Keskostytöillä FSH oli korkeimmillaan 1. elinkuukauden aikana ja laski 2 kuukauden ikään mennessä (Kuiri-Hänninen ym. 2011a). Keskospojilla LH ja testosteroni olivat huipussaan kuukauden iässä, minkä jälkeen ne laskivat (Kuiri-Hänninen ym. 2011b). Forestin ym. (1980) tutkimuksessa keskosilla testosteroni oli pidempään koholla verrattuna täysiaikaisiin lapsiin. Keskostytöillä estrogeenitaso oli korkeampi kuin täysiaikaisilla tytöillä (Chellakooty ym. 2003, Kuiri-Hänninen ym. 2013). Keskosilla minipuberteetti oli voimakkaampi kuin täysiaikaisena syntyneillä lapsilla (Shinkawa ym. 1983, Kuiri-Hänninen ym. 2011a, Kuiri-Hänninen ym. 2011b).

6. HYPOTEESI

Aikuisilla miehillä on todettu testosteronin laskevan seerumin hepsidiinipitoisuutta ja sitä kautta nostavan hemoglobiinia. Tutkimushypoteesina oli, että analogisesti aikuisten kanssa minipuberteetin aikainen testosteronin nousu on yhteydessä hepsidiinipitoisuuden laskuun, mikä edelleen heijastuu seerumin rauta-aineenvaihduntaa kuvaavissa merkkiaineissa ja verenkuvassa pienillä keskosilla.

7. TAVOITTEET

Työn tavoitteena oli kuvata gonadotropiinien (LH ja FSH) ja testosteronin tasot virtsassa pienillä keskosilla 3–9 viikon iässä, jolloin minipuberteetti on voimakkaimmillaan. Lisäksi tavoitteena oli kuvata minipuberteetin aikaisen testosteroninousun yhteys seerumin ja virtsan hepsidiiniin, rauta-aineenvaihdunnan merkkiaineisiin, verenkuvaan ja seerumin EPOon (S-EPO). Rauta-aineenvaihdunnan merkkiaineina käytettiin seerumin ferritiiniä (S-Ferrit) ja S-TfR:a. Verenkuvasta tarkasteltiin hemoglobiinia (Hb), Hkr:a, erytrosyyttitasoja (Eryt), MCV:a ja retikulosyyttien absoluuttista määrää (Retikabs).

8. AINEISTO JA MENETELMÄT

8.1 Aineisto

Tutkimuksessa oli mukana 57 alle 32. raskausviikolla syntynyttä pientä keskosta (mediaani 28,4 ja vaihteluväli 23,4–31,9 raskausviikkoa), jotka syntyivät vuosina 2009–2010 Kuopion yliopistollisessa sairaalassa (Taulukko 1). Poikia oli 33 (58 %). Yhteensä 37 % keskosista oli syntynyt monisikiöisestä raskaudesta. Kaikki pojat, ja tytöt kaikki yhtä lukuun ottamatta saivat antenataalisteroidin. Pojista 10 (30 %) ei saanut ollenkaan punasolusiirtoja, kun taas tytöistä vain yksi ei saanut punasolusiirtoja. EPOa ei saanut kukaan tutkittavista lapsista. Lisärauta aloitettiin kaikille joko 3 viikon iässä tai kun S-Ferrit laski alle 250 µg/l. Sairaalahoidon aikana kerättiin hoidollisista syistä virtsa- ja verinäytteitä 2 viikon välein aloittaen ensimmäisellä elinviikolla ja jatkaen kotiutumiseen saakka. Verinäytteet tutkimusta varten otettiin tehohoitoon liittyvien ravitsemusverikokeiden yhteydessä laskimo- ja valtimoverestä ja kerättiin EDTA-, seerumi- ja plasmaputkiin. Virtsanäytteet kerättiin aamulla virtsankeräystyynyn avulla. Pohjois-Savon sairaanhoitopiirin eettinen toimikunta hyväksyi tutkimussuunnitelman.

Tähän työhön valikoitiin analysoitavaksi aikapisteet viikoilta 3, 5, 7 ja 9, jotka sijoittuvat aiempien tutkimusten mukaan minipuberteetin suurimman aktivaation ajankohtaan.

Alkuperäisestä tutkimuspopulaatiosta valikoitiin pois lapset, joilla epäiltiin UGT2B17-geenin deleetiota, jotta virtsan testosteronitasoja voitaisiin arvioida luotettavasti. Tämän geenin deleetio johtaa poikkeavan mataliin virtsan testosteronitasoihin. Geenitestiä ei tehty, vaan poikkeavan matalat testosteroninerittäjät oletettiin UGT2B17-geenin suhteen mutanteiksi (Juul ym. 2009).

8.2 Menetelmät

Seerumin ja virtsan hepsidiinipitoisuus mitattiin massaspektrometri-sovelluksella (TOF MS) yhteistyölaboratoriossa (Nijmegen, Alankomaat). Matalimmat mitattavat seerumin ja virtsan hepsidiinikonsentraatiot olivat 0,5 nmol/l ja 0,1 nmol/l. Veren Hb-pitoisuus, MCV, Hkr, Eryt ja Retikabs mitattiin ADVIA 2120 -verisoluanalysointilaitteella (Siemens, Health Care Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). S-Ferrit, S-TfR ja virtsan kreatiniinin mittausta tehtiin Cobas 6 000 -analysointilaitteella (Hitachi High Technology Co., Tokio, Japani). S-EPO analysoitiin AlphaLisa-menetelmällä (Perkin Elmer Inc., Waltham MA, USA). Virt-

san LH ja FSH analysoitiin AutoDelfia-metelmällä (Wallac, Turku, Suomi). Virtsan testosteroni mitattiin HPLC-tandem massaspektrometrialla (Kuiri-Hänninen ym. 2011b).

Punaisen verenkuvan, rautatasapainon, S-EPO:n, seerumin ja virtsan hepsidiinin sekä virtsan gonadotropiinin ja testosteronin sukupuolieroja kussakin aikapisteessä arvioitiin käyttäen sekamallia. Luokittelevina muuttujina käytettiin sukupuolta, aikapistettä, potilasnumeroa ja monisikiöisyyttä. Jatkuvina muuttujina käytettiin postmenstruaali-ikää, suhteellista syntymäpainoa ja suhteellista syntymäpituutta. Kiinteinä muuttujina olivat sukupuoli, aikapiste, postmenstruaali-ikä, suhteellinen syntymäpaino ja suhteellinen syntymäpituus. Satunnaismuuttujina käytettiin monisikiöisyyttä ja potilasnumeroa. Virtsan hormonitasot suhteutettiin virtsan kreatiniinitasoihin virtsan konsentraatioerojen vakioimiseksi. Virtsan testosteronin, seerumin ja virtsan hepsidiinitasojen ja EPO-tasojen välisiä yhteyksiä tutkittiin Spearmanin korrelaatiolla. Analyyseissä käytettiin SPSS Statistics-ohjelmaa (versio 19, IBM, USA).

TAULUKKO 1. Pienten keskosten taustatiedot (n = 57).

	Pojat (n = 33)	Tytöt (n = 24)
Äidin ikä (v)	30.0 (22.1–38.0)	30.4 (22.7–38.6)
Raskauden kesto (vko)	28.4 (23.4–31.9)	28.1 (23.6–31.9)
Syntymäpaino (g)	1190 (540–1790)	1000 (480–1910)
Suhteellinen syntymäpaino (SD)	-1.1 (-3.4–2.3)	-1.3 (-4.3–0.4)
Syntymäpituus (cm)	37.3 (29.5–42.5)	37.0 (28.0–44.0)
Suhteellinen syntymäpituus (SD)	-0.6 (-4.6–2.3)	-0.85 (-4.9–1.8)
Punasolusiirrot (n)	2 (0–17)	3 (0–16)
Sikiöisyys n (%)		
Yksisikiöinen raskaus	19 (57.6 %)	17 (70.8 %)
Monisikiöinen raskaus	14 (42.4 %)	7 (29.2 %)
Äidin tupakointi raskauden aikana n (%)		
Ei	28 (84.8 %)	20 (83.3 %)
Kyllä	4 (12.1 %)	4 (16.7 %)
Ei tietoa	1 (3.0 %)	
Synnytystapa n (%)		
Alatiesynnytys	11 (33.3 %)	7 (29.2 %)
Elektiivinen sektio	6 (18.2 %)	2 (8.3 %)
Kiireellinen sektio	16 (48.5 %)	14 (58.3 %)
Hätäsektio	-	1 (4.2 %)
Keskosuuden syy n (%)		
Infektio	10 (30.3 %)	11 (45.8 %)
Pre-eklampsia	6 (18.2 %)	4 (16.7 %)
Ablaatio, previa tai muu vuoto	6 (18.2 %)	3 (12.5 %)
³ Jokin muu	11 (33.3 %)	6 (25 %)
¹ GDM tai ² IDM n (%)		
Kyllä	6 (18.2 %)	3 (12.5 %)
Ei	27 (81.8 %)	21 (87.5 %)

Taulukkoon merkitty mediaani ja vaihteluväli.

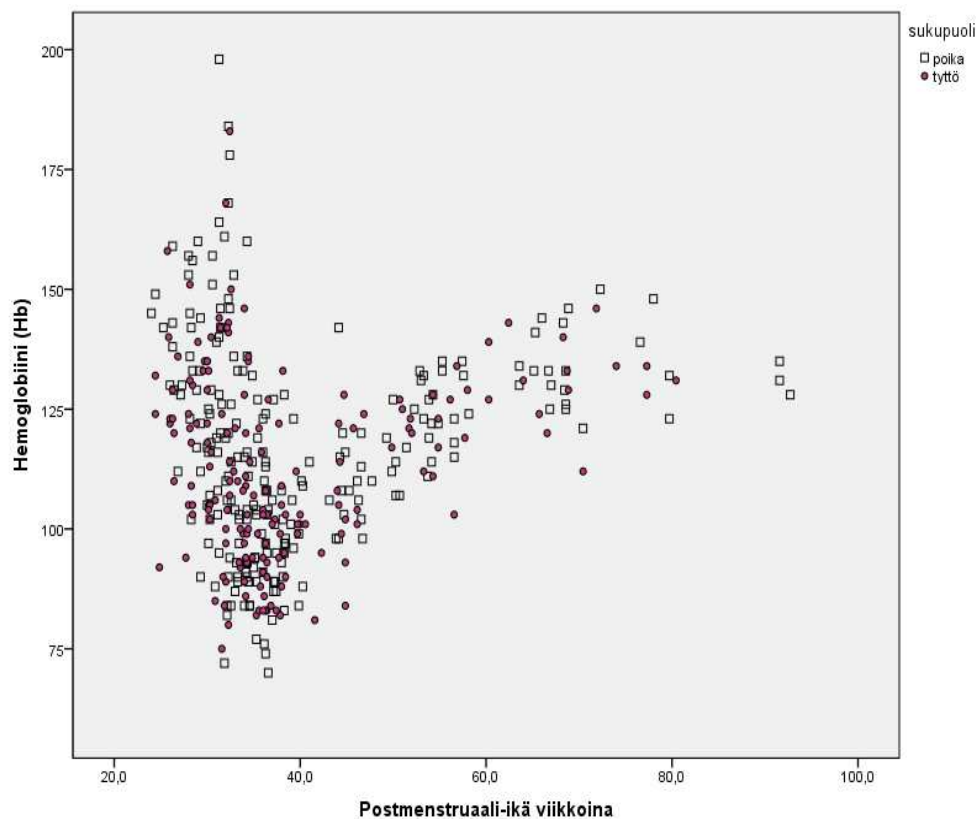
¹GDM = Gestaationaalinen diabetes mellitus, ²IDM = insuliinihoitoinen diabetes mellitus. ³Jokin muu = kaksosraskaus, kolmoisraskaus, kohdunsuun heikkous, ennenaikainen lapsiveden meno, istukan toimintahäiriö ja napablokki

9. TULOKSET

9.1 Punaisen veren kuvan ja erytropoietiin muutokset

Postmenstruaali-ään mukaan tarkasteltuna sekä tytöillä että pojilla Hb laski jyrkästi kohti laskettua aikaa, minkä jälkeen se alkoi taas nousta (kuva 1). Pojilla Hb ja Hkr laskivat 3 viikon iästä 5 viikon ikään mennessä ($P < 0,001$), minkä jälkeen tasoissa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä muutoksia (taulukko 2). Tyttöjen Hb-tasot ja Hkr pysyivät muuttumattomina 3 viikon iästä 5 viikon ikään, jonka jälkeen molempien tasot laskivat. 9 viikon iässä tasot olivat merkitsevästi matalammat kuin 5 viikon iässä ($P = 0,015$ muutokselle Hb:ssa ja $P = 0,017$ muutokselle Hkr:ssa). Tyttöillä Hb-tasot ja Hkr olivat poikia matalammat 3 viikon iässä ($P = 0,013$ Hb:lle ja $P = 0,043$ Hkr:lle, taulukko 2). Poikien Eryt olivat korkeimmillaan 3 viikon iässä ja laskivat sitten 7 viikon ikään mennessä ($P = 0,002$). Tyttöillä Eryt oli korkeimmillaan 5 viikon iässä ja laski merkitsevästi 9 viikon ikään mennessä ($P = 0,042$). Erytrosyyttitasoissa ei ollut sukupuolieroa.

MCV oli pojilla ja tytöillä suurimmillaan 3 viikon iässä, jonka jälkeen se laski 9 viikon ikään mennessä ($P = 0,001$). Pojilla Retikabs oli pienimmillään 3 viikon iässä ja nousi 9 viikon ikään mennessä ($P < 0,001$). Tyttöillä taas Retikabs oli pienimmillään 3 viikon iässä ja määrä nousi merkitsevästi 5 viikon iästä 7 viikon ikään ($P = 0,038$). Pojilla S-EPO ei muuttunut 3 viikon ja 9 viikon iän välillä. Tyttöillä S-EPO oli matalimmillaan 5 viikon iässä ja nousi 9 viikon ikään mennessä ($P = 0,017$).



KUVA 1. Hemoglobiini-taso tarkasteltuna postmenstruaali-ikänsuhteen alle 32. raskausviikolla syntyneillä tytöillä ja pojilla.

9.2 Rautatasapainon muutokset

Pojilla S-Ferrit-pitoisuus oli korkeimmillaan 3 viikon iässä ja laski 9 viikon ikään mennessä ($P < 0,001$). Tyttöjen ferritiinitaso oli korkeimmillaan 3 viikon iästä 5 viikon ikään asti, jonka jälkeen taso laski merkitsevästi 9 viikon ikään saakka ($P < 0,001$). Pojilla oli 9 viikon iässä matalampi S-Ferrit-pitoisuus kuin tytöillä ($P = 0,037$, taulukko 2). Sekä pojilla että tytöillä S-TfR-pitoisuus oli korkeimmillaan 3 viikon iässä ja se laski 5 viikon ikään mennessä ja pysyi samalla tasolla 9 viikon ikään asti ($P < 0,001$). S-TfR-pitoisuudessa ei ollut sukupuolieroa.

TAULUKKO 2. Punaisen verenkuvan ja rauta-aineenvaihdunnan merkkiaineet alle 32. raskausviikolla syntyneillä tytöillä ja pojilla 3–9 viikon iässä.

	Sukupuoli	Viikko 3	Viikko 5	Viikko 7	Viikko 9
Hb	Poika	120 (106–133) ¹	102 (89–119)	94 (89–106)	99 (93–114)
	Tyttö	111 (101–124) ¹	109 (100–128)	98 (85–106)	99 (88–108.0)
Hkr	Poika	0.35 (0.31–0.40) ²	0.29 (0.26–0.35)	0.28 (0.26–0.31)	0.30 (0.28–0.34)
	Tyttö	0.34 (0.30–0.38) ²	0.33 (0.30–0.38)	0.29 (0.26–0.33)	0.30 (0.26–0.32)
Eryt	Poika	3.6 (3.1–4.2)	3.2 (2.9–3.8)	3.1 (2.9–3.5)	3.3 (3.1–3.9)
	Tyttö	3.5 (3.2–3.8)	3.6 (3.1–4.3)	3.3 (2.9–3.6)	3.4 (3.0–3.7)
MCV	Poika	97 (92–103)	92 (89–96)	90 (88–92)	89 (87–91)
	Tyttö	95 (93–101)	91 (88–95)	90 (87–94)	88 (85–92)
Retikabs	Poika	62.9 (51.4–107.3)	101.0 (79.5–126.7)	125.0 (78.3–169.9)	164.5 (124.0–176.9)
	Tyttö	82.9 (55.6–133.3)	104.8 (70.9–146.5)	154.0 (107.6–189.2)	175.7 (110.1–237.0)
S-EPO	Poika	8.8 (3.5–18.6)	9.3 (5.1–15.0)	10.9 (5.2–16.7)	8.6 (7.1–19.5)
	Tyttö	7.6 (3.5–12.7)	5.1 (4.5–10.3)	9.3 (5.3–17.0)	11.2 (6.1–18.4)
S-Ferrit	Poika	205 (137–302)	134 (95–196)	116 (88–193)	108 (77–178) ³
	Tyttö	220 (146–400)	211 (105–367)	150 (80–356)	147 (100–295) ³
TfR	Poika	2.7 (2.1–3.1)	1.8 (1.4–2.4)	1.7 (1.3–2.6)	1.9 (1.6–2.7)
	Tyttö	2.5 (1.9–2.8)	1.6 (1.3–1.9)	1.7 (1.3–2.3)	1.9 (1.6–2.4)

Taulukkoon merkitty mediaani kummallakin sukupuolella sekä sulkuihin ala- ja yläkvartiilit.

Hb = hemoglobiini (g/l), Hkr = hematokriitti (osuus), Eryt = erytrosyytit (E 12/l), MCV = punasolujen keskitilavuus (fl), Retikabs = retikulosyyttien absoluuttinen määrä (10 E9/l), S-EPO = seerumin erytropoietiini (U/l), S-Ferrit = seerumin ferritiini (µg/l), TfR = transferriniireseptori (mg/l)

1) tilastollisesti merkitsevä ero sukupuolten välillä P = 0,0130

2) tilastollisesti merkitsevä ero sukupuolten välillä P = 0,043

3) tilastollisesti merkitsevä ero sukupuolten välillä P = 0,037

9.3 Virtsan ja seerumin hepsidiinikonsentraatioiden muutokset

Pojilla seerumin hepsidiinipitoisuus oli korkeimmillaan 3 viikon iässä ja se laski 7 viikon ikään mennessä ($P = 0,004$), jonka jälkeen taso pysyi samana 9 viikon ikään saakka. Tyttöillä seerumin hepsidiinitaso pysyi samana 3 viikon iästä 7 viikon ikään, jonka jälkeen se laski 9 viikon ikään mennessä ($P < 0,001$). 9 viikon iässä tytöillä oli matalampi seerumin hepsidiinitaso kuin pojilla ($P = 0,001$, taulukko 3). Pojilla virtsan hepsidiinitaso ei muuttunut 3 ja 9 viikon iän välillä. Tytöillä virtsan hepsidiinitaso käyttäytyi samoin kuin seerumin hepsidiini ja 9 viikon iässä myös virtsan hepsidiinitaso oli matalampi kuin pojilla ($P = 0,008$, taulukko 3). Positiivinen korrelaatio seerumin ja virtsan hepsidiinin välillä havaittiin kaikissa aikapisteissä (Spearmanin rho 0,58–0,82 ja $P < 0,001$).

TAULUKKO 3. Seerumin ja virtsan hepsidiini alle 32. raskausviikolla syntyneillä tytöillä ja pojilla 3–9 viikon iässä.

	Sukupuoli	Viikko 3	Viikko 5	Viikko 7	Viikko 9
S-heps	Poika	6.0 (3.9–13.0)	4.4 (2.1–9.8)	3.9 (1.9–8.0)	5.2 (2.3–9.3) ¹
	Tyttö	5.1 (3.1–14.7)	5.8 (3.4–9.3)	4.5 (0.9–13.0)	2.5 (0.8–5.3) ¹
U-heps	Poika	16.0 (4.0–55.7)	9.0 (3.8–44.4)	15.5 (4.1–31.3)	15.4 (6.1–30.1) ²
	Tyttö	22.9 (4.3–88.7)	34.6 (10.8–62.0)	22.3 (5.9–109.5)	10.3 (2.6–19.6) ²

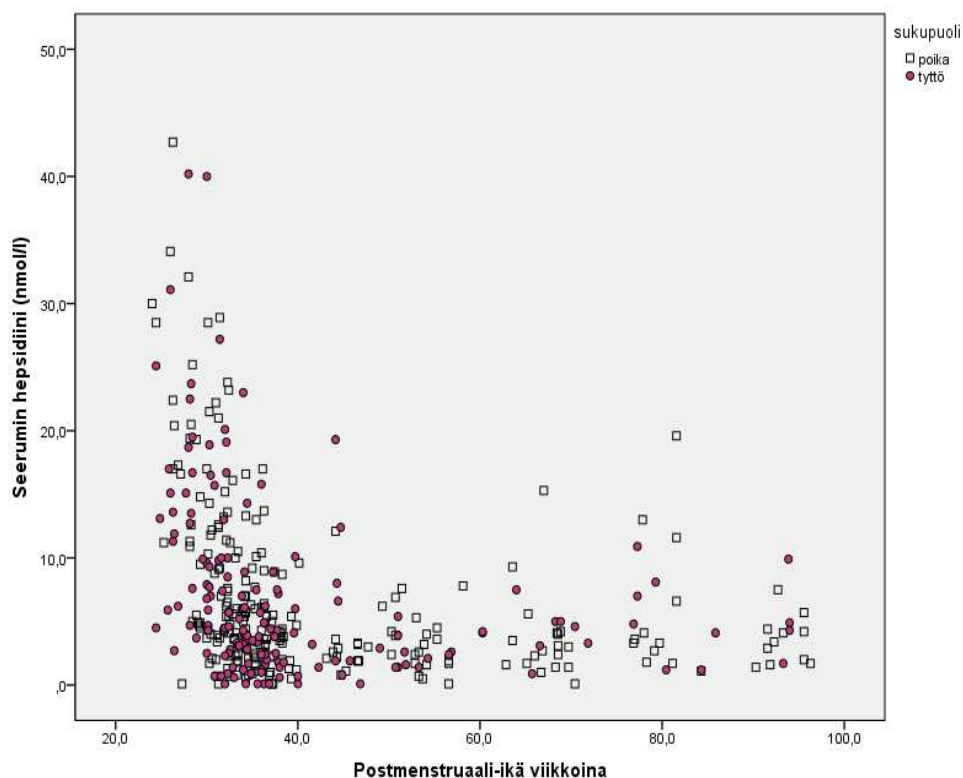
Taulukkoon merkitty mediaani sekä sulkuihin ala- ja yläkvartiilit.

S-heps = seerumin hepsidiini (nmol/l), U-heps = virtsan hepsidiini kreatiniiniin suhteutettuna (nmol/mmol kreatiniinia)

1) tilastollisesti merkitsevä ero sukupuolten välillä $P = 0,001$

2) tilastollisesti merkitsevä ero sukupuolten välillä $P = 0,008$

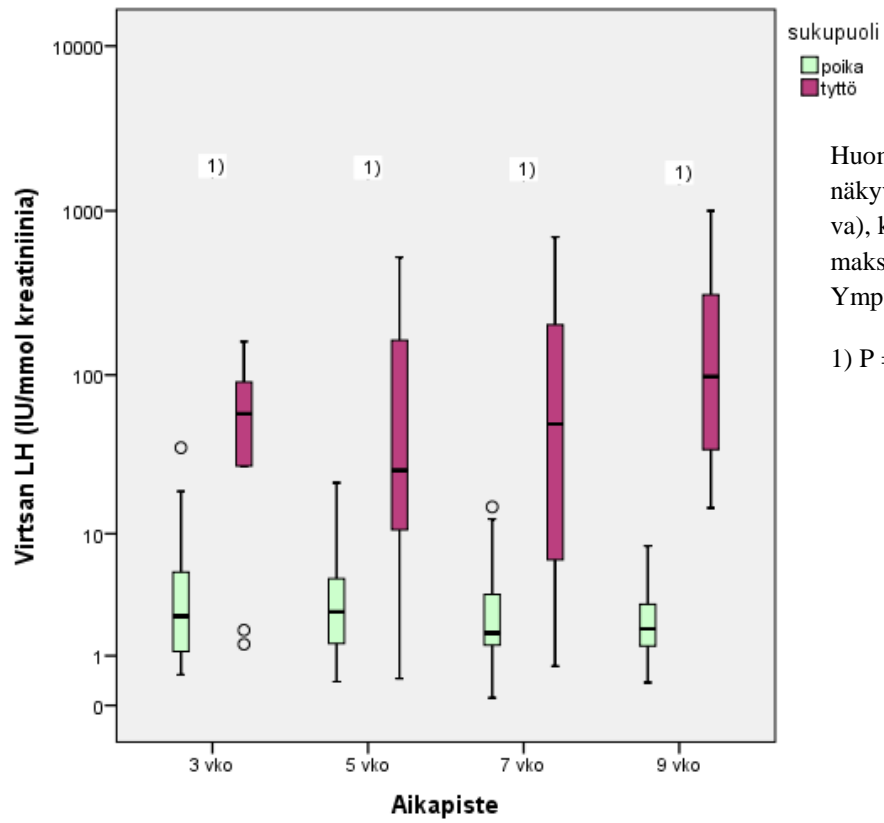
Tytöillä ja pojilla sekä seerumin että virtsan hepsidiinitasot olivat korkeimmillaan ennen laskettua aikaa. Hepsidiini laski jyrkästi lähestyttäessä laskettua aikaa, jonka jälkeen hepsidiinitaso pysyi varsin tasaisena (kuva 2).



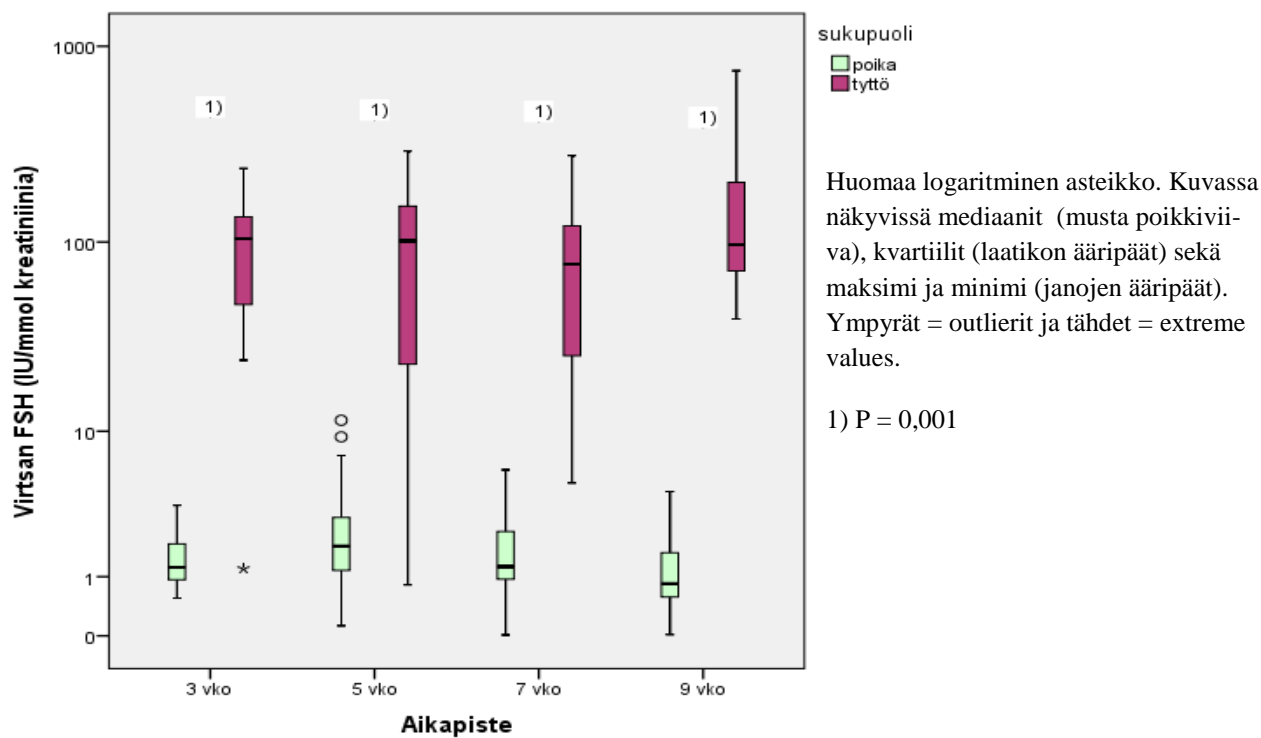
KUVA 2. Seerumin hepsidiini alle 32. raskausviikolla syntyneillä tytöillä ja pojilla postmenstruaali-ikänsä suhteen.

9.4 Sukupuolihormonit

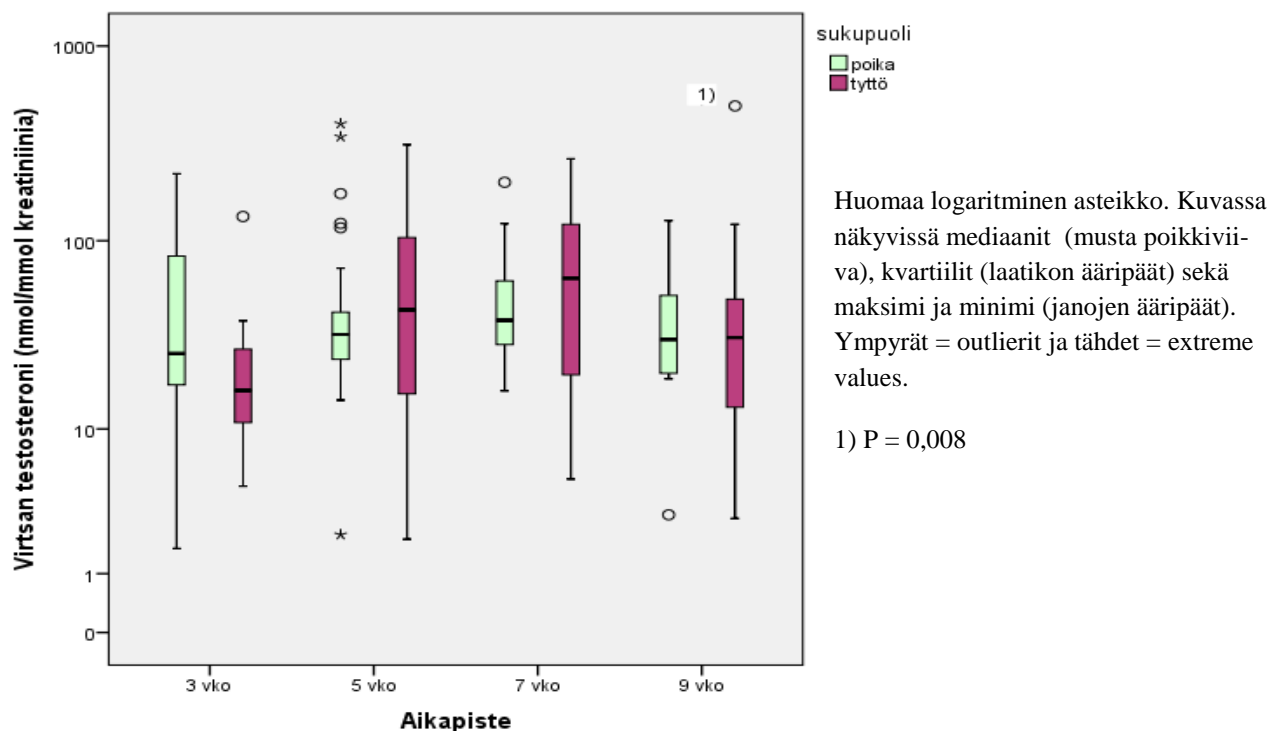
Pojilla gonadotropiinit LH ja FSH eivät muuttuneet 3 viikon ja 9 viikon iän välillä. LH ja FSH olivat pojilla merkitsevästi matalammat kuin tytöillä koko tutkittavalla aikavälillä ($P = 0,001$, kuvat 3 ja 4). Tytöillä LH nousi 7 viikon iästä 9 viikon ikään ($P = 0,045$). FSH laski tytöillä 3 viikon iästä 7 viikon ikään ($P = 0,044$), jonka jälkeen se nousi 9 viikon ikään mennessä ($P = 0,045$). Testosteroni ei muuttunut pojilla 3 ja 9 viikon iän välillä. 9 viikon iässä pojilla oli korkeampi testosteronitaso kuin tytöillä ($P = 0,008$, kuva 5).



KUVA 3. Virtsan lutenisoiva hormoni (LH) alle 32. raskausviikolla syntyneillä tytöillä ja pojilla 3–9 viikon iässä.



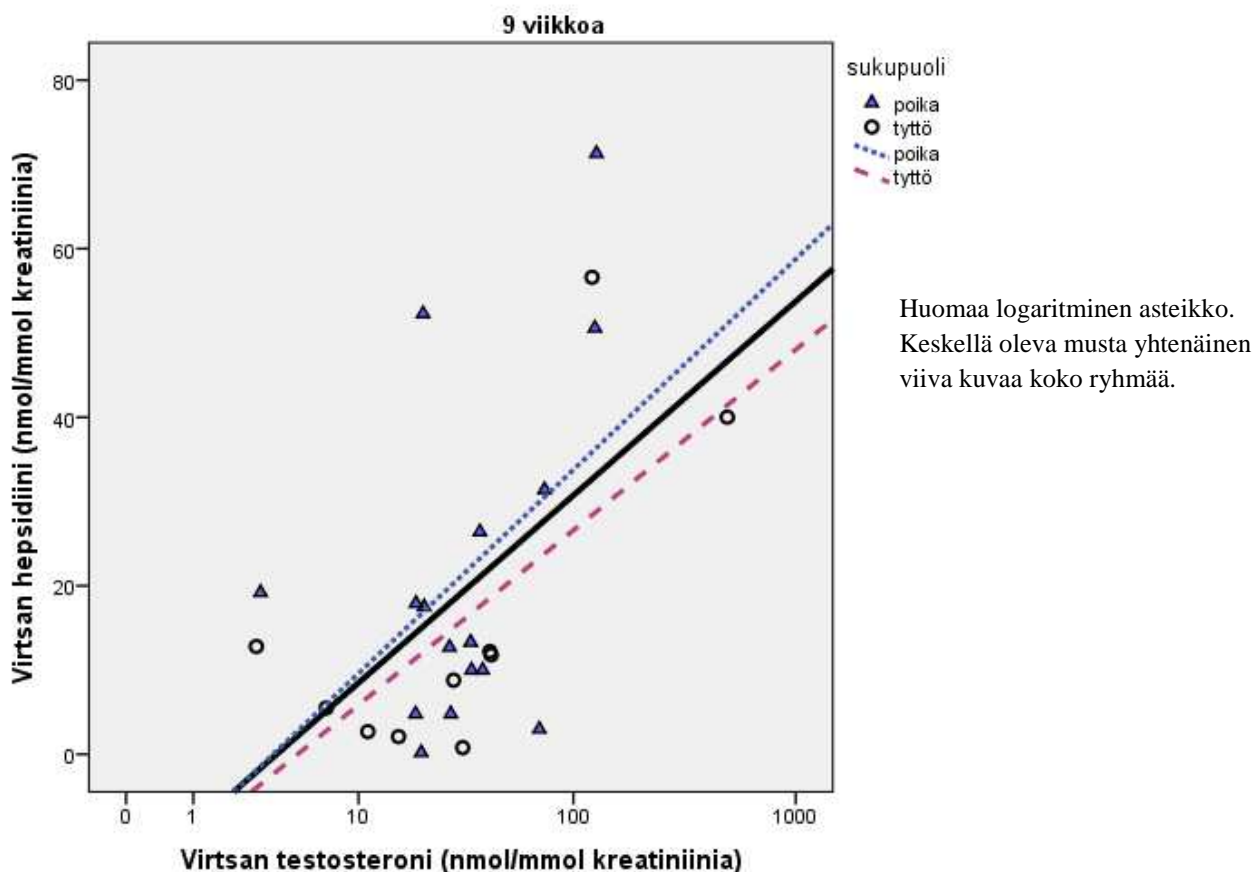
KUVA 4. Virtsan follikkeliä stimuloiva hormoni (FSH) alle 32. raskausviikolla syntyneillä tytöillä ja pojilla 3–9 viikon iässä.



KUVA 5. Virtsan testosteroni alle 32. raskausviikoilla syntyneillä tytöillä ja pojilla 3–9 viikon iässä.

9.5 Testosteronin ja hepsidiinin yhteys

Virtsan testosteronin ja seerumin sekä virtsan hepsidiinin yhteyttä tutkittiin aineiston pienen koon vuoksi koko tutkittavalla aineistolla jakamatta aineistoa sukupuolen mukaisiin ryhmiin. Virtsan testosteroni ja virtsan hepsidiini korreloivat positiivisesti 5 (Spearmanin $\rho = 0,372$, $P = 0,006$) ja 9 (Spearmanin $\rho = 0,442$, $P = 0,024$) viikon iässä. Seerumin hepsidiinin ja virtsan testosteronin välillä ei todettu tilastollisesti merkitseviä korrelaatioita.



KUVA 6. Virtsan testosteronin ja virtsan hepsidiinin positiivinen korrelaatio alle 32. raskausviikolla syntyneillä keskosilla 9 viikon iässä.

9.6 Erytropoietiinin ja hepsidiinin yhteys

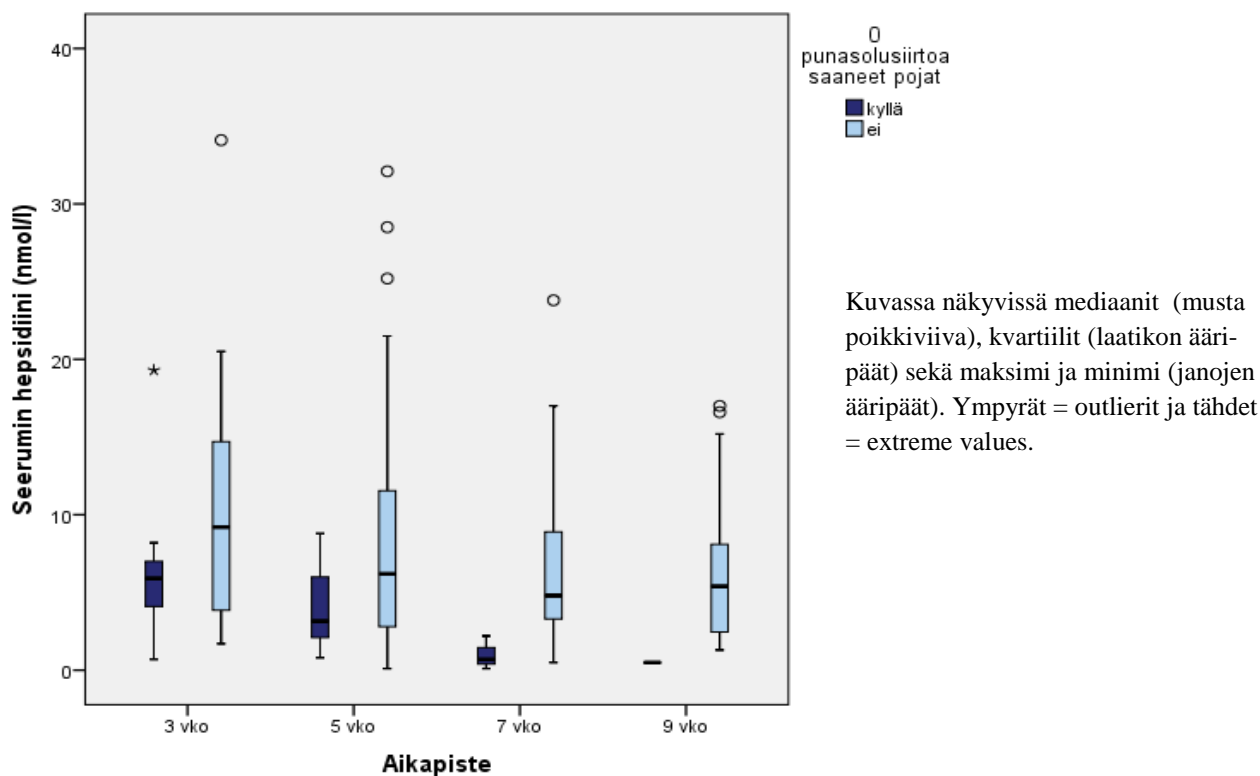
S-EPO:n ja hepsidiinin yhteyttä tutkittiin aineiston pienen koon vuoksi koko aineistossa. Virtsan hepsidiini ja S-EPO korreloivat negatiivisesti 5 (Spearmanin rho -0,417, P = 0,003), 7 (Spearmanin rho -0,496, P = 0,002) ja 9 viikon (Spearmanin rho -0,410, P = 0,047) iässä. Seerumin hepsidiini ja S-EPO korreloivat negatiivisesti 7 viikon iässä (Spearmanin rho -0,462, P = 0,002).

9.7 Testosteronin ja erytropoietiinin yhteys

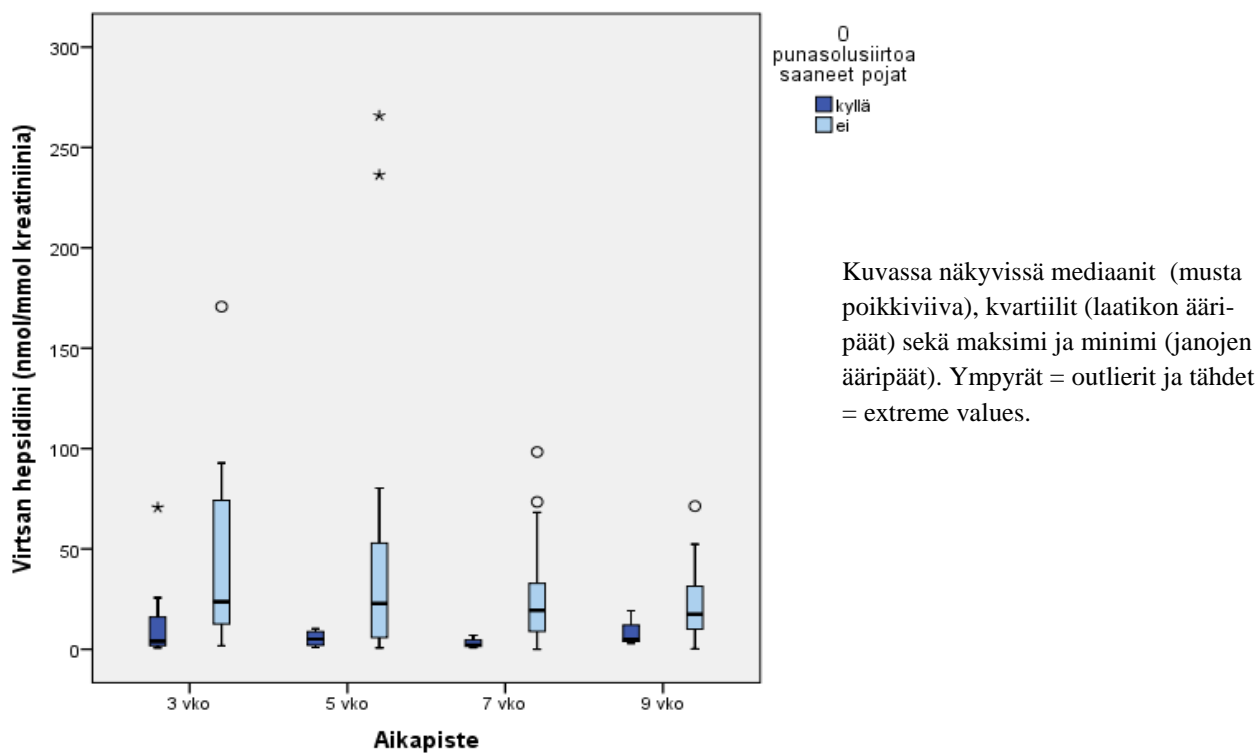
Koko tutkimusjoukkoa analysoitaessa yhteyttä testosteronin ja EPO:n välillä ei havaittu.

9.8 Erot punasolusiiroja saaneilla ja ei saaneilla pojilla

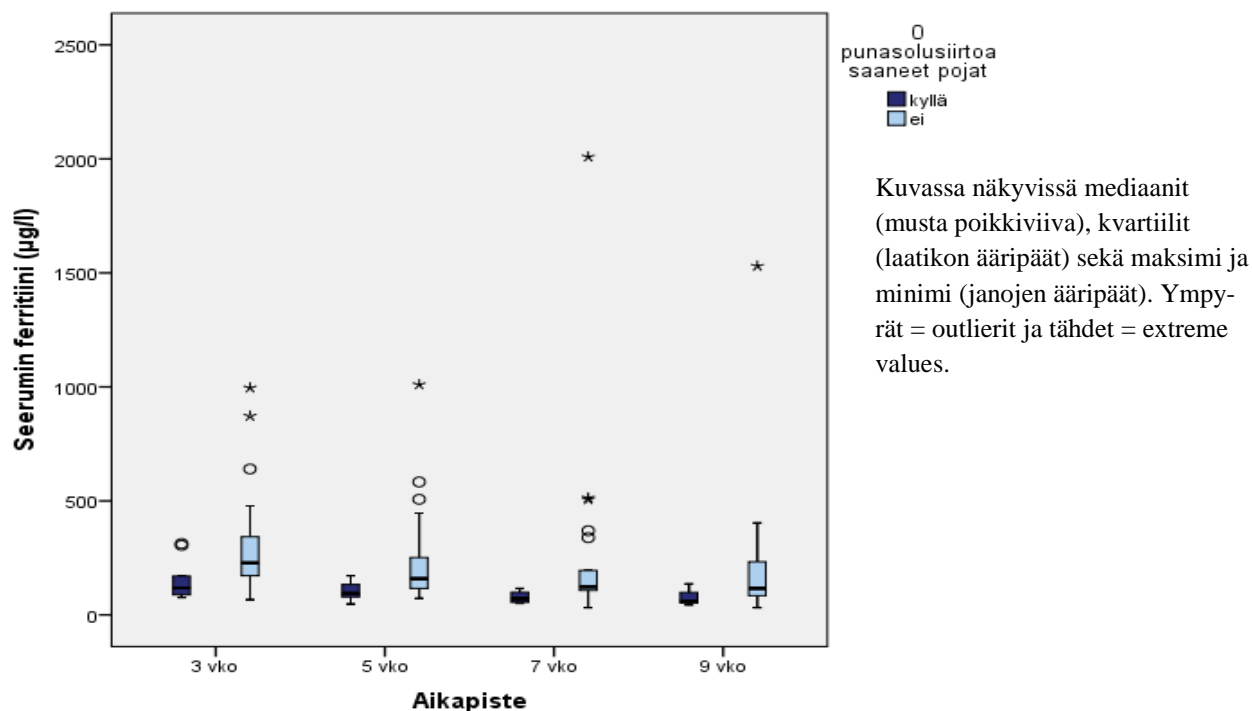
Pojista 10 ei saanut ollenkaan punasolusiiroja. Havainnot viittaavat siihen, että näillä pojilla on matalampi seerumin ja virtsan hepsidiini kuin punasolujasiiroja saaneilla pojilla (kuvat 7A ja B). Lisäksi S-Ferrit oli matalampi pojilla, jotka eivät saaneet punasolusiiroja (kuva 7C). Havaintojen vähyyden vuoksi tarkempia analyysejä erojen vahvistamiseksi ei tehty. Punasoluja saamattomilla pojilla havaittiin tutkimushypoteesin mukainen negatiivinen korrelaatio testosteronissa ja seerumin hepsidiinissä 5 viikon iässä (Spearmanin rho -0,867, P = 0,001, kuva 8). Muita korrelaatioita testosteronin, EPO:n eikä hepsidiinin välillä havaittu.



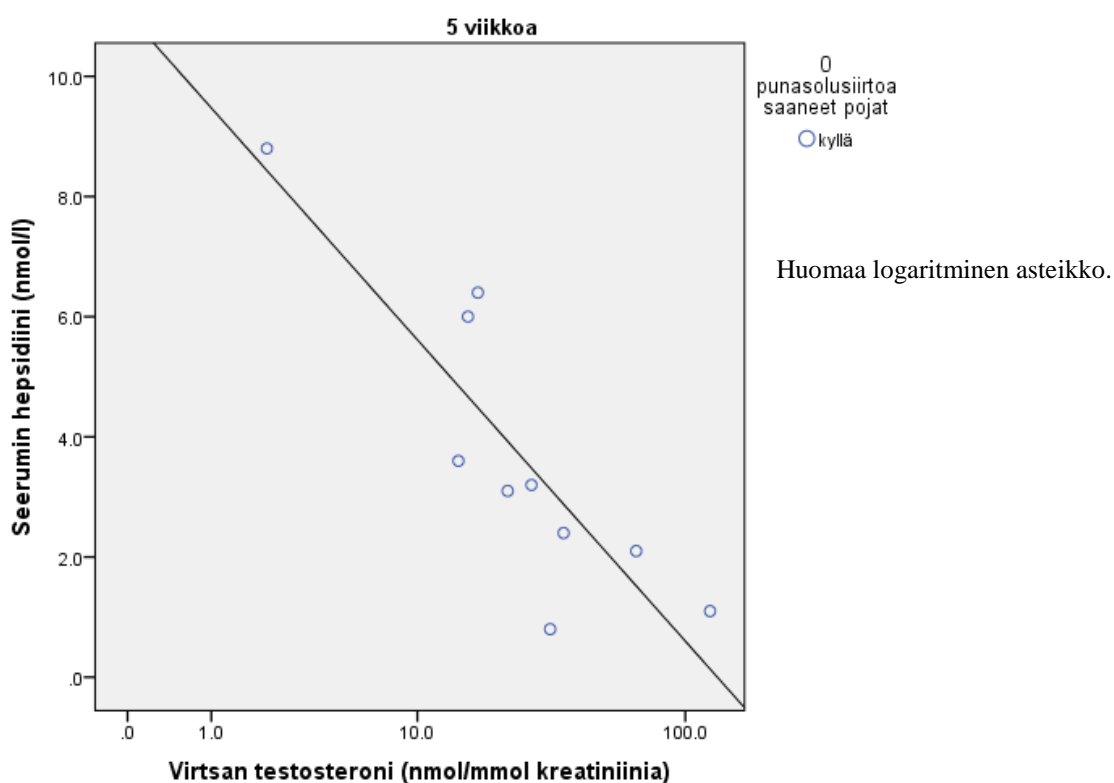
KUVA 7A. Seerumin hepsidiini alle 32 raskausviikolla syntyneillä punasolusiirtoja saaneille ja saamattomilla pojilla 3–9 viikon iässä.



KUVA 7B. Virtsan hepsidiini alle 32 raskausviikolla syntyneillä punasolusiirtoja saaneille ja saamattomilla pojilla 3–9 viikon iässä.



KUVA 7C. Seerumin ferritiini alle 32 raskausviikolla syntyneillä punasolusiiirtoja saaneille ja saamattomilla pojilla 3–9 viikon iässä.



KUVA 8. Seerumin hepsidiinin ja virtsan testosteronin yhteys alle 32 raskausviikolla syntyneillä punasolusiiirtoja saamattomilla pojilla viiden viikon iässä.

10. POHDINTA

Hb, Hkr ja punasolut laskivat tytöillä ja pojilla syntymän jälkeen. Tämä sopii fysiologiseen anemiaan, joka keskosilla ilmenee suurempana Hb-laskuna jo 1–2 kuukautta aiemmin kuin täysiaikaisilla vastasyntyneillä (Rao ja Georgieff 2002; 2007). Tässä tutkimuksessa pojilla Hb, Hkr ja erytrosyytit laskivat aiemmin kuin tytöillä. 3 viikon iässä pojilla oli korkeampi Hb ja Hkr kuin tytöillä, minkä jälkeen sukupuoliero hävisi. Retikulosyyttien määrä oli alimmillaan syntyessä ja nousi 9 viikon ikään mennessä. Tytöillä retikulosyyttien määrä lisääntyi aiemmin kuin pojilla ja myös EPO-taso nousi 5 viikon iästä 9 viikon ikään mennessä. Löydökset viittaavat erytropoieesiaktiivisuuden lisääntymiseen. On mahdollista, että pojilla keskosanemia alkaa aiemmin ja kestää pidempään kuin tytöillä. Aiempia vastaavia tutkimuslöydöksiä ei tietävästi ole. Toisaalta punasolusiirrot ovat tässä tutkimuksessa sekoittavina tekijöinä. 10 poikaa ei saanut punasolusiirtoja, kun taas tytöistä kaikki 1:tä lukuun ottamatta saivat punasolusiirtoja. Hb, Hkr ja retikulosyyttien määrä käyttäytyivät samalla tavalla kuin aiemmassa keskostutkimuksessa, jossa Hb ja Hkr olivat korkeimmillaan syntyessä ja laskivat 11 viikon ikään asti, ja retikulosyyttien määrä oli alimmillaan syntyessä ja nousi 11 viikon ikään mennessä (Makela ym. 2008).

Seerumin ja virtsan hepsidiinitasossa nähtiin samanlainen lasku ensimmäisten elinviikkojen aikana laskettua aikaa lähestyttäessä kuin hemoglobiinissa. Lasketun ajan jälkeen hepsidiinipitoisuus säilyi varsin tasaisena matalalla tasolla. Useat tekijät vaikuttavat keskosilla hepsidiinin eritykseen (Collard 2009) ja ovat sekoittavia tekijöitä myös tässä tutkimuksessa. Systeminen inflammaatio ja infektio ovat olleet yhteydessä korkeaan hepsidiiniin (Müller ym. 2012, Wu ym. 2013). Lisäksi nuorimmilla keskosilla on ollut korkea hepsidiinipitoisuus (Müller ym. 2012). Edes hepsidiinin korrelaatio rautaparametreihin ja EPOon vastasyntyneellä ei ole yksiselitteinen (Berglund ym. 2011, Müller ym. 2012, Briana ym. 2013). Keskosilla on syntyessään pienemmät rautavarastot kuin täysiaikaisilla vastasyntyneillä (Rao ja Georgieff 2002, Collard 2009), mikä sopii tässä tutkimuksessa havaittuun hepsidiinipitoisuuden laskuun. Tässä tutkimuksessa virtsan hepsidiini korreloi useassa aikapisteessä negatiivisesti EPOon, mikä tukee aiempia hiiritutkimushavaintoja, joissa erytropoieesiaktiivisuus EPO-välitteisesti säätelee hepsidiiniä (Sasaki ym. 2012, Guo ym. 2013).

Berglundin ym. (2011) tutkimuksessa seerumin hepsidiini reagoi raudanpuutteeseen, rautalisiin sekä rautaylimäärään vasta 12 viikon ikäisillä lapsilla. Meidän tutkimuksessamme ei

erikseen tutkittu hepsidiinin yhteyttä rautaparametreihin. Aiemmin on esitetty, että rautasäättely kypsyy imeväisiässä (Hicks ym. 2006). Samassa Hicksin ym. (2006) tutkimuksessa todettiin, että imeväisiän alussa lapset eivät pysty säätelemään raudan imeytymistä suolesta, vaan mekanismit kehittyvät vasta 5–6 kuukauden ikäisenä. On mahdollista, että hepsidiinivälitteinen rautasäättely on tärkeässä roolissa imeväisiän alussa, jolloin raudan imeytymisen säätely ei vielä ole kehittynyt.

Tässä tutkimuksessa keskosten hupeneviin rautavarastoihin viittasi MCV:n ja S-Ferrit-pitoisuuden lasku syntymän jälkeen. Tiedetään, että verinäytteiden otot ja riittämätön rautakorvaus pahentavat keskosten raudanpuutetta. Lisäksi keskokset tarvitsevat rautaa myös nopeaan kasvuun (Rao ja Georgieff 2002; 2007). Tämä voi selittää raudankäyttöä ja laskevaa hepsidiinipitoisuutta, vaikka keskosanemian aikana erytropoieesiaktiivisuus on matala. Toisaalta on esitetty, ettei S-Ferrit ole käyttökelpoinen rautatasapainon mittari keskosilla (Mäkelä ym. 2008). S-TfR-pitoisuus oli tässä tutkimuksessa korkeimmillaan 3 viikon iässä, jonka jälkeen se laski 5 viikon ikään mennessä. S-Ferrit ja S-TfR käyttäytyivät samansuuntaisesti kuin Mäkelän ym. (2008) keskostutkimuksessa, jossa S-TfR-taso oli korkeimmillaan syntyessä ja laski 9 viikon ikään mennessä, jonka jälkeen se alkoi taas nousta. Heidän tutkimuksessaan myös S-Ferrit-pitoisuus laski syntymän jälkeen.

9 viikon iässä pojilla oli matalampi S-Ferrit-pitoisuus kuin tytöillä. Samassa iässä pojilla oli korkeampi testosteroni kuin tytöillä. Murrosiässä kiihtynyt erytropoieesi aiheuttaa rautavarastojen hupenemisen (Hero ym. 2005). Mahdollisesti poikien voimakkaampi kasvu tai lisääntynyt erytropoieesiaktiivisuus voisi selittää löydettyä sukupuolieroa. Tiedetään, että imeväisiässä pojat ovat tyttöjä alttiimpia raudanpuuteanemian kehittymiselle (Domellöf ym. 2002, Wieringa ym. 2007). Pojilla oli kuitenkin korkeampi seerumin ja virtsan hepsidiinitaso kuin tytöillä 9 viikon iässä. Koholla oleva hepsidiinipitoisuus on aiemmin yhdistetty hyviin rautavarastoihin (Berglund ym. 2011, Kroot ym. 2011, Ganz ja Nemeth 2012)}. Todennäköisesti punasolusierrot ja muut sekoittavat tekijät vaikuttavat löydökseen.

LH ja FSH olivat pojilla matalammat kuin tytöillä 3 viikon iästä 9 viikon ikään. Löydös eroa aiemmista havainnoista, joissa pojilla LH on korkeampi kuin tytöillä (Forest ym. 1974, Forest ja Ducharme 1993, Grumbach 2005). Toisaalta Shinkawan ym. (1983) tutkimuksessa vastasyntyneillä täysiaikaisilla ja keskosenä syntyneillä tytöillä FSH oli korkeampi kuin pojilla. Heidän tutkimuksessaan alle 32. raskausviikolla syntyneillä keskostytöillä FHS oli korkeampi kuin pojilla 5–75 päivän iässä. Samassa tutkimuksessa alle 32.

raskausviikolla keskosena syntyneillä tytöillä LH oli korkeampi 11–50 päivän iässä kuin pojilla (Shinkawa ym. 1983). Meidän tutkimuksessamme testosteronissa havaittiin sukupuoliero ainoastaan 9 viikon iässä, jolloin pojilla oli korkeampi testosteronipitoisuus kuin tytöillä.

EPO:n ja testosteronin yhteydestä on ristiriitaista näyttöä (Rishpon-Meyerstein ym. 1968, Saitoh ym. 1999, Hero ym. 2005, Coviello ym. 2008, Hara ym. 2010, Guo ym. 2013, Maggio ym. 2013). Tässä tutkimuksessa testosteronilla ja EPolla ei havaittu yhteyttä. Testosteroni ja virtsan hepsidiini korreloivat positiivisesti koko tutkimusjoukossa 5 ja 9 viikon iässä. Löydös on päinvastainen kuin tutkimushypoteesissa ja aiemmissa tutkimuksissa, joissa testosteroni alentaa hepsidiiniä (Bachman ym. 2010, Guo ym. 2013, Bachman ym. 2014). Toisaalta murrosikäisillä pojilla on havaittu, että erytropoieesi kiihtyy vasta murrosiän loppupuolella (Hero ym. 2005). On myös mahdollista, että 9 ensimmäisen elinviikon aikana erytropoieesi ei ehdi vielä reagoida testosteroniin. Tutkimushypoteesin mukainen negatiivinen seerumin hepsidiinin ja virtsan testosteronin välinen korrelaatio havaittiin kuitenkin 5 viikon iässä pojilla, jotka eivät saaneet punasolusiirtoja. Näitä poikia oli vain 10, joten löydöksen merkitystä ei pysty luotettavasti arvioimaan.

11. JOHTOPÄÄTÖS

Tutkimushypoteesin mukaista testosteronin aiheuttamaa hepsidiinipitoisuuden laskua ja sen heijastumista punaiseen verenkuvaan ja rautaparametreihin ei havaittu. Toisaalta tutkitavat olivat pieniä keskusia, joilla punasolusierrot, inflammaatio ja anemia vaikuttavat sekoittavina tekijöinä. Lisäksi testosteronissa havaittiin sukupuoliero ainoastaan 9 viikon iässä. 10 poikaa ei saanut lainkaan punasolusierroja. Havainnot viittaavat siihen, että näillä pojilla oli matalampi seerumin ja virtsan hepsidiinipitoisuus sekä S-Ferrit-taso kuin punasolujasierroja saaneilla pojilla. Näillä pojilla havaittiin myös tutkimushypoteesin mukainen seerumin hepsidiinin ja virtsan testosteronin välinen negatiivinen korrelaatio 5 viikon iässä. Tarvitaan lisää tutkimuksia terveillä, täysiaikaisilla vastasyntyneillä selvittämään, vaikuttaako minipuberteetin aikainen testosteronipitoisuuden suureneminen hepsidiinitasoihin vastasyntyneillä.

12. LÄHTEET

Abu EO, Horner A, Kusec V, Triffitt JT, Compston JE. The localization of androgen receptors in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3493-3497.

Al-Mufti R, Hambley H, Farzaneh F, Nicolaides KH. Fetal and embryonic hemoglobins in erythroblasts from fetal blood and fetal cells enriched from maternal blood in pregnancies complicated by maternal diabetes mellitus. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2004;15:109-114.

Andersson AM, Toppari J, Haavisto AM, Petersen JH, Simell T, Simell O, Skakkebaek NE. Longitudinal reproductive hormone profiles in infants: peak of inhibin B levels in infant boys exceeds levels in adult men. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:675-681.

Bachman E, Feng R, Travison T, Li M, Olbina G, Ostland V, Ulloor J, Zhang A, Basaria S, Ganz T, Westerman M, Bhasin S. Testosterone suppresses hepcidin in men: a potential mechanism for testosterone-induced erythrocytosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4743-4747.

Bachman E, Travison TG, Basaria S, Davda MN, Guo W, Li M, Connor Westfall J, Bae H, Gordeuk V, Bhasin S. Testosterone Induces Erythrocytosis via Increased Erythropoietin and Suppressed Hepcidin: Evidence for a New Erythropoietin/Hemoglobin Set Point. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014;69:725-735.

Bard H. The postnatal decline of hemoglobin F synthesis in normal full-term infants. *J Clin Invest* 1975;55:395-398.

Bard H. Postnatal fetal and adult hemoglobin synthesis in early preterm newborn infants. *J Clin Invest* 1973;52:1789-1795.

Bard H, Makowski EL, Meschia G, Battaglia FC. The relative rates of synthesis of hemoglobins A and F in immature red cells of newborn infants. *Pediatrics* 1970;45:766-772.

Baron MH. Concise Review: Early Embryonic Erythropoiesis: Not so Primitive After All. *Stem Cells* 2013;31:849-856.

Basseri RJ, Nemeth E, Vassilaki ME, Basseri B, Enayati P, Shaye O, Bourikas LA, Ganz T, Papadakis KA. Hepcidin is a key mediator of anemia of inflammation in Crohn's disease. *J Crohns Colitis* 2013;7:e286-91.

Berglund S, Lönnerdal B, Westrup B, Domellöf M. Effects of iron supplementation on serum hepcidin and serum erythropoietin in low-birth-weight infants. *Am J Clin Nutr* 2011;94:1553-1561.

Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, Singh AB, Mac RP, Lee M, Yarasheski KE, Sinha-Hikim I, Dzekov C, Dzekov J, Magliano L, Storer TW. Older men are as responsive as young men to the anabolic effects of graded doses of testosterone on the skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:678-688.

Briana DD, Boutsikou T, Baka S, Boutsikou M, Stamati L, Hassiakos D, Gourgiotis D, Malamitsi-Puchner A. Perinatal role of hepcidin and iron homeostasis in full-term intrauterine growth-restricted infants. *Eur J Haematol* 2013;90:37-44.

Cangemi G, Pistorio A, Miano M, Gattorno M, Aquila M, Bicocchi MP, Gastaldi R, Riccardi F, Gatti C, Fioredda F, Calvillo M, Melioli G, Martini A, Dufour C. Diagnostic potential of hepcidin testing in pediatrics. *Eur J Haematol* 2013;90:323-330.

Chellakooty M, Schmidt IM, Haavisto AM, Boisen KA, Damgaard IN, Mau C, Petersen JH, Juul A, Skakebæk NE, Main KM. Inhibin A, inhibin B, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and sex hormone-binding globulin levels in 473 healthy infant girls. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3515-3520.

Cherian S, Forbes DA, Cook AG, Sanfilippo FM, Kemna EH, Swinkels DW, Burgner DP. An insight into the relationships between hepcidin, anemia, infections and inflammatory cytokines in pediatric refugees: a cross-sectional study. *PLoS One* 2008;3:e4030.

Collard KJ. Iron homeostasis in the neonate. *Pediatrics* 2009;123:1208-1216.

Coviello AD, Kaplan B, Lakshman KM, Chen T, Singh AB, Bhasin S. Effects of graded doses of testosterone on erythropoiesis in healthy young and older men. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:914-919.

de Jong M, Rotteveel J, Heijboer AC, Cranendonk A, Twisk JW, van Weissenbruch MM. Urine gonadotropin and estradiol levels in female very-low-birth-weight infants. *Early Hum Dev* 2013;89:131-135.

de Jong M, Rotteveel J, Heijboer AC, Cranendonk A, Twisk JW, van Weissenbruch MM. Urine gonadotropin and testosterone levels in male very-low-birthweight infants. *Horm Res Paediatr* 2012;78:173-179.

Domellöf M. Iron requirements, absorption and metabolism in infancy and childhood. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:329-335.

Domellöf M, Lönnerdal B, Dewey KG, Cohen RJ, Rivera LL, Hernell O. Sex differences in iron status during infancy. *Pediatrics* 2002;110:545-552.

Dunkel L, Tapanainen P. Mitä uutta puberteetin endokrinologiasta. *Duodecim* 1997;113:619-627.

Forest MG, de Peretti E, Bertrand J. Testicular and adrenal androgens and their binding to plasma proteins in the perinatal period: developmental patterns of plasma testosterone, 4-androstenedione, dehydroepiandrosterone and its sulfate in premature and small for date infants as compared with that of full-term infants. *J Steroid Biochem* 1980;12:25-36.

Forest MG, Ducharme JR. Gonadotropic and Gonadal Hormones. Kirjassa: Bertrand J, Rappaport R, Sizonenko PC, toim. *Pediatric endocrinology: physiology, pathophysiology and clinical aspects*. Baltimore (MD): Williams&Williams 1993, s. 100-120.

Forest MG, Sizonenko PC, Cathiard AM, Bertrand J. Hypophyso-gonadal function in humans during the first year of life. 1. Evidence for testicular activity in early infancy. *J Clin Invest* 1974;53:819-828.

Ganz T. Heparin in iron metabolism. *Curr Opin Hematol* 2004;11:251-254.

Ganz T, Nemeth E. Heparin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823:1434-1443.

Gaughan WJ, Liss KA, Dunn SR, Mangold AM, Buhsmer JP, Michael B, Burke JF. A 6-month study of low-dose recombinant human erythropoietin alone and in combination with androgens for the treatment of anemia in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1997;30:495-500.

Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:188-202.

Greaves RF, Hunt RW, Chiriano AS, Zacharin MR. Luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone levels in extreme prematurity: development of reference intervals. *Pediatrics* 2008;121:e574-80.

Grumbach MM. A window of opportunity: the diagnosis of gonadotropin deficiency in the male infant. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3122-3127.

Guo W, Bachman E, Li M, Roy CN, Blusztajn J, Wong S, Chan SY, Serra C, Jasuja R, Travison TG, Muckenthaler MU, Nemeth E, Bhasin S. Testosterone administration inhibits hepcidin transcription and is associated with increased iron incorporation into red blood cells. *Aging Cell* 2013;12:280-291.

Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev* 2013;27:41-53.

Hara N, Nishiyama T, Takizawa I, Saito T, Kitamura Y, Takahashi K. Decline of the red blood cell count in patients receiving androgen deprivation therapy for localized prostate cancer: impact of ADT on insulin-like growth factor-1 and erythropoiesis. *Urology* 2010;75:1441-1445.

Hero M, Wickman S, Hanhijärvi R, Siimes MA, Dunkel L. Pubertal upregulation of erythropoiesis in boys is determined primarily by androgen. *J Pediatr* 2005;146:245-252.

Hicks PD, Zavaleta N, Chen Z, Abrams SA, Lönnerdal B. Iron deficiency, but not anemia, upregulates iron absorption in breast-fed peruvian infants. *J Nutr* 2006;136:2435-2438.

Hong EJ, Sahu B, Jänne OA, Hammond GL. Cytoplasmic accumulation of incompletely glycosylated SHBG enhances androgen action in proximal tubule epithelial cells. *Mol Endocrinol* 2011;25:269-281.

Huebers HA, Beguin Y, Pootrakul P, Einspahr D, Finch CA. Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis. *Blood* 1990;75:102-107.

Jospe N. *Endocrinology*. Kirjassa: Kliegman RM, Marcante KJ, Jenson HB, Behrman RE, toim. *Nelson Essentials of Pediatrics*. USA: Elsevier Saunders 2006, s. 771-824.

Juul A, Sørensen K, Aksglaede L, Garn I, Rajpert-De Meyts E, Hullstein I, Hemmersbach P, Ottesen AM. A common deletion in the uridine diphosphate glucuronyltransferase (UGT) 2B17 gene is a strong determinant of androgen excretion in healthy pubertal boys. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:1005-1011.

Kimura N, Mizokami A, Oonuma T, Sasano H, Nagura H. Immunocytochemical localization of androgen receptor with polyclonal antibody in paraffin-embedded human tissues. *J Histochem Cytochem* 1993;41:671-678.

Kitajima J, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Hara T. Serum prohepcidin concentrations at birth and 1 month after birth in premature infants. *Pediatr Blood Cancer* 2011;56:267-272.

Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ, Semenza GL. Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood* 1991;77:2497-2503.

Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC, Caro J, Graber SE. Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood* 1989;74:645-651.

Kroot JJ, Tjalsma H, Fleming RE, Swinkels DW. Heparin in human iron disorders: diagnostic implications. *Clin Chem* 2011;57:1650-1669.

Kuiri-Hänninen T, Haanpää M, Turpeinen U, Hämäläinen E, Seuri R, Tyrväinen E, Sankilampi U, Dunkel L. Postnatal ovarian activation has effects in estrogen target tissues in infant girls. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:4709-4716.

Kuiri-Hänninen T, Kallio S, Seuri R, Tyrväinen E, Liakka A, Tapanainen J, Sankilampi U, Dunkel L. Postnatal developmental changes in the pituitary-ovarian axis in preterm and term infant girls. *J Clin Endocrinol Metab* 2011a;96:3432-3439.

Kuiri-Hänninen T, Seuri R, Tyrväinen E, Turpeinen U, Hämäläinen E, Stenman UH, Dunkel L, Sankilampi U. Increased activity of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in infancy results in increased androgen action in premature boys. *J Clin Endocrinol Metab* 2011b;96:98-105.

Lackmann GM, Schnieder C, Böhner J. Gestational age-dependent reference values for iron and selected proteins of iron metabolism in serum of premature human neonates. *Biol Neonate* 1998;74:208-213.

Latour C, Kautz L, Besson-Fournier C, Island ML, Canonne-Hergaux F, Loréal O, Ganz T, Coppin H, Roth MP. Testosterone perturbs systemic iron balance through activation of epidermal growth factor receptor signaling in the liver and repression of hepcidin. *Hepatology* 2014;59:683-694.

Leberbauer C, Boulmé F, Unfried G, Huber J, Beug H, Müllner EW. Different steroids co-regulate long-term expansion versus terminal differentiation in primary human erythroid progenitors. *Blood* 2005;105:85-94.

Leong WI, Bowlus CL, Tallkvist J, Lönnerdal B. Iron supplementation during infancy--effects on expression of iron transporters, iron absorption, and iron utilization in rat pups. *Am J Clin Nutr* 2003;78:1203-1211.

Lodish H, Flygare J, Chou S. From stem cell to erythroblast: regulation of red cell production at multiple levels by multiple hormones. *IUBMB Life* 2010;62:492-496.

Maggio M, Snyder PJ, Ceda GP, Milaneschi Y, Luci M, Cattabiani C, Masoni S, Vignali A, Volpi R, Lauretani F, Peachey H, Valenti G, Cappola AR, Longo D, Ferrucci L. Is the haematopoietic effect of testosterone mediated by erythropoietin? The results of a clinical trial in older men. *Andrology* 2013;1:24-28.

Mäkelä E, Takala TI, Suominen P, Matomäki J, Salmi TT, Rajamäki A, Lapinleimu H, Lehtonen L, Irjala K, Lähteenmäki PM. Hematological parameters in preterm infants from birth to 16 weeks of age with reference to iron balance. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:551-557.

Mantalaris A, Panoskaltzis N, Sakai Y, Bourne P, Chang C, Messing EM, Wu JH. Localization of androgen receptor expression in human bone marrow. *J Pathol* 2001;193:361-366.

Moriyama Y, Fisher JW. Effects of testosterone and erythropoietin on erythroid colony formation in human bone marrow cultures. *Blood* 1975;45:665-670.

- Müller KF, Lorenz L, Poets CF, Westerman M, Franz AR. Hepcidin concentrations in serum and urine correlate with iron homeostasis in preterm infants. *J Pediatr* 2012;160:949-53.e2.
- Nemeth E. Hepcidin in beta-thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1202:31-35.
- Palis J. Ontogeny of erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 2008;15:155-161.
- Pelekanou V, Notas G, Sanidas E, Tsapis A, Castanas E ja Kampa M. Testosterone membrane-initiated action in breast cancer cells: Interaction with the androgen signaling pathway and EPOR. *Mol Oncol* 2010;4:135-49.
- Punnonen K, Irjala K, Rajamäki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997;89:1052-1057.
- Rao R, Georgieff MK. Iron in fetal and neonatal nutrition. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007;12:54-63.
- Rao R, Georgieff MK. Perinatal aspects of iron metabolism. *Acta Paediatr Suppl* 2002;91:124-129.
- Rehu M, Punnonen K, Ostland V, Heinonen S, Westerman M, Pulkki K, Sankilampi U. Maternal serum hepcidin is low at term and independent of cord blood iron status. *Eur J Haematol* 2010;85:345-352.
- Rishpon-Meyerstein N, Kilbridge T, Simone J, Fried W. The effect of testosterone on erythropoietin levels in anemic patients. *Blood* 1968;31:453-460.
- Saitoh T, Morimoto K, Kumagai T, Tsuboi I, Aikawa S, Horie T. Comparison of erythropoietic response to androgen in young and old senescence accelerated mice. *Mech Ageing Dev* 1999;109:125-139.
- Sankaran VG, Nathan DG. Reversing the hemoglobin switch. *N Engl J Med* 2010;363:2258-2260.
- Sankaran VG, Xu J, Orkin SH. Advances in the understanding of haemoglobin switching. *Br J Haematol* 2010;149:181-194.
- Sasaki Y, Noguchi-Sasaki M, Yasuno H, Yorozu K, Shimonaka Y. Erythropoietin stimulation decreases hepcidin expression through hematopoietic activity on bone marrow cells in mice. *Int J Hematol* 2012;96:692-700.
- Shahani S, Braga-Basaria M, Maggio M, Basaria S. Androgens and erythropoiesis: past and present. *J Endocrinol Invest* 2009;32:704-716.

Shanks JH, Hill CM, Lappin TR, Maxwell AP. Localization of erythropoietin gene expression in proximal renal tubular cells detected by digoxigenin-labelled oligonucleotide probes. *J Pathol* 1996;179:283-287.

Shiao SY, Ou CN. Accurate measurements of fetal hemoglobin for neonates with different gestational ages. *Hemoglobin* 2006;30:419-435.

Shinkawa O, Furuhashi N, Fukaya T, Suzuki M, Kono H, Tachibana Y. Changes of serum gonadotropin levels and sex differences in premature and mature infant during neonatal life. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56:1327-1331.

Siitonen T, Koistinen P. Verisolujen tuotanto ja sen säätely. Kirjassa: Ruutu T, Rajamäki A, Lassila R, Porkka K, toim. Veritaudit. Helsinki: Duodecim 2007, s. 16-25.

Snyder PJ, Peachey H, Berlin JA, Hannoush P, Haddad G, Dlewati A, Santanna J, Loh L, Lenrow DA, Holmes JH, Kapoor SC, Atkinson LE, Strom BL. Effects of testosterone replacement in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2670-2677.

Sweet DG, Savage GA, Tubman R, Lappin TR, Halliday HL. Cord blood transferrin receptors to assess fetal iron status. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2001;85:F46-8.

Takala TI, Mäkelä E, Suominen P, Matomäki J, Lapinleimu H, Lehtonen L, Rajamäki A, Irjala K, Lähteenmäki PM. Blood cell and iron status analytes of preterm and full-term infants from 20 weeks onwards during the first year of life. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:1295-1301.

Tiker F, Çelik B, Tarcan A, Kilicdag H, Özbek N, Gürakan B. Serum pro-hepcidin levels and relationships with iron parameters in healthy preterm and term newborns. *Pediatr Hematol Oncol* 2006;23:293-297.

Utriainen P, Jääskeläinen J, Voutilainen R. Blood Erythrocyte and Hemoglobin Concentrations in Premature Adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E87-91.

Varvarigou AA, Liatsis SG, Vassilakos P, Decavalas G, Beratis NG. Effect of maternal smoking on cord blood estriol, placental lactogen, chorionic gonadotropin, FSH, LH, and cortisol. *J Perinat Med* 2009;37:364-369.

Vlahakos DV, Marathias KP, Madias NE. The role of the renin-angiotensin system in the regulation of erythropoiesis. *Am J Kidney Dis* 2010;56:558-565.

Wieringa FT, Berger J, Dijkhuizen MA, Hidayat A, Ninh NX, Utomo B, Wasantwisut E, Winichagoon P. Sex differences in prevalence of anaemia and iron deficiency in infancy in a large multi-country trial in South-East Asia. *Br J Nutr* 2007;98:1070-1076.

Wu TW, Tabangin M, Kusano R, Ma Y, Ridsdale R, Akinbi H. The utility of serum hepcidin as a biomarker for late-onset neonatal sepsis. *J Pediatr* 2013;162:67-71.

Yapakçi E, Ecevit A, Gökmen Z, Tarcın A, Özbek N. Erythrocyte transfusions and serum prohepcidin levels in premature newborns with anemia of prematurity. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009a;31:840-842.

Yapakçi E, Tarcın A, Çelik B, Özbek N, Gürakan B. Serum pro-hepcidin levels in term and preterm newborns with sepsis. *Pediatr Int* 2009b;51:289-292.