

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ И КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

Д-р Виктор Емануилов Манолов

Определяне на референтни граници на хепсидин за българското население и проучване на клиничното му значение при различни патологични състояния

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”
докторска програма Клинична лаборатория

Научен ръководител:

Доц. Д-р Милена Велизарова, дм

Официални рецензенти:

Проф. Д-р Иванка Димитрова Паскалева, дмн

Проф. Д-р Тодорка Здравкова Цветкова, дмн

София, 2015 година

Дисертационният труд съдържа 196 страници, 78 фигури и 33 таблици. В библиографията са включени 206 заглавия, от които 3 на кирилица и 203 на латиница. Във връзка с дисертационния труд са реализирани 5 публикации и 6 участия в научни форуми. Осъществено е участие в 1 международен и 3 национални проекта. Дисертационният труд е обсъден на заседание на научния съвет към Катедра по Клинична лаборатория и клинична имунология, Медицински Университет – София и е насочен за защита пред научно жури в състав:

1. Проф. Д-р Камен Николаев Цачев, дмн, МУ-София
2. Доц. Д-р Милена Георгиева Велизарова, дм, МУ-София
3. Проф. Д-р Тодорка Здравкова Цветкова, дмн, външен член за МУ-София, МУ-Пловдив
4. Проф. Д-р Иванка Димитрова Паскалева, дмн, външен член за МУ-София, Национална Кардиологична Болница - София
5. Доц. Д-р Аделаида Лазарова Русева, дм, външен член за МУ-София, МУ-Плевен

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 19.03.2015 г. от 14.00 ч. в Аудиторията на Клиника по Нервни болести

Често използвани съкращения

АЛАТ (ALT) – аланин аминотрансфераза

АСАТ (AST) – аспартат аминотрансфераза

АХЗ – анемия на хроничното заболяване

ЖДА – желязо-дефицитна анемия

РА – ревматоиден артрит

ТЖСК – тотален желязо-свързващ капацитет

ХБЗ – хронично бъбречно заболяване

СКД-EPI – Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration

CLSI – Институт за клинични и лабораторни стандарти

CRP – С-реактивен протеин

CV – коефициент на вариация

DAS28 – disease activity score

Dcytb – дуоденална цитохромоксидаза b

DMT1 - дивалентен метален транспортер 1

eGFR – изчислена гломерулна филтрация; estimated glomerular filtration rate

ELISA – ензимно-свързан имуносорбентен анализ

IFCC – Международна Федерация по Клинична Химия

(i)sTfr – индекс на трансфериново насищане

LLOQ – low level of quantification, ниска граница на количествено определяне

MPQ – middle point of quantification, средна точка на количествено определяне

TSAT – процентно трансфериново насищане

ULOQ – upper level of quantification, висока граница на количествено определяне

WCF-TOF-MS – weak cation exchange time-of-flight mass-spectrometry

I. Въведение

Микроелементите са химични елементи, които се съдържат в организмите в хилядни части от процента (желязо, мед, цинк, молибден, бром, флуор, йод и др.). Те са необходими за нормалната жизнена дейност. Влизат в състава на ензими, витамини, хормони. Влияят на растежа, размножаването и кръвообразуването. Недостигът или излишъкът им води до нарушения в обмяната на веществата.

Потребността на човек от желязо на 1 kg тегло е: деца — 0,6 mg, възрастни — 0,1 mg и бременни — 0,3 mg желязо на денонощие. Като правило, желязото, което приемаме с храната, е напълно достатъчно, но в някои случаи като (анемия, донорство на кръв) е необходимо да се приемат желязосъдържащи хранителни добавки.

Предозирането с желязо вреди на организма. Неговата способност да отдава и приема електрони означава, че ако е свободно желязо в клетката, то може да катализира превръщането на водороден пероксид в свободни радикали. Свободните радикали могат да причинят увреждане на голямото разнообразие от клетъчни структури, и в крайна сметка убиват клетката. За да се предотврати това, всички форми на живот, които използват желязо свързват железните атоми с протеини. Това позволява на клетките да използват предимствата на желязо, но също така да ограничат неговата възможност за увреждане на организма. Хората и повечето бактерии използват различни варианти за извършване на окислително-редукционни реакции и електрон-транспортни процеси. Те са необходими за окислително фосфорилиране. Този процес е основният източник на енергия за човешките клетки; без него, повечето видове клетки ще умрат.

Както повечето минерални хранителни вещества, по-голямата част от желязото се абсорбира в дванадесетопръстника от ентероцити на лигавицата. Тези клетки имат специални молекули, които им позволяват да придвижват желязото в организма. За да се абсорбира, съдържанието на желязо трябва да бъде като част от протеин (хемов протеин) или във феро Fe^{2+} форма. Фериредуктазен ензим в апикалната част на ентероцита, дуоденална цитохромоксидаза b (Dcytb) редуцира фери Fe^{3+} формата до

феро Fe^{2+} форма. Протеин, наречен дивалентен метален транспортер 1 (DMT1), отговорен за транспорта на всички дивалентни метали в организма, транспортира и желязото през клетъчната мембрана на ентероцита в клетката. Организмът регулира нивата на желязо чрез регулиране на всяка от тези стъпки. Например, клетките произвеждат повече Dcytb, DMT1 и феропортин в отговор на желязо-дефицитна анемия. Скоростта на абсорбция на желязо в човешкия организъм зависи от различни взаимосвързани фактори, включително нивата на общото желязо в депата, степента, активността на еритропоезата, концентрацията на хемоглобина и съдържанието на кислород в кръвта. Организмът усвоява по-малко желязо по време на възпаление. Последните открития показват, че хепсидинът регулира феропортиновата функция и е отговорен за синдрома на анемия при хронична болест.

През последните години е установен пептидът, регулиращ обмяната на желязо в организма. Хепсидинът е 25-аминокиселинен протеин, секретирани от хепатоцитите. Контролът на неговата секреция се осъществява чрез четири механизма – ниво на желязо, активност на еритропоеза, генетични механизми, възпаление. Своята функция хепсидинът осъществява чрез взаимодействие с единствения познат вътреклетъчен експортер на желязото – феропортина на ниво хепатоцит, макрофаг и дуоденален ентероцит.

II. Цел и задачи

Целта на настоящата работа е определяне референтните граници на хепсидин в кръвен серум при репрезентативни групи клинично здрави лица от българска националност и проучване на неговото диагностично значение при различни патологични състояния.

За осъществяване на тази цел бяха набелязани следните **задачи**:

- 1) Валидиране на ELISA метод за количествено определяне на серумен хепсидин.
- 2) Определяне границите на референтната област на изследвания показател в кръвен серум при репрезентативна група клинично здрави лица от двата пола от българска националност.
 - a. Проучване влиянието на пола и възрастта върху концентрацията на изследвания хепсидин в кръвен серум.
 - b. Проучване влиянието на менструалния цикъл при жени върху концентрацията на изследвания хепсидин в кръвен серум.
- 3) Проучване на информативното съдържание на изследвания хепсидин при следните нозологични единици:
 - a. Хронично бъбречно заболяване, стадий V, на хемодиализа;
 - b. Хронично бъбречно заболяване, стадии II до IV, без диализа;
 - c. Ревматоиден артрит;
 - d. β -таласемия майор;
 - e. Желязо-дефицитна анемия.
- 4) Проучване на диагностичното значение на изследвания хепсидин при пациенти с ревматоиден артрит.
- 5) Определяне на диагностичната специфичност и чувствителност на хепсидин чрез построяване на ROC криви.

III. Материал и методи

За изпълнение на поставените задачи са изследвани:

- 180 клинично здрави индивиди;
- 35 пациенти с хронично бъбречно заболяване, стадии II до IV, без диализа;
- 35 пациенти с хронично бъбречно заболяване, стадий V, на диализа;
- 40 пациенти с ревматоиден артрит;
- 15 пациенти с желязо-дефицитна анемия;
- 10 пациенти с β -таласемия майор.

За определяне границите на референтната област на изследвания показател хепдисин в кръвен серум и проучване влиянието на някои фактори (пол, възраст) са изследвани 180 клинично здрави лица от българска националност на възраст от 18 до 76 год., средна възраст 33.1 год., от които 66 мъже и 114 жени. Групата е съставена от здрави индивиди с различни професии – медицински персонал, работници, студенти, служители.

За проучване значението на биологичната вариация като причина за несъответствието на съобщените в литературата референтни стойности на хепсидин са изследвани 180 клинично здрави лица. Разпределението на изследваните лица по пол и възраст е представено на Таблица 1. Изследванията са проведени в периода 2012 - 2014 г.

Таблица 1. Разпределение на изследваните лица по пол и възраст от контролната група

Клинично здрава група	Мъже	Жени
Брой	66	114
Минимална възраст (в год.)	21	18
Максимална възраст (в год.)	76	74
Средна възраст (в год.)	29.9	34.9

С оглед проучване информативното съдържание на изследвания хепсидин при различни нарушения в обмяната на желязото са изследвани общо 135 пациента на възраст от 19 до 88 год., средна възраст 53.9 год., от които 56 мъже и 79 жени, чието разпределение е представено в Таблица 2.

Таблица 2. Разпределение на изследваните болни с различни патологични нарушения в обмяната на желязото по пол и възраст:

Пациенти с ХБЗ (стадии II до IV, без диализа)	Мъже	Жени
Брой	18	17
Минимална възраст (в год.)	49	27
Максимална възраст (в год.)	88	81
Средна възраст (в год.)	67,3	58,3
Пациенти с ХБЗ (стадий V, на хемодиализа)		
Брой	17	18
Минимална възраст (в год.)	28	23
Максимална възраст (в год.)	82	76
Средна възраст (в год.)	64,5	54,3
Пациенти с ЖДА		
Брой	4	11
Минимална възраст (в год.)	19	24
Максимална възраст (в год.)	52	63
Средна възраст (в год.)	25,6	20,7
Пациенти с β-таласемия майор		
Брой	7	3
Минимална възраст (в год.)	23	25
Максимална възраст (в год.)	36	40
Средна възраст (в год.)	30	30,7
Пациенти с ревматоиден артрит		
Брой	10	30
Минимална възраст (в год.)	40	23
Максимална възраст (в год.)	61	66
Средна възраст (в год.)	49,7	53,2

Клиничната диагноза на изследваните болни е поставена в Клиника по Нефрология към УМБАЛ „Александровска”, Клиничен център по Диализа към УМБАЛ „Александровска”, Клиника по Хематология към УМБАЛ „Александровска”, Клиника по Инвазивна кардиология към УМБАЛ „Александровска”, Клиника по Ревматология

към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“. При болните на хемодиализа кръв за изследване е вземана преди началото на процедурата по диализа.

За оценка на здравословното състояние на всички индивиди, включени в проучването се използват предварително подбрани критерии:

За изключване/диагностика на бъбречно заболяване – определяне на серумен креатинин и изчисляване на eGFR с помощта на CKD-EPI & MDRD STUDY EQUATION CALCULATOR – (включващо мерни единици по SI система);

За изключване/определяне на възпалителен процес – определяне на CRP; за оценка активността на възпалителния процес при пациенти с ревматоиден артрит – определяне на DAS28 (въз основа на серумно ниво на CRP, брой и вид оточни и болезнени стави) [disease activity score калкулатор за ревматоиден артрит по Radboud Univerity Nijmegen, Холандия);

За изключване/диагностика на чернодробно заболяване – определяне на чернодробните ензими АСАТ и АЛАТ;

За изключване/определяне наличие на диабет – определяне нивото на серумна глюкоза, еднократно, сутрин, на гладно;

За изключване/диагностициране на нарушена хомеостаза на желязото – определяне на желязо и ТЖСК, феритин, трансферин, разтворими трансферинови рецептори;

При определяне на референтните граници на хепсидин освен общо препоръчаните критерии за изключване като бъбречна недостатъчност, хроничен възпалителен процес, чернодробна недостатъчност, желязо-дефицитна анемия, хемоглобинопатия, включихме и критерии относно експозицията с желязни препарати – хранителна, битова, професионална.

Изследвана е пълна кръвна картина с показатели: ретикулоцити – абсолютен брой и процентно съдържание; ниво на хемоглобин в ретикулоцити; хемоглобин; общ брой червени кръвни клетки; хематокрит.

Всеки индивид, включен в проучването подписваше информирано съгласие, съгласно декларацията от Хелзинки (Директива 2001/20/ЕО).

Клинико-химичните показатели бяха определени с помощта на хематологичен анализатор ADVIA 2120 (Siemens Healthcare), биохимичен анализатор Cobas Integra 400 на Roche Diagnostics и имунологичен анализатор Elecsys 2010 (Roche Diagnostics). Серумно желязо и ТЖСК бяха определени с помощта на пламъков атомно-абсорбционен спектрофотометър Analyst 300 (Perkin-Elmer). Разтворимите трансферинови рецептори бяха определени с помощта на нефелометър BN ProSpec (Siemens Healthcare).

Кръв за изследване бе взета сутрин, между 08,00 и 09,00 часа на гладно. За целта се използват игли и вакутейнери за еднократна употреба (Saarstedt, Becton Dickinson):

- за определяне на пълна кръвна картина с допълнителни показатели ретикулоцити (абсолютен брой и процентно съдържание; както и хемоглобиново съдържание в ретикулоцити) - 3 ml с антикоагулант EDTA-K₂
- за определяне на желязо и ТЖСК - 7 ml с антикоагулант Li-Heparin
- за определяне на клинично-химични показатели (CRP, трансферин, феритин, разтворими трансферинови рецептори, АСАТ, АЛАТ, глюкоза, креатинин) - 7 ml с активатор на съсирването за отделяне на серум.

Последователността на вземане на кръвта бе както следва: първо за изработване на клинично-химичните показатели в серума, след това за количествено определяне на желязо и ТЖСК; на края за хематологичните показатели. Серумът бе отделен до 2 часа след венепункцията. Всички лабораторни и клинично-химични показатели с изключение на хепсидина бяха изследвани същия ден. Серумът за определяне на хепсидин бе отделен в две епруветки (тип „Епендорф“) в количество (приблизително) 500 ml, замразен и съхранен на -40°C до момента на изследването. Поддържането на постоянна

температура във фризера бе проследено и документирано чрез термометър LogTag, предоставящ съответната крива на температурния режим.

1. За определяне на **клинико-химични показатели в серум** – глюкоза, чернодробни ензими (АСАТ и АЛАТ), креатинин бе използвана венозна кръв, взета във вакуети с активатор на съсирването и сепарационен гел. След 40 минутен престой на стайна температура (20°C), вакуетите бяха центрофугирани на 4000 оборота/15 минути 250 µl от отделения серум бе прехвърлен във вторична епруветка тип „Епендорф” за определяне на серумни концентрации на глюкоза, АСАТ, АЛАТ, креатинин, СРР, трансферин, феритин, разтворими трансферинови рецептори. Останалото количество серум бе замразявано за определяне на серумни ниван на хепсидин.

За определяне на **креатинин в урина** бе използвана средна порция, сутрешна урина, отделена в химически чист съд. Урината се разрежда с дестилирана вода в съотношение 1:10 и се прехвърля във вторична епруветка тип „Епендорф”. Останалото количество урина се замразява за определяне на хепсидин.

За определяне на серумно ниво на **желязо и ТЖСК** се използва кръв, взета във вакуета с Li-Heparin. След 40 минутен престой на стайна температура (20°C), вакуетите бяха центрофугирани на 4000 оборота/15 минути 500 µl от получената плазма се използват за определяне на желязо. За определянето на ТЖСК се използват 500 µl от плазмата.

1.1. Определяне на глюкоза

Определянето на глюкоза се извършва по ензимен, референтен метод с хексокиназа.

1.2. Определяне на креатинин

Определянето на креатинин се извършва по метода на Jaffe; фотометричен, колориметричен метод с кинетичен завършек. Креатининът формира в алкален разтвор

червено-оранжев комплекс с пикринова киселина. Преди отчитането на креатинин в урина, биологичният материал се разрежда с дестилирана вода в съотношение 1:10.

1.3. Определяне на аспартат аминотрансфераза

Определянето на чернодробен ензим аспартат аминотрансфераза се извършва чрез кинетичен метод на принципа на течен UV тест. Кинетичният метод за определяне на активност на аспартат аминотрансфераза е препоръчан от Експертния панел на IFCC (Международна Федерация по Клинична химия); без пиридоксалфосфатна активация.

1.4. Определяне на аланинаминотрансфераза

Определянето на чернодробен ензим аланинаминотрансфераза се извършва чрез кинетичен метод на принципа на течен UV тест. Кинетичният метод за определяне на активност на аспартат аминотрансфераза е препоръчан от Експертния панел на IFCC (Международна Федерация по Клинична химия); без пиридоксалфосфатна активация.

1.5. Определяне на трансферин

Определянето на трансферин се извършва чрез имунотурбидиметричен метод. Човешкият трансферин аглутинира със специфичен антисерум.

1.6. Определяне на CRP

Определянето на С-реактивен протеин (CRP) се извършва чрез имунотурбидиметричен метод. Човешкият CRP аглутинира с латексови частици, натоварени с моноклонални анти-CRP антитела.

1.7. Определяне на феритин

Определянето на феритин се извършва чрез електро-хемилюминесцентен метод на сандвичев принцип.

1.8. Определяне на серумно желязо

Определянето на серумно желязо се извършва с пламъков атомно-абсорбционен спектрофотометър Analyst 300 Perkin-Elmer.

1.9. Определяне на ТЖСК

Определянето на тотален желязо-свързващ капацитет се извършва с пламъков атомно-абсорбционен спектрофотометър Analyst 300 Perkin-Elmer.

1.10. Изчисляване на процентно трансфериново насищане

За изчисляване на процентно трансфериново насищане се използват определените нива на серумно желязо, тотален желязо-свързващ капацитет и ниво на трансферин в серума. Изчислението на TSAT чрез серумно желязо и тотален желязо-свързващ капацитет се извършва по формулата: $TSAT \% = (Fe/TЖСК) \times 100$

1.11. Изчисляване на индекс на разтворими трансферинови рецептори (i)sTfr

Изчисляването на индекса на разтворими трансферинови рецептори към феритин се извърши с помощта на формулата: $(i)sTfr [mg/ng] = sTfr/Ferritin$

1.12. Изчисляване на индекс хепсидин / феритин

Изчисляването на индекс хепсидин към феритин се извърши с помощта на формулата: $Hepcidin/Ferritin [\mu g/ng] = \text{хепсидин/феритин}$

1.13. Изчисляване на индекс процентно трансфериново насищане / хепсидин

Изчисляването на индекс процентно трансфериново насищане към хепсидин се извърши с помощта на формулата: $TSAT/Hepcidin [\%/\mu g] = \text{процентно трансфериново насищане/хепсидин}$

1.14. Определяне на разтворими трансферинови рецептори

Определянето на разтворими трансферинови рецептори се извършва чрез нефелометричен метод. Полиестерни частици, натоварени с моноклонални антитела срещу човешки разтворими трансферинови рецептори, образуват комплекс при контакт със серум, с определяемото количество. Образуваните комплекси разсейват преминаващата светлина през реакционната смес. Интензитетът на разсейване на светлината е пропорционален на количеството разтворими трансферинови рецептори.

Всички проби са изследвани след провеждане на вътрелaborаторен качествен контрол.

2. Методи за определяне на хематологични показатели

За определяне на хематологичните показатели се използва кръв взета във вакутейнер с антикоагулант EDTA-K₂. Вакуетите се оставят на стайна температура за 20 минути преди подаване на анализатора. Определянето на хематологичните показатели – общ брой червени кръвни клетки, хемоглобин, хематокрит, определяне на ретикулоцити и хемоглобиново съдържание в ретикулоцити се извърши с помощта на хематологичен анализатор ADVIA 2120 на Siemens.

2.1. Принцип на определяне на хемоглобин

Хематологичната система ADVIA 2120 използва безцианиден метод за определяне на хемоглобин. Пробата и ADVIA 2120 HGB реактивът се миксират в реакционната камера за хемоглобин (колориметър). Химичните реакции за хемоглобин се състоят от две стъпки: след предварително лизиране на еритроцити и превръщането на хемоглобин в монохидрокси-ферипорфирин, се извършва фотометрично определяне на интензивността на цветния комплекс.

2.2. Принцип на определяне на еритроцити

Еритроцитите се изброяват изоволуметрично чрез отчитане на разсеяната светлина под малък ъгъл (2° - 3°) и под голям ъгъл (5° - 15°). Използвайки теорията на Мие за разсейване на светлината за хомогенни сфери, измерването на разсейването на светлината под малък ъгъл се превръща в клетъчен обем, а измерването на разсейването на светлината под голям ъгъл се превръща във вътреклетъчна концентрация на хемоглобин.

2.3. Принцип на определяне на ретикулоцити

С помощта на цитохимични реакции еритроцитите се оцветяват диференцирано на базата на тяхното съдържание на рибонуклеинова киселина.

Клетъчна суспензия с постоянен обем от реакционната камера за ретикулоцити преминава през поточната клетка, където се измерват разсейване на светлината под малък ъгъл (2° до 3°) и разсейване на светлината под голям ъгъл (5° до 15°) и абсорбцията на всяка регистрирана клетка.

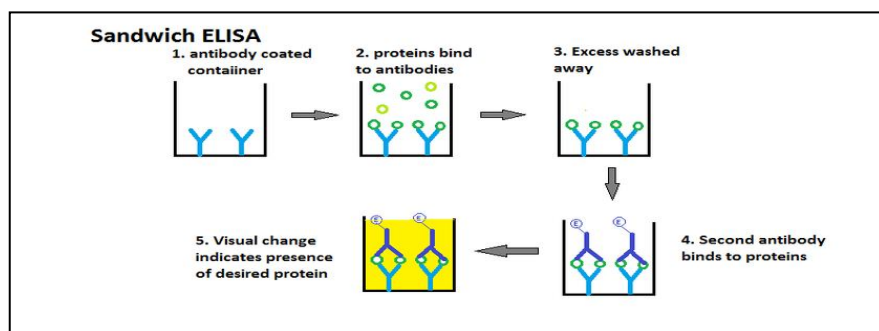
3. Определяне на хепсидин

Принципът на имунологичния метод ELISA се основава на реакцията антиген – антитяло чрез белязани антитела. Обикновено се белязва не самото антитяло, което реагира с антигена и се нарича първо антитяло, а специално получено анти-имуноглобулиново антитяло, което реагира с първото антитяло и се нарича второ антитяло. Така методът сумарно включва най-малко три етапа: (1) реакция на първото антитяло с антигена, (2) реакция на второто антитяло с първото антитяло и (3) проявяване на белега на второто антитяло.

ELISA се провежда в 96 ямкови плаки с плоски дъна. Плаките са от пластмаса, върху която белтъците са склонни да се адсорбират. Първо в ямките се налива разтвор на антигена и се оставя за известно време, за да може част от него да се залепи върху дъната и стените на ямките. След това остатъкът от антигена се отсмуква. Ямките за

известно време се запълват с разтвор на индиферентен белтък, най-често говежди серумен албумин. Неговата роля е да покрие (блокира) пластмасата, за да не може никой от следващите реагенти да се адсорбира върху нея неспецифично.

Ямките отново се отсмукват и в тях се нанася разтворът на първото антитяло. Дава му се време да реагира с антигена, след което се отсмуква и ямките се промиват. Слага се второто антитяло, отново се оставя да престои и се промива. Добавя се субстрат за цветна реакция, катализирана от ензима, с който е белязано второто антитяло. За разлика от имуноблота тук не е нужно цветният продукт да бъде неразтворим – ямката със същия успех може да вмести и разтворим продукт.



Фигура 1. Схема на конкурентен ELISA метод за количествено определяне на хепсидин

Предварителната подготовка на реактивите и пробите включва следните етапи:

Китът за определяне на хепсидин и всички реактиви се оставят на стайна температура (18-25°C) преди употреба.

Стандартът с обявена стойност 16 µg/l (1 ml), определена с метод от много висок метрологичен клас – WCE-TOF MS (Laboratory of Genetic, Endocrine and Metabolic Diseases; Dept. of Labor. Medicine, Radbound University Medical Centre; Nijmegen, Холандия) се разтваря с 1,0 ml дилуент стандарт. Оставя се за 10 минути на стайна температура, като внимателно се разклаща. Концентрацията на стандарта е 16 µg/l. От

него чрез падащо разреждане се приготвят необходимите концентрационни стойности, подбрани в клинично значимите области.

Реагентен дилуент А и реагентен дилуент В (всеки по 6 ml) се разтварят с дестилирана вода за получаване на количество от по 12 ml.

Детекшън реагент А и детекшън реагент В (всеки по 120 µl) се разреждат със съответните реагентни дилуенти в съотношение 1:100.

20 ml от разтворът за промиване се смесват с 580 ml дейонизирана или дестилирана вода с цел приготвяне на общо 600 ml разтвор.

Серумните проби за количествено определяне на хепсидин се размразяват, вортексират и центрофугират на 5000 оборота/10 минути.

Пробите се разреждат предварително с PBS буфер с рН 7,4 в съотношение 1:50 или повече, в зависимост от очакваните стойности на хепсидин в тях.

Протколът за количествено определяне на серумен хепсидин включва следните стъпки:

Стандартите, пробите и бланката се накапват в количество 100 µl. Плаката се покрива с фолио. Инкубира се 2 часа на 37°C.

Отсмуква се излишната течност.

Към всяка ямка се добавят 100 µl детекшън реагент А. Плаката се покрива с фолио. Инкубира се 1 час на 37°C.

Отсмуква се излишната течност.

Ямките се промиват трикратно с 350 µl разтвор за промиване.

Отсмуква се излишната течност.

Към всяка ямка се добавят 100 µl детекшън реагент В. Плаката се покрива с фолио. Инкубира се 30 минути на 37°C.

Отсмуква се излишната течност.

Ямките се промиват петкратно с 350 µl разтвор за промиване.

Отсмуква се излишната течност.

Към всяка ямка се добавят 90 µl субстратен разтвор. Плаката се покрива с фолио. Инкубира се на тъмно 15 - 25 минути на 37°C. Настъпва промяна на цвета на съдържимото в ямките в синьо.

Към всяка ямка се добавят 50 µl стоп разтвор. Цветът на съдържимото в ямките се променя в жълто.

Отстранява се излишното количество течност.

Отчита се непосредствено на ELISA рийдър на 450 nm.

Процесът на валидиране на ELISA метод за количествено определяне на серумен хепсидин включва следните етапи:

Определяне на аналитичния обхват чрез построяване на калибрационна крива.

Определяне на граница на откриване на метода (Limit of Detection).

Верифициране на точността на получената крива чрез долна и горна граници и средна точка на количествено определяне (LLOQ, MPQ, ULOQ).

Определяне на достоверността по метода recovery (добавено/намерено).

Невъзпроизводимост на метода в серия.

Невъзпроизводимост на метода между различни аналитични серии.

Определяне стабилността на изследвания материал.

4. Методи на статистически анализ

Статистически методи използвани при определяне границите на референтната област

За определяне границите на референтната област на хепсидин в кръвен серум са използвани статистическите методи, препоръчвани от Експертната група по теория на референтните стойности към Международната федерация по клинична химия (IFCC). Алгоритъмът на препоръчвания от Експертната група по теория на референтните стойности към Международната федерация по клинична химия и използван от нас метод за определяне на референтни граници лежи в основата на разработената от

Solberg програма REFVAL за статистическа обработка на събраните референтни стойности и определяне границите на референтната област, която е използвана от нас в оригиналния ѝ вид, съобразно препоръките на IFCC/CLSI документ C28-A3 от март 2008 г.

За проверка вида на разпределението се използва построяване на хистограми, тестовете на Колмогоров-Смирнов, Anderson-Darling, Cramer von Mises и коефициентите на асиметри и ексцес.

За откриване и отстраняване на рязко отклоняващи се стойности се използва визуална оценка на хистограмата както и съответни математически тестове.

Изборът на статистически метод за определяне на референтни граници се определя от вида на разпределението. При Гаусово разпределение се прилага направо параметричен метод. При негаусово разпределение се извършва трансформация на данните чрез използване на експоненциална и модулна функция за корекция съответно на асиметрията и ексцеса. При нормализиране на разпределението след трансформацията, доказано с теста на Anderson-Darling и коефициентите на асиметрия и ексцес се прилага параметричен метод, а в противен случай – непараметричен метод.

Във всички случаи се определя 0,95 доверителен интервал за всяка от двете референтни граници.

Използвани статистически методи: Colmogorov-Smirnoff (D_{max}); Коефициент на асиметрия (skewness, G_s); Коефициент на ексцес (kurtosis, G_k); Anderson-Darling (A^2); Cramer von Mises (W^2).

За оценка влиянието на пола върху серумната концентрация на хепсидина е използван t-тест на Student (за проверка на хипотези за различие между две независими извадки), а на възрастта – регресионен анализ.

Дескриптивен анализ – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разделени по групи на изследване.

Графичен анализ – за визуализация на получените резултати.

Зависимостта между някои явления е изследвана с корелационен анализ (за определяне на линейна зависимост между два количествени признака).

Статистически методи, използвани при анализа на клиничния материал

За статистическата обработка на получените резултати от проучванията при пациенти с хронично бъбречно заболяване (стадии II до V), с ревматоиден артрит, с желязо-дефицитна анемия и с β -таласемия майор са използвани вариационен анализ и t-тест на Student.

Статистически методи приложени при оценка на клиничната и диагностична значимост на хепсидина

Данните бяха въведени и обработени със статистическия пакет SPSS 13.0. За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза бе избрано $p < 0,05$.

Бяха приложени следните методи:

ROC крива – за определяне праговата стойност на количествените признаци.

За оценяване **валидността** на скриниращия (диагностициращия) тест се използват следните критерии: чувствителност; специфичност; положителна предсказваща стойност; отрицателна предсказваща стойност и точност (% на верните отговори).

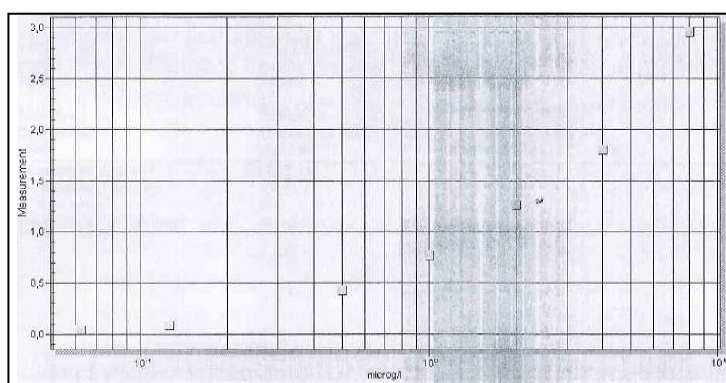
IV. Резултати

1. Валидиране на имунологичен ELISA метод за количествено определяне на хепсидин в кръвен серум

1.1. Определяне на аналитичния обхват на метода чрез построяване на калибрационна крива

Първият етап от процеса на валидиране на ELISA метод за определяне на серумни нива на хепсидин е построяването на калибрационна крива. За тази цел се използва стандарт, който представлява рекомбинантен човешки хепсидин с обявена стойност 16 $\mu\text{g/l}$ (1 ml), определена с метод от много висок метрологичен клас – WCE-TOF MS (Laboratory of Genetic, Endocrine and Metabolic Diseases; Dept. of Labor. Medicine, Radboud University Medical Centre; Nijmegen, Холандия). От този стандарт е направено падащо разреждане със стандарт дилуент според инструкциите на производителя с цел постигане на област на клинично значими стойности – референтна и патологични: (8 $\mu\text{g/l}$, 4 $\mu\text{g/l}$, 2 $\mu\text{g/l}$, 1 $\mu\text{g/l}$, 0.5 $\mu\text{g/l}$, 0.250 $\mu\text{g/l}$, 0.125 $\mu\text{g/l}$, 0.0625 $\mu\text{g/l}$).

Всеки един от стандартите е определен двукратно. Стойностите са коригирани с двукратно определената сляпа проба за реактиви (стандарт дилуент). Построй се калибрационна крива (Фиг. 2).



Фигура 2. Калибрационна крива на ELISA метод за количествено определяне на хепсидин

Калибрационната крива е четири параметрична; по оста X – логаритмична, по оста Y- линейна.

1.2. Определяне на граница на откриване на метода (Limit of Detection)

След построяването на калибрационна крива се премина към десетократно определяне на сляпата проба, която предстваляваше дилуент за стандарт. Получените резултати бяха необходими за определяне на ниска граница на откриваемост (Limit of Detection), а именно 0.022 µg/l, което осигури на метода много висока диагностична чувствителност.

1.3. Верифициране точността на получената крива чрез определяне на долна горна граници и средна точка на количествено определяне (LLOQ, MPQ, ULOQ) на метода

В следващ етап се премина към определяне на LLOQ (Low level Of Quantification), MPQ (Middle Point Of Quantification) и ULOQ (Upper Level Of Quantification). За тази цел бяха използвани стандарти със стойности 0.0625 µg/l за LLOQ, 0.500 µg/l за MLPQ, 2 µg/l за ULOQ, определени петкратно. Получените резултати са представени в Таблица 3.

Таблица 3. Определяне на LLOQ, MPQ, ULOQ

(n=5)	LLOQ	MPQ	ULOQ
CV %	7,810	4,790	3,799
bias %	9,952	2,14	0,16

1.4. Определяне достоверността на метода

Достоверността на метода е определена с помощта на метода recovery (добавено/намерено). Доказа се област на recovery от 96.5% до 97.6%. Получените резултати са представени в Таблица 4.

Таблица 4. Recovery, определено чрез двукратно измерване на две проби на пациенти с добавяне на стандарт хепсидин със стойност 8 µg/l

Показател	Проба 1	Проба 2
Базова стойност	8.15 µg/l	4.51 µg/l
Добавен	4.00 µg/l	4.00 µg/l
Очаквана стойност	12.15 µg/l	8.51 µg/l
Намерена стойност	12.45 µg/l	8.82 µg/l
Recovery	97.6 %	96.5 %

1.5. Невъзпроизводимост на метода в серия

Повтаряемостта (repeatability) в серия е определена с помощта на петкратно отчитане на случайно подбрани проби на три пациенти с известно ниво на хепсидин. Получените стойности са представени в Таблица 5.

Таблица 5. Невъзпроизводимост на метода в серия, получена от три проби на пациенти

X_0	проба 1 [0,212 µg/l]	проба 2 [1,089 µg/l]	проба 3 [4,148 µg/l]
X_i	0,21	1,08	4,15
SD	0,01	0,01	0,02
CV %	4,62	1,37	0,46

1.6. Невъзпроизводимост на метода между различни аналитични серии

Невъзпроизводимостта от ден в ден е определена чрез 5кратно отчитане на случайно подбрани проби на три пациенти с известно ниво на хепсидин, предварително разпределени в пет епруветки тип „Епендорф“. Всяка проба бе замразена на минус 40 °C. При всяка серия от проби на пациенти бе размразявана и анализирана по една

епруветка тип „Епендорф” с избраният серум. Получените резултати са представени в Таблица 6.

Таблица 6. Невъзпроизводимост на метода между различни аналитични серии, получена от три проби на пациенти

X_0	проба 1 [0,212 $\mu\text{g/l}$]	проба 2 [1,089 $\mu\text{g/l}$]	проба 3 [4,148 $\mu\text{g/l}$]
X_i	0,21	1,1	4,13
SD	0,01	0,03	0,04
CV %	4,02	2,50	0,87

1.7. Определяне стабилността на изследвания материал

Стабилността на изследвания материал е установена чрез определяне концентрацията на хепсидин на две проби на пациенти с известна стойност след петкратно замразяване и размразяване на серума. Получените резултати са представени в Таблица 7.

Таблица 7. Стабилност на изследвания материал

(n=5)	Проба 1 ($\mu\text{g/l}$)	Проба 2 ($\mu\text{g/l}$)
mean преди замразяване	0.25	4.26
mean след размразяване	0.24	4.24
SD	0.01	0.003
CV%	2.4	0.1
bias%	-2.4	-0.4

1.8. Проучване на зависимостта между серумно ниво на хепсидин и времето за вземане на биологичен материал за изследване

Проучихме зависимостта между серумното ниво на хепсидин и времето за вземане на биологичен материал за изследване по следната схема. Кръв за

количествено определяне на хепсидин бе взета на 60 здрави доброволца от двата пола на средна възраст $31,0 \pm 9,8$ год., в три различни периода:

- ✓ Първа група – между 07,30 и 08,30 ч.
- ✓ Втора група – между 12,00 и 13,00 ч.
- ✓ Трета група – между 16,00 и 17,00 ч.

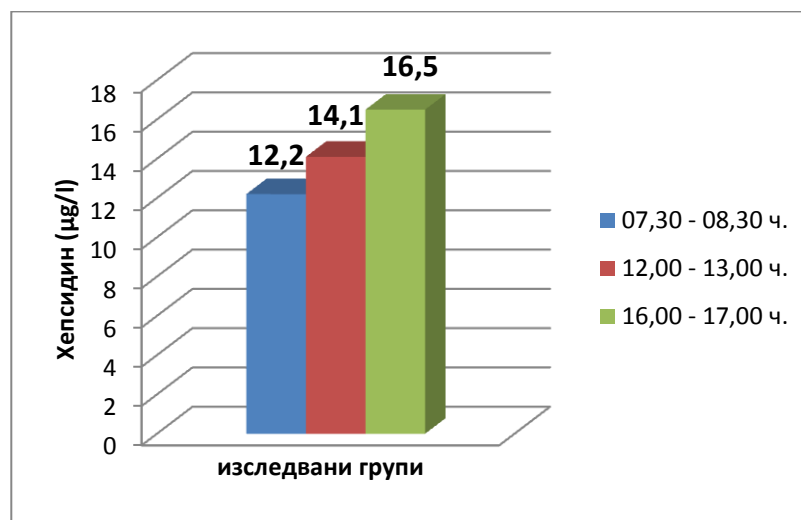
Демографските показатели на изследваните доброволци са представени на Таблица 8. Получените резултати от количествено определяне на серумен хепсидин са представени в Таблица 9 и Фигура 3.

Таблица 8. Разпределение по възраст на изследваните доброволци от трите групи.

Час на вземане на кръв	07,30 – 08,30 ч.	12,00 – 13,00 ч.	16,00 – 17,00 ч.
Брой (n=)	20	20	20
Средна възраст (в год.)	36,0	28,3	28,8
SD	9,6	9,8	9,9

Таблица 9. Серумни концентрации на хепсидин при трите групи доброволци

Час на вземане на кръв		07,30 – 08,30 ч.	12,00 – 13,00 ч.	16,00 – 17,00 ч.
Хепсидин (µg/l)	Средна ст-ст	12,2	14,1	16,5
	MIN	5,5	7,1	9,9
	MAX	23,6	27,2	29,6



Фигура 3. Серумни концентрации на хепсидин при трите групи доброволци

Установихме статистически значима разлика в серумните нива на хепсидин между първа (07,30 – 08,30 ч.) и втора (12,00 – 13,00 ч.) групи [$0.7 < r < 1.0$; $P < 0.5$], както и между първа (07,30 – 08,30 ч.) и трета (16,00 – 17,00 ч.) и втора (12,00 – 13,00 ч.) и трета (16,00 – 17,00 ч.) групи [$0.7 < r < 1.0$; $P < 0.05$].

2. Определяне на граници на референтна област на хепсидин за българската популация

А) Статистическа обработка

Използвахме програмата REFVAL за статистическа обработка на събраните данни и определяне границите на референтната област, съобразно препоръките на IFCC/CLSI документ C28-A3 от март 2008 г.

Резултатите от статистическият анализ на серум хепсидин при клинично здрава група изследвани лица са представени в Таблица 10.

Таблица 10. Резултати от статистически анализ на серум хепсидин при клинично здрава група изследвани лица от българската популация

Статистически тест*	Стойност	Значимост
Colmogorov-Smirnoff (Dmax)	0.140	<0.001
Коефициент на асиметрия (skewness, Gs)	1.269	0.001
Коефициент на ексцес (kurtosis, Gk)	1.120	0.07
Anderson-Darling (A ²)	2.284	<0.001
Cramer von Mises (W ²)	0.375	<0.001

*-посочена е значимостта на статистически критерии при доверителна вероятност 1-P≥0.95

Б) Параметрична оценка

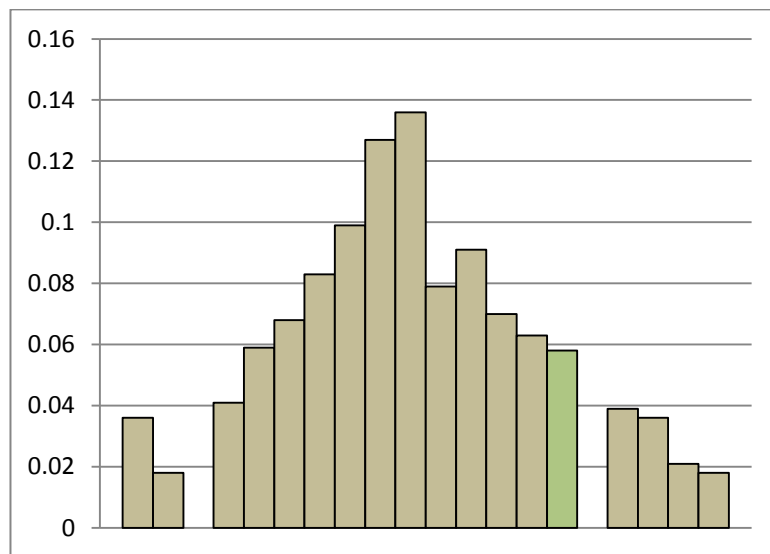
Таблица 11. Параметрична оценка на полученият референтен интервал за хепсидин за общата група клинично здрави мъже и жени; n=180*

95% референтен интервал

3.052 µg/l - 37.750 µg/l

В) Разпределение на данните

Разпределението на получените данни за серумен хепсидин при контролна група клинично здрави лица от българската популация е представено на Фигура 4.

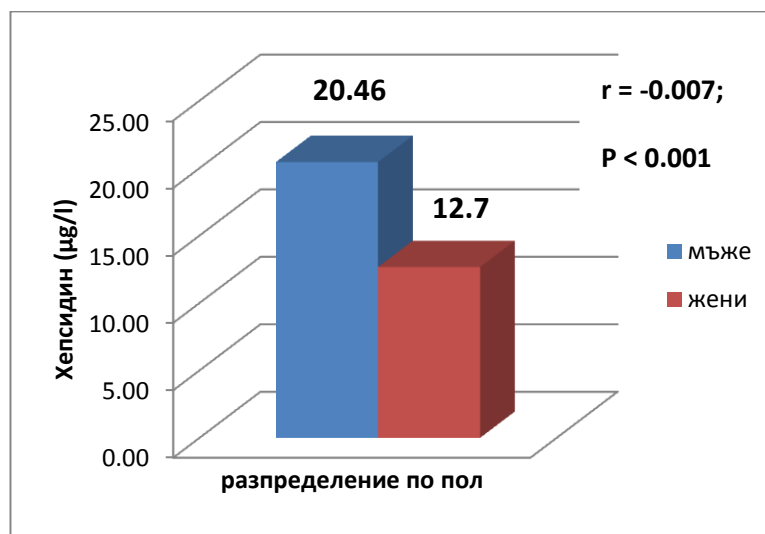


Фигура 4. Разпределение на получените данни за серумен хепсидин при контролна група клинично здрави лица от българската популация

Установи се Гаусово разпределение на данните.

Г) Определяне на референтни стойности на хепсидин с имуносорбентен ELISA метод по пол за българската популация

Получените резултати от серумен хепсидин по пол при клинично здрави лица от Българската популация на възраст от 18 до 76 години е представено на Фигура 5.



Фигура 5. Разпределение на резултатите от определяне на серумен хепсидин по пол при клинично здрави лица от българската популация на възраст от 18 до 76 години

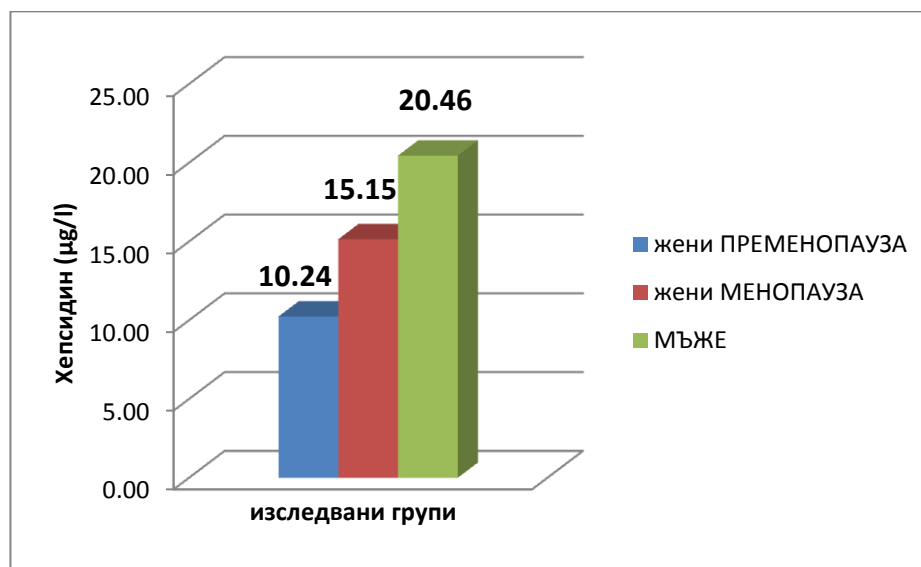
Установи се статистически значима разлика между двата пола ($P < 0.001$).

Таблица 12 представя концентрацията на серумен хепсидин при мъже и жени от контролната група.

Таблица 12. Концентрация на серумен хепсидин

Мъже (n=66)	Жени (n=114)
$20.5 \pm 5.2 \mu\text{g/l}$	$12.7 \pm 5.2 \mu\text{g/l}$

Установи се много ниска отрицателна корелация между жени в пременопауза и мъже. Определи се статистически значима разлика между жени в пременопауза и менопауза; както и при всяка една група спрямо мъжете. Получените резултати са представени на Фигура 6.



Фигура 6. Резултати от определяне на серумен хепсидин в зависимост от пола и менструалния цикъл при жените

Серумни нива на хепсидин при жени в пременопауза $10,2 \pm 2,71 \mu\text{g/l}$; при жени в менопауза $15,2 \pm 5,51 \mu\text{g/l}$; при мъже $20,5 \pm 5,2 \mu\text{g/l}$. Корелационните зависимости между отделните групи са:

- пременопауза/менопауза $r = 0,167$, $P < 0,001$;
- пременопауза/мъже $r = -0,187$; $P < 0,001$;
- менопауза/мъже $r = 0,075$, $P < 0,005$.

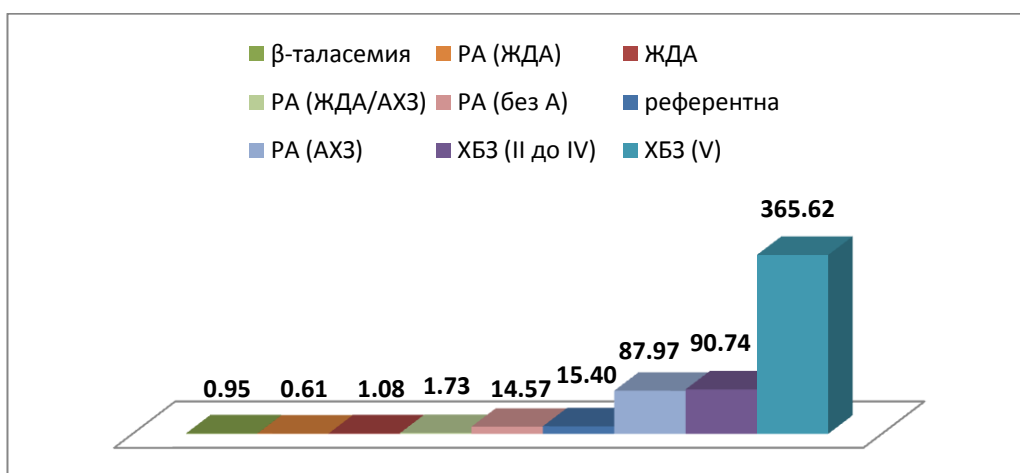
3. Определяне на серумната концентрация на хепсидин при пациенти с различни заболявания

Серумните нива на хепсидин при пациенти с анемия при отделните изследвани заболявания са статистически значимо променени спрямо тези при клинично здрави лица от българската популация. Промените в серумното ниво на хепсидин са показани на Таблица 13 и Фигура 7.

Таблица 13. Сравнителна оценка на серумната концентрация на хепсидин при здрави доброволци, пациенти с ХБЗ (стадии II до IV, без диализа), пациенти с ХБЗ (стадий V, на диализа), пациенти с ревматоиден артрит (РА), пациенти с ЖДА и пациенти с β -таласемия майор

Група	Клинично здрави	ХБЗ, стадии II до IV	ХБЗ, стадий V	РА	ЖДА	β -таласемия майор
n	180	35	35	40	15	10
\bar{X}	15,4	90,7	365,6	27,8	1,08	0,95
min	3,05	37,8	162,3	0,09	0,45	0,65
max	37,75	349,2	770,2	99,6	2,1	1,23

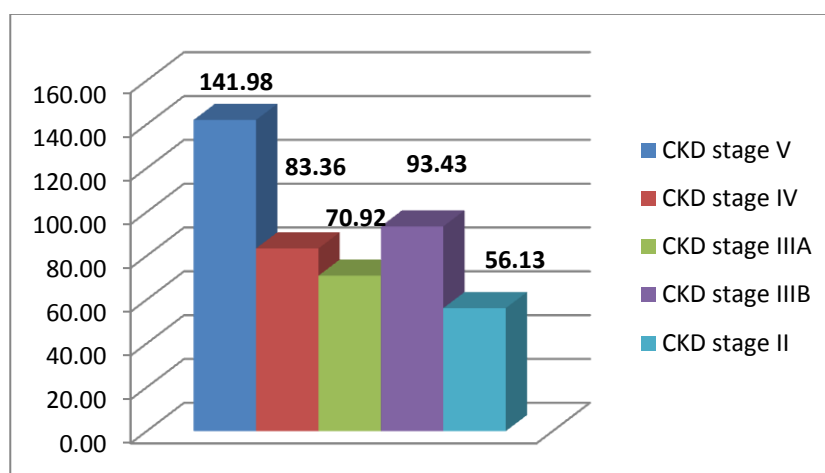
Серумното ниво на хепсидин е статистически значимо повишено при пациенти с анемия при хронично възпаление (ХБЗ стадии II до V, ревматоиден артрит; $p < 0,001$) и понижено при ЖДА и β -таласемия майор ($p < 0,001$).



Фигура 7. Схематично представяне на средните серумни хепсидинови концентрации при здрави доброволци, пациенти с ХБЗ (стадии II до IV, без диализа), пациенти с ХБЗ (стадий V, на диализа), пациенти с ревматоиден артрит, пациенти с ЖДА и пациенти с β -таласемия майор.

3.1. Серумен хепсидин при пациенти с хронично бъбречно заболяване

Установихме разлика в серумните нива на хепсидин между отделните стадии на ХБЗ. Получените стойности са: а) за При стадий на ХБЗ (eGFR 61 – 90) – 56.13 $\mu\text{g/l}$; б) за IIIA стадий на ХБЗ (eGFR 46 – 60) – 70.92 $\mu\text{g/l}$; в) за IIIB стадий на ХБЗ (eGFR 31 – 45) – 93.43 $\mu\text{g/l}$; г) за IV стадий на ХБЗ (eGFR 16 – 30) – 83.36 $\mu\text{g/l}$; е) за V стадий на ХБЗ (eGFR < 15, без хемодиализа) – 141.98 $\mu\text{g/l}$. Резултатите са представени на Фигура 8.



Фигура 8. Серумни нива на хепсидин при отделните групи пациенти с ХБЗ

Установихме корелация между серумен хепсидин и отделните стадии на ХБЗ. Резултатите са представени в Таблица 14.

Таблица 14. Корелация на серумен хепсидин между отделните стадии на ХБЗ

корелация	значимост	стадии
0,517184	0,175095	V/IV
0,948621	0,276692	IV/IIIA
0,854534	0,097752	V/II
-0,55286	0,448274	IIIA/IIIB
-0,67793	0,307601	IIIA/II

Установихме значителна корелация между серумните нива на хепсидин при пациенти от II и V стадий на ХБЗ ($p < 0.1$). Отрицателна корелация на хепсидин бе установена между стадии IIIA и IIIB; както и II и IIIA на ХБЗ.

3.2. Серумен хепсидин при пациенти с ревматоиден артрит

Пациентите с ревматоиден артрит, включени в подготовката на настоящия дисертационен труд бяха разделени на четири групи с помощта на следните условия:

1. Класифицирахме пациентите с ревматоиден артрит и желязо-дефицитна анемия при липса на активно възпаление (определено чрез ниво на CRP < 10 mg/L) и поне едно от следните условия: 1) процентно насищане на трансферин < 20% и ниво на феритин < 30 ng/mL; 2) индекс на sTfR > 1 mg/ng.

2. Класифицирахме пациентите с ревматоиден артрит и анемия на хронично заболяване при наличие на активно възпаление (определено чрез ниво на CRP > 10 mg/L) и поне едно от следните условия: 1) процентно насищане на трансферин < 20% и феритин > 100 ng/mL; 2) индекс на sTfR < 1 mg/ng и феритин > 30 ng/mL.

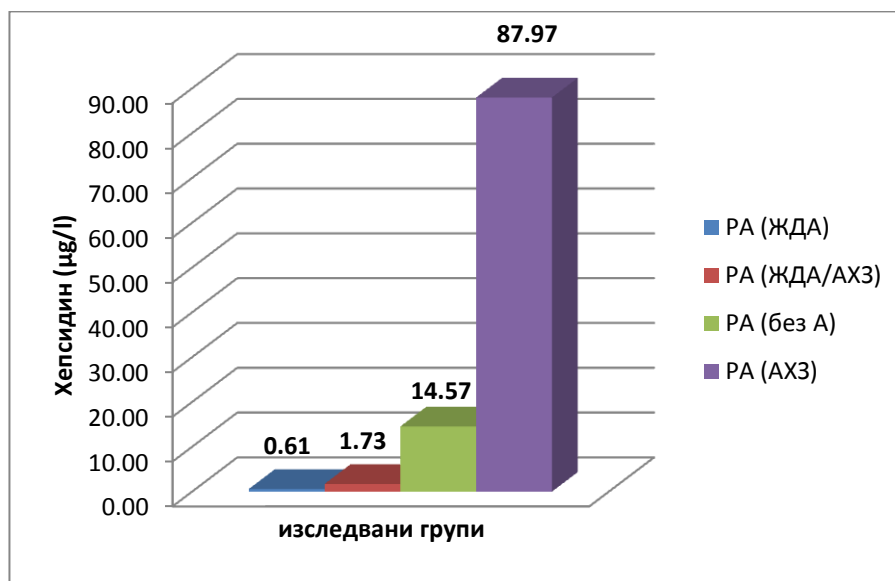
3. Класифицирахме пациентите с ревматоиден артрит и комбинация от желязо-дефицитна анемия и анемия на хронично заболяване при наличие на активно възпаление (определено чрез ниво на CRP > 10 mg/L) и поне едно от следните условия: 1) процентно насищане на трансферин < 20% и ниво на феритин < 100 ng/mL; 2) индекс на sTfR < 1 mg/ng.

4. Контролна група - пациенти с ревматоиден артрит без анемия.

Установихме следните нива на серумен хепсидин:

- При пациенти с РА и ЖДА – $0,61 \pm 0,4 \mu\text{g/l}$;
- При пациенти с РА и АХЗ – $87,97 \pm 10,7 \mu\text{g/l}$;
- При пациенти с РА и комбинацията от ЖДА / АХЗ – $1,73 \pm 0,4 \mu\text{g/l}$;
- При пациенти с РА без анемия (контролна група) – $14,57 \pm 8,0 \mu\text{g/l}$.

Резултатите са представени графично на Фигура 9.



Фигура 9. Средни стойности на серумен хепсидин при отделните групи пациенти с ревматоиден артрит

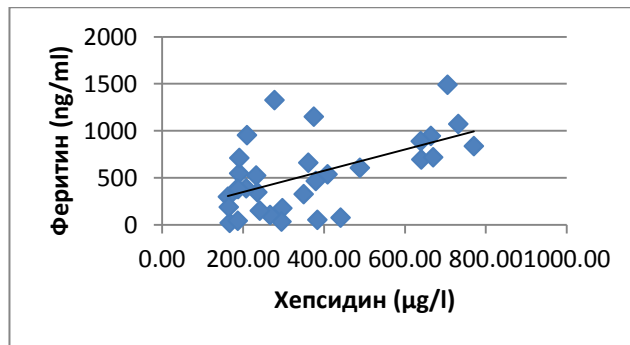
4. Определяне на значими корелационни зависимости между хепсидин и различни клиничко-химични показатели при отделните състояния

При определяне на корелационни зависимости между хепсидин и клиничко-химични или хематологични показатели използвахме следната таблица за степен на корелационна зависимост между два показателя (Таблица 15).

Таблица 15. Степен на корелационна зависимост между два показателя

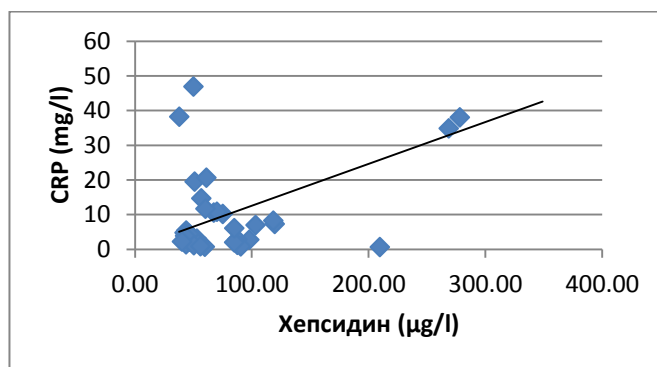
стойност	корелация
0	няма
под 0,3	слаба
0,3 – 0,5	умерена
0,5 – 0,7	значителна
0,7 – 0,9	голяма
над 0,9	много голяма
1	функционална

Определяне на корелационни зависимости между серумните нива на хепсидин и феритин при пациенти с ХБЗ (стадий V, на диализа) - ниво на корелация $r = 0,556$; степен на значимост $p < 0,005$ (Фиг. 10).



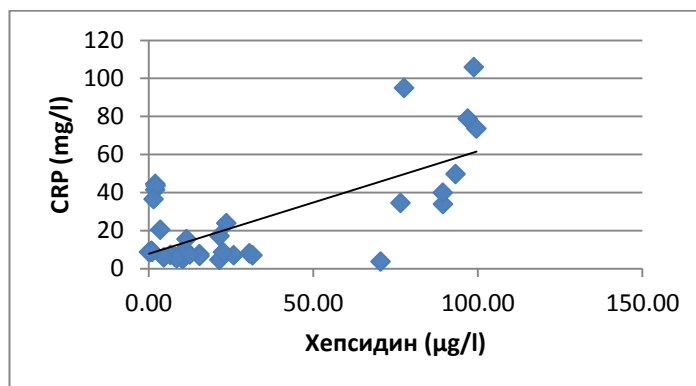
Фигура 10. Корелация между серумните нива на хепсидин и феритин при пациенти с ХБЗ (стадий V, на диализа)

Определяне на корелационни зависимости между серумните нива на хепсидин и С-реактивен протеин при пациенти с ХБЗ (стадии II до IV, без диализа) - ниво на корелация $r = 0,587$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 11).



Фигура 11. Корелация между серумните нива на хепсидин и С-реактивен протеин при пациенти с ХБЗ (стадии II до IV, без диализа)

Определяне на корелационни зависимости между серумните нива на хепсидин и С-реактивен протеин при пациенти с ревматоиден артрит - ниво на корелация $r = 0,702$; степен на значимост $p < 0,1$ (Фиг. 12).



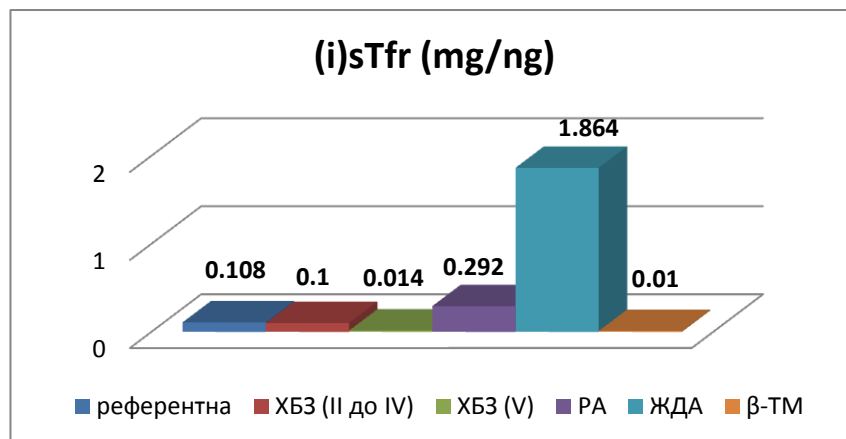
Фигура 12. Корелация между серумните нива на хепсидин и С-реактивен протеин при пациенти с ревматоиден артрит

5. Изчислени показатели

На базата на серумните нива за хепсидин, феритин, разтворими трансферинови рецептори и изчислено процентно насищане на трансферина определихме следните индекси (Фиг. 13 - 18).

5.1. Индекс на разтворими трансферинови рецептори към феритин – използван за отдиференциране на желязо-дефицитна анемия от анемия на хронично възпаление

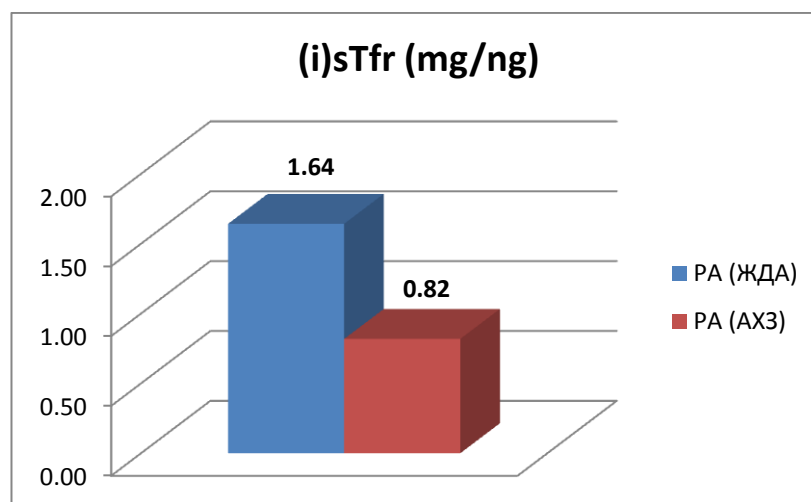
Определихме cut-off стойност на индекс на разтворими трансферинови рецептори към феритин за отдиференциране на желязо-дефицитна анемия от анемия на хронично възпаление от 0,108 mg/ng.



Фигура 13. Индекс на разтворими трансферинови рецептори към феритин

Наблюдава се най-висока стойност про пациенти с желязо-дефицитна анемия (1,864 mg/ng).

Индекс на разтворими трансферинови рецептори към феритин при пациенти с ревматоиден артрит

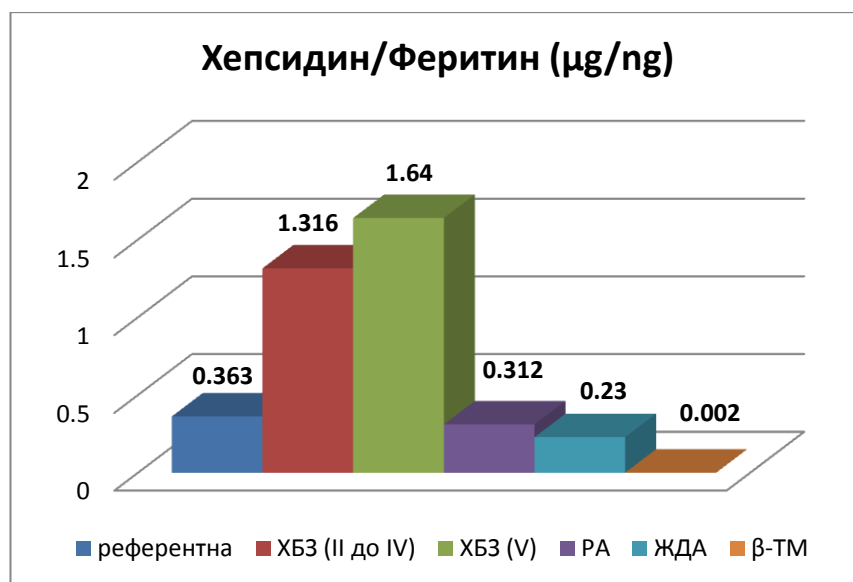


Фигура 14. Индекс на разтворими трансферинови рецептори към феритин при пациенти с РА

При пациенти с ревматоиден артрит се наблюдава добра корелционна зависимост при отдиференциране на желязо-дефицитна анемия от анемия на хронично заболяване 1,64 mg/ng към 0,82 mg/ng; $r = 0,388$, $p < 0,01$.

5.2. Индекс на хепсидин към феритин – използван за отдиференциране на анемия на хронично възпаление от комбинацията АХЗ/ЖДА

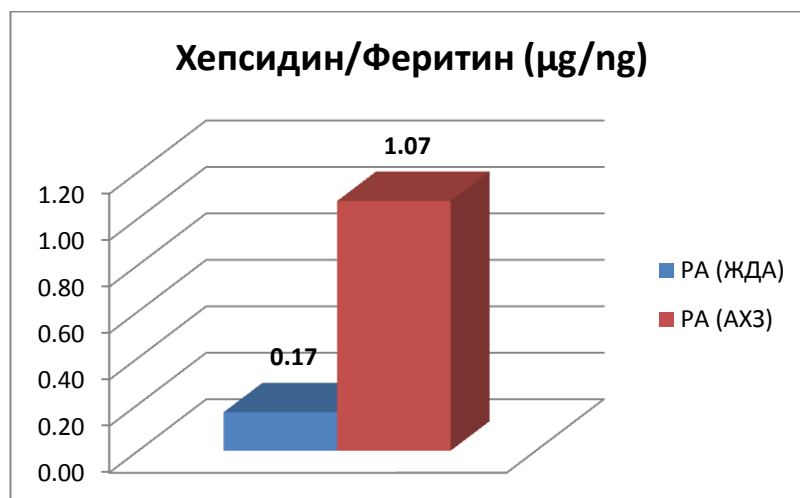
Определихме cut-off стойност на индекс на хепсидин към феритин, използван за отдиференциране на анемия на хронично възпаление от комбинацията АХЗ/ЖДА от 0,363 $\mu\text{g}/\text{ng}$.



Фигура 15. Индекс хепсидин към феритин

Установени са най-високи стойности при пациенти с хронично бъбречно заболяване стадии II до IV (1,316 $\mu\text{g}/\text{ng}$) и ХБЗ стадий V (1,64 $\mu\text{g}/\text{ng}$).

Индекс на хепсидин към феритин при пациенти с ревматоиден артрит

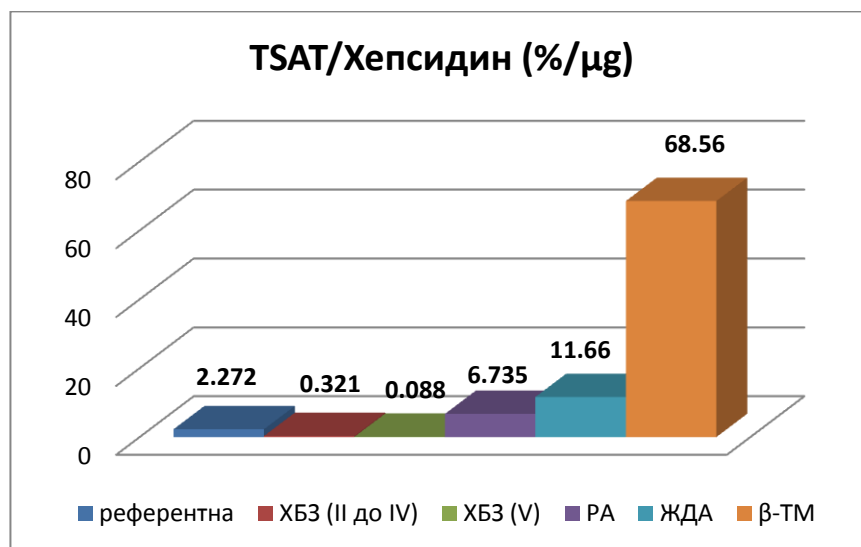


Фигура 16. Индекс хепсидин към феритин при пациенти с РА

При пациенти с ревматоиден артрит се установява добра корелционна зависимост при отдиференциране на желязо-дефицитна анемия от анемия на хронично заболяване 0,17 µg/ng към 1,07 µg/ng; $r = 0,353$, $p < 0,01$.

5.3. Индекс на процентно трансфериново насищане към хепсидин – използван за отдиференциране на желязо-дефицитна анемия от анемия при възпаление

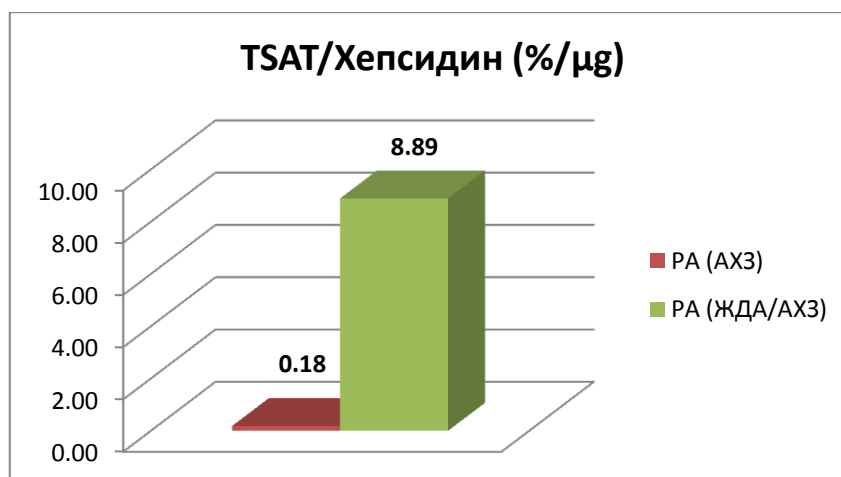
Определихме cut-off стойност на индекс на процентно трансфериново насищане към хепсидин, използван за отдиференциране на желязо-дефицитна анемия от анемия при възпаление от 2,272 %/µg.



Фигура 17. Индекс TSAT към хепсидин

Наблюдават се най-високи стойности при пациенти с желязо-дефицитна анемия (11,66 %/µg). Резултатът е повлиян от естеството на заболяването при пациенти с β-таласемия майор (68,56 %/µg).

Индекс на процентно трансфериново насищане към хепсидин при пациенти с ревматоиден артрит



Фигура 18. Индекс TSAT към хепсидин при пациенти с РА

При пациенти с ревматоиден артрит се установява добра корелционна зависимост при отдиференциране на анемия на хронично заболяване от комбинацията желязо-дефицитна анемия/АХЗ 0,18 %/ μg към 8,89 %/ μg ; $r = 0,396$, $p < 0,001$.

6. Определяне на прагови стойности на хепсидин при отграничаването на изследваните групи от референтната

За да се определят праговете стойности на количествените променливи бе приложен ROC curve анализ.

Статистически значими прагови стойности на хепсидина могат да бъдат установени за всяка една от изследваните групи без тази на пациенти с ревматоиден артрит без анемия, тъй като за тази подгрупа $p > 0.05$.

При отграничаването на групите ревматоиден артрит с анемия на хронично възпаление, ХБЗ (стадии II до V, без и на диализа) се получават максимални стойности на критериите за клинична и диагностична значимост – всички са равни на 100%.

При останалите групи чувствителността и отрицателната предиктивна стойност също са 100%, но останалите критерии са с по-ниски величини (69 – 99%).

Показателят хепсидин дава отлични възможности за отдиференциране на разглежданите групи от референтната с изключение на пациентите с ревматоиден артрит и нормален хепсидин.

При прагова стойност $\leq 1,385$ групата с **β -таласемия майор** може да се отдиференцира от контролната група (*площ под кривата 0,999, $p < 0,001$*).

При прагова стойност $\leq 2,63$ групата с **ревматоиден артрит и желязо-дефицитна анемия** може да се отдиференцира от контролната група (*площ под кривата 0,993, $p < 0,001$*).

При прагова стойност $\geq 53,42$ групата с **ревматоиден артрит и анемия при хронично заболяване** може да се отдиференцира от контролната група (*площ под кривата 1,000, $p < 0,001$*).

При прагова стойност $\geq 37,07$ групата с **хронично бъбречно заболяване, стадии II до IV** може да се отдиференцира от контролната група (*площ под кривата 1,000, $p < 0,001$*).

При прагова стойност $\geq 99,35$ групата с **хронично бъбречно заболяване, стадий V, на диализа** може да се отдиференцира от контролната група (*площ под кривата 1,000, $p < 0,001$*).

При прагова стойност $\leq 2,62$ групата с **желязо-дефицитна анемия** може да се отдиференцира от контролната група (*площ под кривата 0,997, $p < 0,001$*).

V. Обсъждане

1. Валидиране на ELISA метод за количествено определяне на серумен хепсидин.

Въвеждането на ELISA метод с висока аналитична надеждност в клинично-лабораторната практика в Република България е крачка напред в диагностичното и терапевтично поведение при различни нарушения в хомеостазата на желязото.

Стандартът, използван за построяване на калибрационна крива, е проследим до метод от по-висок метрологичен клас, което позволява получените резултати от нас да бъдат сравними с по-скъпи, но недостъпни за рутинна работа методи. Стойностите на концентрациите на стандартите, получени след разреждане на основния стандарт и използвани за построяване на калибрационна крива, осигуряват надеждност на получените резултати в клинично значимите области – патологично ниска, референтна и патологично висока.

Определената граница на откриване на метода (0,022 $\mu\text{g/l}$) осигурява много висока диагностична чувствителност. С използвания от нас метод могат да се установят с необходимата аналитична надеждност стойности в ултра ниската област, каквито се наблюдават при пациенти с токсично свръхобременяване с желязо при β -таласемия

майор, в резултат на системни кръвопреливания. Установяването на такива стойности при пациентите с това заболяване предполага прием на хепсидинови агонисти, с цел ограничаване на отложеното желязо в хепатоцитите и намаляване токсичността към клетъчните структури.

При верифициране на точността на получената калибрационна крива с помощта на определените Low Level Of Quantification (LLOQ), Middle Point Of Quantification (MPQ) и Upper Level Of Quantification (ULOQ) се осигури аналитична надеждност на резултатите от количествено определяне на серумен хепсидин в трите клинично значими области – ниска, нормална и висока. Получените от нас резултати от трите нива са в допустимите граници за невъзпроизводимост и достоверност на метода, изразявани чрез вариационен коефициент (в %) и bias (в %): за LLOQ са CV<20% и bias<20%; за MPQ и ULOQ са CV<15% и bias<15%.

Установените от нас стойности са: за LLOQ – CV 7.8%, bias 9.9%; за MPQ – CV 4.8%, bias 2.1%; за ULOQ – CV 3.8%, bias 11.5%.

Калибрационната крива отговаря на международните изисквания за приложимост на методи в клиничната практика.

Достоверността на метода определена чрез похвата recovery в две концентрационни области осигури на използвания от нас ELISA метод за количествено определяне на серумен хепсидин необходимото качество за валидност на получените резултати. Доказа се област на recovery от 96.5% до 97.6%. Доказа се много добра аналитична откриваемост на метода.

Невъзпроизводимостта на метода в серия и между различни аналитични серии, определена с помощта на три серумни проби на пациенти с неизвестно количество на хепсидин, доказва висока точност на получените резултати. Установихме SD от 0,01 до 0,04 и CV от 0,46% до 4,62%. Получените от нас резултати са съпоставими с тези, които са обявени от производителя.

Установихме стабилността на използвания материал за количествено определяне на хепсидин по ELISA метод. Пробите трябва да бъдат съхранявани до изработването

им замразени, при -40°C . До петкратно замразяване и размразяване на пробата осигурява отклонение в резултати със SD от 0,003 до 0,01 и CV от 0,08% до 2,37%, като тези вариации са без клинична и статистическа значимост.

При направеното от нас проучване относно зависимостта на времето за вземане на биологичен материал и серумните концентрации на хепсидин, установихме статистически значима разлика в серумните нива на хепсидин между първа (07,30 – 08,30 ч.) и втора (12,00 – 13,00 ч.) групи [$0.7 < r < 1.0$; $P < 0.5$], както и между първа (07,30 – 08,30 ч.) и трета (16,00 – 17,00 ч.) и втора (12,00 – 13,00 ч.) и трета (16,00 – 17,00 ч.) групи [$0.7 < r < 1.0$; $P < 0.05$]. Установените разлики най-вероятно се дължат на промените в серумните нива на желязо в организма по време на денонощието.

2. Определяне на граници на референтната област на серумен хепсидин за българската популация

Установената от нас референтна област на серумен хепсидин за българската популация (за възрастта от 18 до 76 години) е 3,052 – 37,750 $\mu\text{g/l}$. Нашите данни са сравними с обявените референтни граници за хепсидин чрез Weak cation exchange time-of-flight mass spectrometry (WCX-TOF MS) [Kroot JJ и сътр., Clin Chem 2010]: 1,39 – 40,72 $\mu\text{g/l}$ при 95% референтен интервал.

При проведеното количествено определяне на серумен хепсидин при здрави доброволци от българската популация установихме статистически значима разлика между жени в пременопауза и менопауза; както и при всяка една група спрямо мъжете. Получените различия се дължат на разликата в нормалното ниво на серумно желязо между двата пола, както и поради физиологичната особеност на менструацията като нормално състояние, при която организма губи желязо. Сходни разлики в серумните нива на хепсидин са отчетени и при други проучвания.

3. Сравнително определяне на серумен хепсидин при клинично здрави доброволци и пациенти с различни патологични състояния, протичащи с

нарушения в обмяната на желязо. Интерпретация на определени корелационни зависимости.

Серумното ниво на хепсидин е статистически значимо повишено при пациенти със заболявания, протичащи с анемия на хронично възпаление (хронично бъбречно заболяване стадии II до V и ревматоиден артрит; $p < 0,001$). Концентрациите на хепсидин в серума са понижени при пациенти с желязо-дефицитна анемия и β -таласемия майор ($p < 0,001$).

Сравнихме количествено определените серумни нива на хепсидин-25 чрез „сандвичев“ ELISA метод при пациенти с анемия на хронично възпаление (хронично бъбречно заболяване стадии II до IV, без диализа, $n=35$; хронично бъбречно заболяване стадий V, на диализа, $n=35$; ревматоиден артрит, $n=40$); при желязо-дефицитна анемия ($n=15$) и при β -таласемия майор ($n=10$) с резултатите от здрави доброволци ($n = 180$).

Сравнителният анализ показва, че серумните нива на хепсидин при пациенти с анемия на хронично възпаление са статистически значимо по-високи при ($p < 0,01$):

- Хронично бъбречно заболяване стадии II до IV, без диализа - средно 90,7 $\mu\text{g/l}$, обхват 37,8 – 349,2 $\mu\text{g/l}$;
- Хронично бъбречно заболяване стадий V, на диализа – средно 365,6 $\mu\text{g/l}$, обхват 162,3 – 770,2 $\mu\text{g/l}$;
- Ревматоиден артрит – средно 87,97 $\mu\text{g/l}$, обхват 70,5 – 99,6 $\mu\text{g/l}$ спрямо тези при здрави индивиди (средно 15,4 $\mu\text{g/l}$, обхват 3,05 – 36,4 $\mu\text{g/l}$).

Серумните нива на хепсидин са статистически значимо по-ниски при ($p < 0,01$):

- Желязо-дефицитна анемия – средно 1,08 $\mu\text{g/l}$, обхват 0,45 – 2,1 $\mu\text{g/l}$;
- β -таласемия майор – средно 0,95 $\mu\text{g/l}$, обхват 0,65 – 1,23 $\mu\text{g/l}$;
- Ревматоиден артрит – средно 1,23 $\mu\text{g/l}$, обхват 0,09 – 2,12 $\mu\text{g/l}$ спрямо тези при здрави индивиди (средно 15,4 $\mu\text{g/l}$, обхват 3,05 – 36,4 $\mu\text{g/l}$).

Получените различия в серумните нива на хепсидин се дължат на етиологията на видовете анемии при отделните нозологични единици. При хронично бъбречно заболяване и ревматоиден артрит това е хроничното възпаление в организма, което

води до нарастване секрецията на хепсидин под влияние на проинфламаторни стимули. При желязо-дефицитна анемия и β -таласемия майор причината е наблюдаващата се хипоферемия.

а. Хепсидин при пациенти с хронично бъбречно заболяване

Етиологията на повишените серумни нива на хепсидин при хронично бъбречно заболяване е най-често многофакторна и е свързана с наличието на функционален желязен дефицит, анемия или хронично възпаление в организма. Най-вероятно бъбреците са отговорни не само за синтеза на хепсидин (значимо по-малко в сравнение с черния дроб), но имат и важна роля в елиминирането му от организма. В случаите с ограничение на ефективната гломерулна филтрация при ХБЗ, се установяват повишени нива на серумен хепсидин дори и без наличие на желязен дефицит или изразено възпаление. Освен това серумните концентрации на хепсидина строго корелират със стадия на ХБЗ и нивата на серумния креатинин. В резултат на нашето проучване установихме нарастване на серумното ниво на хепсидин с напредване стадия на заболяването, като най-значима корелация бе намерена между II и IIIA, както и между IIIA и IIIB стадии. При стадии IV и V се наблюдават най-високи концентрации на серумен хепсидин, което се дължи на задълбочаващото се увреждане на еритропоезата, както и на силно намалената секреция на еритропоетин поради тежкото засягане на бъбрека в хода на заболяването. Определянето на серумните нива на хепсидин при тях може да се използва като предиктор за резистентност и мониторинг на терапията с еритропоетин стимулиращи средства.

През последните години все повече се увеличават публикуваните данни за причините, които водят до увеличените серумни нива на хепсидин при пациенти на хронична хемодиализа. Ние установихме независима и пряка корелация на серумните концентрации на хепсидин-25 преди провеждането на диализата с нивата на серумния феритин ($r = 0,556$, $p < 0,005$), но не и с концентрацията на C-реактивен протеин ($r = -0,043$; $p < 0,001$), което се дължи на факта, че в този стадий няма висока зависимост

между техните нива относно активността на възпаление. Съществува добра корелационна зависимост между серумен хепсидин и феритин и при пациенти с анемия на хронично заболяване – хронично бъбречно заболяване, стадии II до IV, без диализа ($r = 0,447$).

При наличие на възпаление феритинът реагира като острофазов белтък. Съществува много добра корелационна зависимост между серумен хепсидин и ниво на С-реактивен протеин при пациенти с хронично бъбречно заболяване, стадии II до IV, без диализа ($r = 0,587$, $p < 0,1$). Серумният полуживот на проинфламаторните цитокини, TNF- α и IL-1 е по-дълъг при животни без бъбречна функция. Намалването на бъбречната функция може да се отрази на нивата на допълнителни възпалителни молекули, като серумен С-реактивен протеин или IL-6, които корелират обратно с креатининовия клирънс. При пациенти на диализа с остатъчна бъбречна функция, се наблюдават по-високи серумни концентрации на С-реактивен протеин спрямо тези с относително по-малко запазена бъбречна функция. При бъбречна недостатъчност, ендотелната дисфункция и атеросклерозата, както и сърдечно-съдовите усложнения се срещат почти винаги. Доказано е, че маркерите на възпаление играят роля в патогенезата и прогресирането на атеросклерозата; това се счита за хронично възпалително състояние. Метаболизмът на желязото е нарушен при хронични възпалителни заболявания, атеросклероза и др. Съобщава се, че бъбречната недостатъчност е рисков фактор за развитие на атеросклероза и сърдечно-съдови заболявания. Това може да се дължи отчасти на едновременното възпаление. Диагнозата на недостиг на желязо или функционален недостиг на желязо е особено предизвикателство при пациенти с остри или хронични възпалителни състояния, тъй като повечето от биохимичните маркери за метаболизъм на желязото са засегнати от реакционната остра фаза. Тъй като пациентите с хронично бъбречно заболяване имат леко до умерено хронично възпалително състояние, подобен на този, срещащ се при ревматоиден артрит или злокачествени заболявания, изложена е хипотеза, че пациенти, изискващи високи дози еритропоетин може да имат по-голяма "възпалителна

активност" и по-високи нива на цитокини. Следователно, взаимодействия между проинфламаторните цитокини и хепсидина, посредници за функционалния недостиг на желязо. При такива пациенти, може да обясни защо се наблюдава висок феритин, лошо усвояване на желязо, както и нарушено освобождаване на желязото от макрофагите. Установени са високи нива на хепсидин при пациенти с анемия на хронично възпаление и при хронична бъбречна недостатъчност и анемия.

В резултат на нашето проучване, ние установихме добра положителна корелационна зависимост между нивата на серумен хепсидин и процентно трансфериново насищане (определено по концентрациите на желязо и тотален желязо-свързващ капацитет) при пациенти с хронично бъбречно заболяване, стадии II до IV, без диализа ($r = 0,387$; $p < 0,001$). Индексът процентно насищане на трансферин (определен по този начин) към серумните нива на хепсидин се използва за отдиференциране на анемия на хронично заболяване от анемия на възпаление, което е най-характерно за пациенти с хронично бъбречно заболяване, стадии II до IV, без диализа.

Следвайки корелационната зависимост между процентно трансфериново насищане и хепсидин се установява добра отрицателна корелация между индекса на разтворими трансферинови рецептори и хепсидина. При пациенти с хронично бъбречно заболяване, стадии II до IV, без диализа и ХБЗ, стадий V, на диализа корелационните зависимости са $r = -0,327$ и $r = -0,359$, $p < 0,001$. Предполага се, че хемоглобиновото съдържание в ретикулоцити е по-добър предиктор на отговора на терапия с железни препарати при пациенти с хронична диализа спрямо класическите маркери понижено ниво на процентно трансфериново насищане ($< 20\%$) и ниско ниво на феритин (< 100 ng/ml).

При пациенти с хронично бъбречно заболяване, стадии II до IV, без диализа, беше установена много ниска, отрицателна ($r = -0,297$; $p < 0,001$) корелационната зависимост между серумните концентрации на хепсидин и изчислената гломерулна филтрация (eGFR). Това се дължи вероятно на факта, че със задълбочаване на тежестта на увреждане на бъбреците, с намаляване на eGFR серумните нива на хепсидин

нарастват, докато при достигане на хронично бъбречно заболяване, V стадий, на диализа тази зависимост се загубва ($r = -0,093$; $p < 0,001$). Установено е, че серумните нива на хепсидин не се увеличават значително при пациенти с нарушена бъбречна функция, при които не се налага диализа. Пациенти на хемодиализа, обаче, показват значително по-високи хепсидинови нива, отколкото пациенти с хронична бъбречна недостатъчност. Концентрацията на серумният феритин е значителен предиктор за нивата на хепсидин. За разлика от него, гломерулната филтрация не е независим предиктор за нивата на хепсидин при пациенти с ХБЗ. Освен това серумните хепсидинови нива намаляват леко по време на хемодиализа (10-15%), въпреки артерио-венозната разлика в нивата на хепсидин $>40\%$. Известно е, че при ултрафилтрация може да се получат по-високи нива на хепсидин. Тези данни потвърждават други проучвания за отчитане на високи нива на хепсидин при пациенти на хемодиализа. Доказано е, че серумният феритин е силно свързан с нивата на хепсидин при пациенти с хронична бъбречна недостатъчност и на хемодиализа. Въпреки това, данните изглежда се различават по отношение на ролята на гломерулната филтрация.

Установено е, че съществува отрицателна корелационна зависимост между eGFR и хепсидина при пациенти с хронично бъбречно заболяване, стадии II до IV, без диализа. Хепсидинът се метаболизира в бъбреците и се отделя чрез урината. Увреждането на един или и двата процеса може да причини натрупване на хепсидин при успоредно намаляване на eGFR. Това обяснява отрицателната корелационна зависимост между eGFR и хепсидина, което е отражение на комбинацията от хронично бъбречно заболяване и възпаление. Етиологията на бъбречно заболяване в стadiите II до IV е предимно поради класически невъзпалителни причини, като хипертония, диабет и поликистоза на бъбреците.

Определянето на серумни нива на хепсидин при пациенти с хронично бъбречно заболяване може да доведе до оптимизиране на лечението с еритропоетин стимулиращи средства.

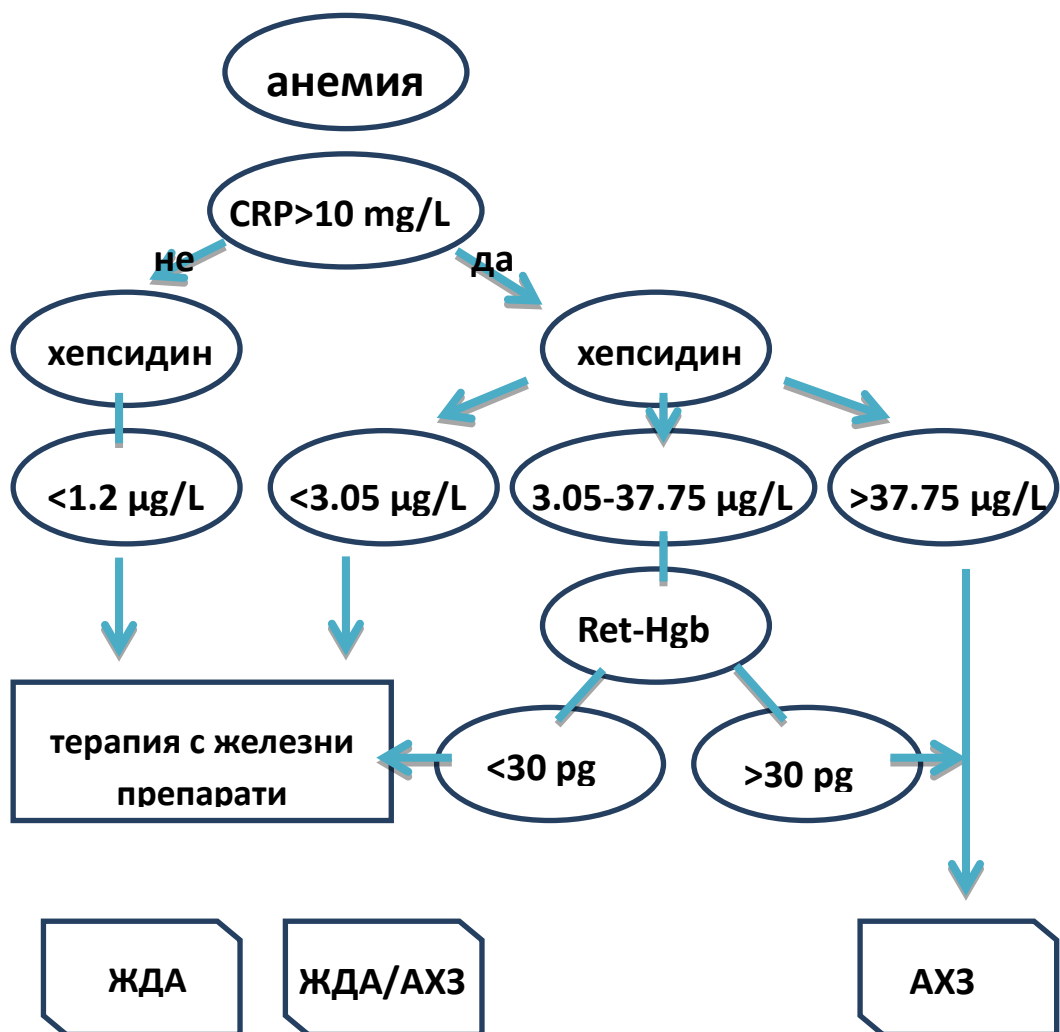
в. Хепсидин при пациенти с ревматоиден артрит

При пациенти с ревматоиден артрит диагностиката на анемията е клинично предизвикателство, тъй като рутинните параметри за желязен статус, като трансферин, желязо, и феритин, са повлияни от отговорите на острата фаза. Трансферинът оказва влияние върху запасите от желязо линейно на степента на необходимост от желязо на еритроblastите, но възпалителни стимули може да потиснат неговата концентрация чрез инхибиране на еритропоетина. Индексът на разтворими трансферинови рецептори е разработен за преодоляване на този ефект и е натрупал заслуги в диагностичните алгоритми, заедно с хемоглобиновото съдържание в ретикулоцитите. Въпреки това, всеки един от тези маркери има своите недостатъци при прогнозирането на недостиг на желязо. При направено проучване при пациентите с ревматоиден артрит са установени силни корелационни зависимости между серумните и уринни нива на хепсидин с тези на феритин и индексът на разтворими трансферинови рецептори, но не и с параметрите за съдържание на хемоглобин в ретикулоцити. Серумното ниво на хепсидин е представен добре като диагностичен тест на недостатъчност на желязо, включително и при наличие на възпаление, и отдиференцира групите с желязо-дефицитна анемия и комбинацията от желязо-дефицитна/анемия на хронично възпаление спрямо групата от пациенти с анемия на хронично възпаление. Съдържанието на хемоглобин в ретикулоцити и в еритроцити също може да се използват за отдиференциране на анемия с недостиг на желязо от анемия на хронично възпаление. Супресията на хепсидин при състояния на анемия с желязен дефицит и възпаление се среща при пациенти с хронични инфекции, автоимунни заболявания, злокачествени заболявания, при пациенти с ракови заболявания и възпаление, и при пациенти с остро възпаление в интензивните отделения. Обратно, при друга хетерогенна група от пациенти с хронично възпаление и анемия, нивата на хепсидин не могат да послужат за диференциране на ЖДА/АХЗ от анемия на хронично възпаление. Това може да се дължи на използването на различна схема за отдиференциране на групите спрямо тази, в настоящото проучване. Най-ниските установяеми концентрации на серумен хепсидин са

показателни за желязо-дефицитна анемия, но може да се каже, че нивата на пептида в урина подобрява диагностична точност. Счита се, че определянето на уринни нива на хепсидин може да бъде привлекателна алтернатива в развиващия се свят, като неинвазивен начин за оценка на дефицита на желязо като това се прави преди започване на програми за перорален прием на желязо.

Установихме статистически значимо повишаване на серумните нива на хепсидин при пациенти с ревматоиден артрит и анемия на хронично заболяване. Концентрацията на хепсидин в серума е понижена при пациенти с ревматоиден артрит и комбинация от желязо-дефицитна анемия и анемия на хронично заболяване, както и при пациенти с ревматоиден артрит и желязо-дефицитна анемия. Серумните нива на хепсидин бяха в границите на референтната област при пациенти с ревматоиден артрит без анемия. Получените различия в серумните нива на хепсидин се дължат на естеството на съпровождащата анемия при отделните групи. Инфламаторните стимули водят до увеличаване секрецията на хепсидин, докато хипоферемията е причина за намаляване на синтеза на пептида от хепатоцитите.

На базата на получените резултати считаме, че серумните нива на хепсидин, едновременно с определянето на С-реактивен протеин и хемоглобиново съдържание в ретикулоцити, могат да бъдат включени в изработването на алгоритъм за диагностичен и терапевтичен подход при пациенти с ревматоиден артрит. Предложеният от нас алгоритъм е представен на Фигура 19. Тъй като анемията при ревматоиден артрит е хетерогенна, може да е необходимо повече от един параметър за да се диагностицира желязен дефицит.



Фигура 19. Алгоритъм за избор на терапия на анемия при пациенти с ревматоиден артрит (по van Santen S, 2011; с наши данни)

Пациенти с възпаление и ниво на хепсидин < 3.05 µg/L ще имат недостиг на желязо, докато нива на хепсидин > 37.75 µg/L са диагностични за анемия на хронично заболяване. Пациентите, при които нивата на хепсидин се понижат между 3.05 и 37.75 µg/L се характеризират допълнително с помощта на хемоглобиново съдържание в ретикулоцити, като нива < 30 pg са показателни за едновременен недостиг на желязо. За желязо-дефицитна анемия, ниво на хепсидин < 1.2 µg/L е много специфично.

Използването на тези показатели за преценка необходимостта от препарати, съдържащи желязо, показва, че пациентите с комбинацията от желязо-дефицитна анемия и анемия на хронично заболяване могат да бъдат подложени на терапия с такива медикаменти, докато желязо-съдържащите медикаменти не са подходящи за корекция на анемията при пациенти с РА и АХЗ.

с. Хепсидин при пациенти с желязо-дефицитна анемия

При пациенти с желязо-дефицитна анемия се установяват едни от най-ниските стойности на серумен хепсидин. Установената от нас стойност е средно 1,08 $\mu\text{g/l}$ спрямо средната стойност при референтната група (15,4 $\mu\text{g/l}$). С намаляване на секрецията на хепсидин регулаторните механизми целят възможно най-пълноценно усвояване на постъпващото желязо от храната или в хода на терапевтично повлияване.

Корелационната зависимост между феритин и хепсидин при желязо-дефицитна анемия е ниска ($r = 0,325$; $p < 0,05$). Въпреки значението на показателя феритин за съдържанието на запаси от желязо в организма, не се установява корелационна зависимост, което се дължи на факта, че хепсидиновите нива не се влияят от ниското серумно ниво на феритин. Влияние между двата показателя се наблюдава в състоянията, при които феритина реагира като острофазов протеин.

При желязо-дефицитна анемия бяха наблюдавани преки корелационни зависимости между хепсидин и С-реактивен протеин ($r = 0,007$; $p < 0,5$) поради липсата на възпалително естество в етиологията на анемията при това заболяване.

Корелационната зависимост при желязо-дефицитна анемия между хепсидин и серумно желязо е добра, отрицателна ($r = -0,312$; $p < 0,001$), като бяха установени ниски концентрации на серумно желязо и ниски нива на хепсидин.

В много от публикуваните в литературата данни се доказва ролята на разтворимите трансферинови рецептори (sTfR) в ранната диагностика на желязо-дефицитната анемия. Свободните sTfR се използват за изчисляване на индекса на sTfR/феритин, подходящ за диагностично разграничаване на желязо-дефицитната

анемия от анемия на хронично заболяване. Явно не съществува пряка корелация между серумните концентрации на хепсидин и свободните sTfR, тъй като в нашето проучване беше установен нисък корелационен коефициент ($r = 0,022$; $p < 0,001$) между двата показателя.

В резултат на направените корелации, бе намерена добра отрицателна корелационна зависимост между нивата на хепсидин и процентно трансфериново насищане (определено по концентрациите на желязо и тотален желязо-свързващ капацитет) при пациенти с желязо-дефицитна анемия ($r = -0,321$; $p < 0,001$), т.е. понижаването на трансфериновата сатурация е пряко свързано с увеличаване на серумните концентрации на хепсидин.

d. Хепсидин при пациенти с β -таласемия майор

Според публикуваните данни в литературата, при пациенти с β -таласемия майор се установяват ултраниски стойности на серумен хепсидин. Установените от нас резултати потвърждават тази тенденция, като средните стойности на серумния хепсидин в случаите с β -таласемия майор бяха значително по-ниски в сравнение с референтната група, съответно $0,95 \mu\text{g/l}$ и $15,4 \mu\text{g/l}$, $p < 0,001$. Синтезът на хепсидин при β -таласемия майор най-вероятно е намален в резултат на свръхобременяването с желязо и неефективната еритропоеза. Корелационната зависимост между хепсидин и феритин при β -таласемия майор е много ниска, отрицателна ($r = -0,144$; $p < 0,001$). При това заболяване се наблюдават екстремно високи стойности на феритин поради отлагането на желязо в хепатоцитите и ултраниски нива на серумен хепсидин. Това предполага по-голямо влияние на активността на еритропоезата върху серумните концентрации на хепсидин в сравнение със тежестта на свръхобременяването с желязо (отчетена с нивата на серумния феритин). Корелационните зависимости между хепсидин и разтворими трансферинови рецептори е $r = 0,267$, $p < 0,001$. Зависимостта между серумните нива на хепсидин и брой ретикулоцити е $r = 0,387$, $p < 0,001$.

Установена бе добра корелационна зависимост между серумни нива на хепсидин

и концентрация на серумно желязо при пациенти с β -таласемия майор ($r = 0,317$; $p < 0,001$). Тази зависимост се дължи на факта, че има повишено отлагане на желязо в тъканите при пациентите с β -таласемия майор в резултат на честите кръвопреливания и при високи нива на желязо се наблюдават ултраниски концентрации на хепсидин.

С намаляване на секрецията на хепсидин регулаторните механизми целят възможно най-пълноценно усвояване на постъпващото желязо в хода на терапията или от храната. Ниският хепсидин улеснява усвояването на желязо, което задълбочава степента на токсичните ефекти на микроелемента върху тъканите и клетките. Това предполага прилагане на синтетичен хепсидин като допълнение на терапията.

Терапевтичното приложение на хепсидинови агонисти при пациенти с β -таласемия майор може да доведе до оптимизиране състоянието на токсично натрупване на желязо в организма, в резултат на честите кръвопреливания.

4. Оценка на промените в клинично-химичните и хематологичните показатели при изследваните групи.

При сравнителното разглеждане на клинично-химичните и хематологичните показатели, изработени за всички групи изследвани лица, се наблюдават няколко значими различия:

Най-ниски стойности на **еритроцитите** бяха установени при пациенти с хронично бъбречно заболяване стадий V, на хемодиализа (средна стойност $3,34 \times 10^{12}/l$) и β -таласемия майор (средна стойност $3,54 \times 10^{12}/l$) спрямо контролната група ($4,98 \times 10^{12}/l$).

Съответно концентрацията на **хемоглобин** и стойностите за **хематокрит** бяха статистически значимо понижени при същите групи пациенти – тези с хронично бъбречно заболяване стадий V, на хемодиализа (средни стойности на хемоглобин - $100,9 \text{ g/l}$, на хематокрит - $0,313 \text{ l/l}$) и β -таласемия майор (средни стойности на хемоглобин - $98,6 \text{ g/l}$, на хематокрит - $0,300 \text{ l/l}$) спрямо контролната група (съответно

хемоглобин - 142,6 g/l, хематокрит - 0,432 l/l). Наблюдаваните отклонения се дължат на тежестта на протичане на двете заболявания и корелират с тежестта на анемията. С напредване на тежестта на бъбречното увреждане при ХБЗ, еритропоезата в костния мозък става все по-неефективна, което се дължи и на недостига на еритропоети. В тези случаи серумните нива на хепсидин са значително повишени, което може да се използва за предикция на резистентност и мониториране на терапията с еритропоетин стимулиращи препарати.

Серумните нива на **желязо и феритин**, както и **процентно трансфериново насищане** са значително понижени при пациенти с желязо-дефицитна анемия (средни стойности желязо - 6,93 $\mu\text{mol/l}$; феритин - 21,1 ng/ml; TSAT - 9,0 %) спрямо контролната група (средни стойности съответно 18,78 $\mu\text{mol/l}$; 89,91 ng/ml; 30 %). Наблюдаваните отклонения се дължат на спецификата на желязо-дефицитната анемия, характеризираща се с намалени серумни нива на желязо, изчерпване на резервното желязо под формата на феритин и намаляване на процентното трансфериново насищане. Последното се дължи на значително нарастване на серумните нива на трансферин при желязо-дефицитна анемия (средна стойност 3,71 g/l) спрямо контролната група (средна стойност 2,96 g/l). Изброените показатели се използват в диагностиката на различните стадии на желязо-дефицитната анемия. Понижените нива на серумно желязо с повишен тотален желязо-свързващ капацитет корелират отрицателно с нивата на хепсидин, което се използва за отдиференциране на желязо-дефицитна анемия от анемия на възпаление. Зависимостта е обратна на резултата при пациенти с хронично бъбречно заболяване стадии II до IV, без диализа при които водеща роля в анемията има протичащия хроничен възпалителен процес.

При пациенти с β -таласемия майор бяха установени най-високите стойности на серумно желязо и феритин (средни стойности 60,40 $\mu\text{mol/l}$, 1056,73 ng/ml) спрямо контролната група (средни стойности 18,78 $\mu\text{mol/l}$, 89,91 ng/ml). Наблюдаваните отклонения в двата показателя се дължат на свръхобременяването на организма с желязо поради честите кръвопреливания и неефективната еритропоеза със засилена

хемолиза на еритроцити. Тази находка, съпроводена с ултраниските серумни нива на хепсидин подсказва приложението на хепсидинови агонисти в терапията на заболяването с цел намаляване токсичността на значително повишеното желязо в кръвта върху тъканите и клетките и неговото блокиране в хепатоцитите.

Серумните нива на **трансферин** са значително понижени при пациенти с хронично бъбречно заболяване стадий V, на хемодиализа (средна стойност 1,87 g/l) спрямо контролната група (средна стойност 2,96 g/l). Отклонението се дължи на съпътстващата хипотрансферинемия в резултат на понижен белтъчен синтез.

Серумните нива на **C-реактивен протеин** са сигнификантно повишени при пациенти с ревматоиден артрит и анемия на хронично заболяване и при хронично бъбречно заболяване от всички стадии, II до V (средни стойности 22,8 mg/l; 11,49 mg/l) спрямо контролната група (средни стойности 1,65 mg/l). Наблюдаваните разлики се дължат на анемията на хронично възпаление и корелират с тежестта на болестния процес. В хроничното възпаление в организма значително се покачват нивата на възпалителните цитокини и с помощта на проинфламаторни стимули серумната концентрация на хепсидина нараства. В тези случаи нарастването на секрецията на хепсидин се обяснява с неговата функция като острофазов протеин, което е установено още при неговото откриване, когато се е предполагала неговата антибактерицидна функция.

Серумните нива на C-реактивен протеин са най-ниски при пациенти с желязо-дефицитна анемия (средни стойности 1,41 mg/l), сравними с тези на контролната група (средни стойности 1,65 mg/l). Наблюдаваното сходство в резултатите за C-реактивен протеин между двете групи се дължи на факта, че етиологично при желязен дефицит не се наблюдава възпаление. При наличие на съпътстваща инфекция и покачване на серумното ниво на C-реактивния протеин има възможност за евентуална компенсация на концентрацията на хепсидин в посока към увеличаване поради възпалителните стимули, оказващи влияние на механизмите на регулация на секрецията на хепсидин.

Поради увреждането на бъбреците при хронично бъбречно заболяване с и без

диализа се наблюдават значително повишени стойности на **серумен креатинин** (средна стойност 237 $\mu\text{mol/l}$; 716,0 $\mu\text{mol/l}$) спрямо контролната група (средна стойност 73,2 $\mu\text{mol/l}$).

Тъй като свръхпроизводството на хепсидин играе ключова роля в патофизиологията на анемия по време на възпаление и хронично заболяване, развитието на хепсидиновите антагонисти би било полезно за лечението на тези заболяване чрез улесняване на преразпределението на желязото от макрофагите до еритробластите. Блокирайки хепсидина, желязните запаси в организма могат да бъдат мобилизирани; хепсидиновите антагонисти може да намерят приложение като допълнение на терапията или вместо добавки на желязо. Хепсидиновите антагонисти, трябва да бъдат от полза при лечението на анемия на възпаление, когато първичното заболяване е рефрактерно на терапия, както и когато анемията не е толкова тежка и налагаща кръвопреливане. Хепсидиновите антагонисти може да обърнат еритропоезата при недостиг на желязо, която допринася за задълбочаване на анемията. При пациенти с хронично бъбречно заболяване и анемия, при която е нарушен синтеза на еритропоетин прилагането на хепсидинови антагонист може да бъдат полезно допълнение към провежданата терапия с еритропоетин стимулиращи средства.

5. Изчислени индекси с помощта на показателите разтворими трансферинови рецептори – феритин – процентно трансфериново насищане

С помощта на три клинично-химични показателя - разтворими трансферинови рецептори, феритин и процентно трансфериново насищане са изчислени индекси, чрез които в лабораторната практика е възможно отдиференцирането на желязо-дефицитната анемия от анемията на хронично заболяване, както и АХЗ от комбинацията между АХЗ/ЖДА.

Според редица публикации в литературата, съотношението между разтворимите трансферинови рецептори (sTfR) и серумната концентрация на феритина е надежден показател за оценка на количеството желязо в желязните депа. Ние установихме най-

висок индекс на **sTfR/феритин** при пациенти с желязо-дефицитна анемия (1,864 mg/ng) и ревматоиден артрит с клинично изявена ЖДА (1,64 mg/ng), което потвърждава неговата роля в отдиференцирането на ЖДА от анемия на хронично възпаление. При пациенти с ревматоиден артрит и анемия на хронично заболяване индексът sTfR/феритин е значително по-нисък 0,82 mg/ng поради високите серумни концентрации на острофазния феритин.

Индекс на хепсидин към феритин, изразяван в μg към ng се използва в клинично-лабораторната практика при отдиференциране на анемия на хронично възпаление от комбинацията АХЗ/желязо-дефицитна анемия. Най-висок индекс **хепсидин/феритин** бе определен при пациенти с хронично бъбречно заболяване в стадии II до IV, без диализа (1,316 $\mu\text{g}/\text{ng}$) и стадий V, на диализа (1,64 $\mu\text{g}/\text{ng}$), което потвърждава неговата роля в отдиференциране на анемия на хронично възпаление от комбинацията АХЗ/ЖДА. Разликата при този индекс между пациенти с ревматоиден артрит и анемия на хронично заболяване от ревматоиден артрит и комбинация от ЖДА/АХЗ е 1,07 $\mu\text{g}/\text{ng}$ към 0,18 $\mu\text{g}/\text{ng}$.

Индексът на процентно трансфериново насищане към хепсидин се изразява в % към μg . Той се използва при отдиференциране на желязо-дефицитна анемия от анемия при възпаление (висок при ЖДА). Най-висок индекс на процентно насищане на трансферин и хепсидин (**%TSAT/хепсидин**) бе установен при пациенти с желязо-дефицитна анемия (11,66 %/ μg), което потвърждава ролята му при отдиференциране на ЖДА от анемия на възпаление. Разликата при този индекс между пациенти с ревматоиден артрит и желязо-дефицитна анемия и с ревматоиден артрит и анемия на хронично заболяване е 44,95 %/ μg към 0,18 %/ μg .

При проведено проучване е наблюдавана положителна корелация между нивата на хепсидин и параметрите, използвани за оценка активността на заболяването СУЕ ($r = 0.352$, $p < 0.01$), С-реактивен протеин ($r = 0.369$, $p < 0.01$) и DAS28 ($r = 0.289$, $p < 0.05$). Установена е и корелационна зависимост между серумните нива на хепсидин и феритин, но тя не е статистически значима както при предходни проучвания. При

проучване е установена отрицателна корелационна зависимост между нивата на хепсидин и желязо, които потвърждават предходни твърдения. При друго проведено проучване е установено, че серумните нива хепсидин при пациенти с различна анемия са статистически различни от висока към ниска концентрация в последователността анемия на хронично заболяване, анемия на хронична инфекция > анемия на хронично заболяване/желязо-дефицитна анемия. Значителна корелационна зависимост между хепсидин и трансферин се наблюдава при пациенти с анемия на хронично заболяване + желязо-дефицитна анемия. Всички други корелации между хепсидиновите нива и параметрите на обмяна на желязо не са статистически значими при пациентите с АХЗ и комбинацията АХЗ/ЖДА. Важно е да се отбележи, че пациентите в това проучване са групирани според гранична стойност от 1,5 mg/ng на индекса на разтворими трансферинови рецептори към феритин. При пациентите, включени в това проучване, серумните нива на хепсидин не могат да отдиференцират наличието на едновременен недостиг на желязо, за разлика от друго, по-мощно проведено изследване.

6. Диагностична специфичност и чувствителност на серумния хепсидин при различни патологични състояния

С помощта на няколко статистически метода бяха определени прагови стойности на хепсидин и стойности на диагностична надеждност и ефективност при отграничаване на изследваните групи от референтната.

Доказа се, че статистически значими прагови стойности на хепсидина могат да бъдат установени за всяка една от изследваните групи.

При отграничаването на групите с ревматоиден артрит и анемия на хронично възпаление, хронично бъбречно заболяване с и на диализа се получават максимални стойности на критериите за валидизация – всички са равни на 100%. При останалите групи чувствителността и отрицателната предиктивна стойност също са 100%, но останалите критерии са с по-ниски величини.

След оценка на диагностичната надеждност бе установено, че показателят хепсидин дава отлични шансове за отдиференциране на разглежданите групи от референтната.

Площта под ROC кривата на хепсидина за определяне праговата му стойност при отграничаването на пациентите с β -таласемия майор от контролната група е 0,999, $p < 0,001$.

Площта под ROC кривата на хепсидина за определяне праговата му стойност при отграничаването на пациентите с ревматоиден артрит и желязо-дефицитна анемия от контролната група е 0,993, $p < 0,001$.

Площта под ROC кривата на хепсидина за определяне праговата му стойност при отграничаването на пациентите с ревматоиден артрит без анемия от контролната група е 0,566, $p = 0,302$.

Площта под ROC кривата на хепсидина за определяне праговата му стойност при отграничаването на пациентите с ревматоиден артрит и анемия на хронично възпаление, с хронично бъбречно заболяване стадии II до IV и с ХБЗ стадий V от контролната група е 1,000, $p < 0,001$.

Площта под ROC кривата на хепсидина за определяне праговата му стойност при отграничаването на пациентите с ЖДА от контролната група е 0,997, $p < 0,001$.

Получените резултати осигуряват много висока диагностична чувствителност и специфичност в процесна диагностициране на наущенията на хомеостазата на желязо при различни патологични състояния.

VI. Изводи

1. При верификация на основните аналитични характеристики на имуносорбетния ELISA метод се установи:

- невъзпроизводимостта на резултатите в серия и между отделните аналитични серии в три концентрационни области - референтната и клинично значимите са сравними с установените от производителя;
- много добра достоверност (аналитична откриваемост), която съответства на обявената от производителя;
- полученият от нас линеен обхват потвърждава данните на производителя и отговаря на международните изисквания; проследимостта на калибратора е до референтен метод.

2. Установи се стабилност на концентрацията на хепсидин при петкратно замразяване и размразяване на биологични материал.

3. Бяха определени референтни граници за обща група от Българската популация с имуносорбетен ELISA метод, като резултатите 3.052 – 37.750 $\mu\text{g/l}$ са сравними с международно проучване, получени с референтен метод.

4. Установиха се сигнификантно по-високи стойности на серумен хепсидин при мъже ($20,5 \pm 5,2 \mu\text{g/l}$), спрямо общата група жени ($12,7 \pm 5,2 \mu\text{g/l}$); както и при жени в менопауза ($15,2 \pm 5,5 \mu\text{g/l}$) спрямо жени в пременопауза ($10,2 \pm 2,7 \mu\text{g/l}$).

5. Сигнификантно по-високи серумни нива на хепсидин се наблюдават при пациенти с анемия и хронично бъбречно заболяване стадии от II до V; при пациенти с ревматоиден артрит и анемия на хронично възпаление.

6. Сигнификантно по-ниски серумни нива на хепсидин са определени при пациенти с желязо-дефицитна анемия; при пациенти с β -таласемия майор; при пациенти с ревматоиден артрит и желязо-дефицитна анемия.

7. Установиха се значими корелационни зависимости между:

- ✓ Хепсидин, феритин, брой еритроцити, С-реактивен протеин и хемоглобиново съдържание в ретикулоцити при пациенти с хронично бъбречно

заболяване; С-реактивен протеин и хепсидин при пациенти с ревматоиден артрит и анемия на хронично възпаление, което е свързано с етиологията на анемията; Хепсидин и феритин при пациенти с желязо-дефицитна анемия.

8. Серумните нива на хепсидин при пациенти с ревматоиден артрит предоставя възможност на клиницистите за правилен избор на терапевтичен подход при съпътстваща анемия. Позволява отдиференциране на пациенти с желязо-дефицитна анемия, анемия на хронично възпаление и комбинация от двете анемии.

9. Установихме нарастване на серумните нива на хепсидин успоредно с напредване на стадия на състоянието при пациенти с хронично бъбречно заболяване.

10. Най-висок индекс на разтворими трансферинови рецептори и феритин се установи при пациенти с желязо-дефицитна анемия и ревматоиден артрит с ЖДА, което потвърждава неговата роля в отдиференцирането на ЖДА от анемия на хронично възпаление.

11. Най-висок индекс на хепсидин и феритин се получи при пациенти с хронично бъбречно заболяване, което показва неговата значимост при отдиференциране на анемия на хронично възпаление от комбинацията АХЗ/ЖДА.

12. Най-висок индекс на процентно насищане на трансферин и хепсидин се намери при пациенти с желязо-дефицитна анемия, което се използва за отдиференциране на ЖДА от анемия на възпаление.

VII. Приноси

1. Верифициран е ELISA метод за количествено определяне на серумен хепсидин.
2. Верифицираният от нас метод е с доказани аналитични характеристики, позволяващи неговото навлизане в рутинната клинично-лабораторна практика в Република България.
3. Установиха се граници на референтната област за серумен хепсидин за Българската популация ($3.052 \mu\text{g/l} - 37.750 \mu\text{g/l}$).
4. Установиха се статистически значими разлики в серумните нива на хепсидин по пол и според менструалния цикъл при жени (мъже $20,5 \pm 5,2 \mu\text{g/l}$; жени в менопауза $15,2 \pm 5,5 \mu\text{g/l}$; жени в пременопауза $10,2 \pm 2,7 \mu\text{g/l}$).
5. Установиха се статистически значими разлики в серумните нива при патологични състояния и заболявания, протичащи с нарушена хомеостаза на желязото спрямо референтната група - по-високи серумни нива на хепсидин при пациенти с анемия и хронично бъбречно заболяване стадии от II до V стадии, с ревматоиден артрит и анемия на хронично възпаление; по-ниски серумни нива на хепсидин при пациенти с желязо-дефицитна анемия, β -таласемия майор, с ревматоиден артрит и желязо-дефицитна анемия.
6. Установиха се значими корелационни зависимости между: серумен хепсидин и феритин, С-реактивен протеин и хемоглобиново съдържание в ретикулоцити при пациенти с хронично бъбречно заболяване; между С-реактивен протеин и хепсидин при пациенти с ревматоиден артрит и анемия на хронично възпаление; между хепсидин и феритин при пациенти с ревматоиден артрит (с анемия на хронично възпаление и желязо-дефицитна анемия); между хепсидин и феритин при пациенти с желязо-дефицитна анемия.
7. Изработен е алгоритъм за диагностично поведение и терапевтичен подход при пациенти с ревматоиден артрит и съпътстваща анемия, който позволява отдиференциране на пациенти с желязо-дефицитна анемия, анемия на хронично възпаление и комбинация от двете анемии.

8. Установи се нарастване на серумните нива на хепсидин успоредно с напредване на стадия на заболяването при пациенти с хронично бъбречно заболяване.
9. Предложиха се индекси, които позволяват отдиференциране на желязо-дефицитна анемия от анемия на хронично възпаление и анемия на хронично възпаление от комбинацията АХЗ/ХДА.
10. Установиха се статистически значими прагови стойности на хепсидина, които доказват диагностичната специфичност и чувствителност на показателя за всяка една от изследваните групи.

Публикации, свързани с темата на дисертационния труд:

- 1.** **Манолов В**, Атанасова Б, Хаджиев Е, Цачев К. Хепсидин: нов диагностичен маркер при клинични нарушения в обмяната на желязото. Клинична и трансфузионна хематология vol. XLVIII 1-2 2012, 39 – 45.
- 2.** **Манолов В**, Атанасова Б, Велизарова М, Цачев К. Изследване на Хепсидин в биологични течности. Медицински Преглед vol. XLIX 2013, № 2, 41 – 46.
- 3.** Йонова Д, Възелов Е, **Манолов В**, Атанасова Б, Василев В, Цачев К. Диагностично значение на хепсидин при пациенти на хемодиализа. Нефрология, диализа и трансплантация г. 19, 2013 бр. 3, 22-27.
- 4.** **Manolov V**, Atanasova B, Vasilev V, Tzatchev K, Velizarova M. ELISA method for serum hepcidin quantification in Bulgarian population. Acta Medica Bulgarica 1/2014, 22-29.
- 5.** **Manolov V**, Atanasova B, Velizarova M, Vasilev V, Tzatchev K. Serum hepcidin levels in Bulgarian population. Clin Lab 2014, 60, 2001-2006.

Участия в научни проекти, свързани с темата на дисертационния труд:

1. Грант към Медицински Университет – София, Съвет по Медицинска Наука на тема „Разработване на имунохимичен ELISA метод за изследване на плазмените нива на Hepsidin – ключов регулатор на обмяната на желязото“ – Договор № 2/17.07.2012 г.

2. Грант към IFCC по Professional Scientific Exchange Programme (PSEP) на тема „Investigating on iron metabolism parameters in mouse models with altered iron status” в „Iron Metabolism Group“ на King’s College, Лондон, Великобритания с ръководител Проф. Andrew T. McKie за период м. 09. – м.12.2012 г.

3. Грант към Медицински Университет – София, Съвет по Медицинска Наука на тема „Hepsidin – нов кандидат биомаркер за железен статус при хронично бъбречно заболяване“ – Договор № 10/29.07.2013 г.

4. Грант към Медицински Университет – София, Съвет по Медицинска Наука на тема „Анемия при ревматоиден артрит и серумен хепсидин – нови диагностични възможности при избор на терапия“ – Договор № 67/2014 г. – (текущ)

Участия в конгреси и научни прояви, свързани с темата на дисертационния труд:

- 1. В. Манолов**, Б. Атанасова, К. Цачев, Е. Хаджиев. Хепсидин: нов диагностичен маркер при нарушения в хомеостазата на желязото. 9^{ти} Национален Конгрес по Клинична Лаборатория - 27.09-29.09.2012 г., к-кс „Боровец”
- V. Manolov**, В. Atanasova, V. Vasilev, K. Tzatchev. Developing of normal hepcidin levels in bulgarian population. 20^{ти} Конгрес на IFCC (Европейски Конгрес по Клинична Химия и Лабораторна Медицина) – 19.05-23.05.2013 г., Милано, Италия
- V. Manolov**, В. Atanasova, D. Yonova, E. Vazelov, V. Vasilev, K. Tzatchev. Heparidin levels in dialysis patients (preliminary study). 21^{ви} Конгрес на BCLF (Балкански Конгрес по Клинична Химия и Лабораторна Медицина) – 25.09.-28.09.2013 г., Будва, Монтенегро
- В. Манолов**, Б. Атанасова, К. Цачев. Хепсидин: нови възможности за диагностика и терапия при клинични нарушения в обмяната на желязото. Първа Конференция с Международно участие, 24.10.-26.10.2013 г., Девин
- Б. Атанасова, **В. Манолов**, М. Велизарова, К. Цачев. Heparidin - нов кандидат-биомаркер при клинични нарушения в обмяната на желязото. Първи Конгрес на Съюза на Българските Медицински Специалисти, 29.11.-30.11.2013 г., Пловдив
- V. Manolov**, В. Atanasova, V. Vasilev, D. Yonova, E. Vazelov, I. Trendafilov, B. Bogov, K. Tzatchev. The use of hepcidin for a precise diagnosis and treatment of iron deficiency anemia in patients on hemodialysis. The 2nd Asian Clinical Congress, 03.04.-05.04.2014, Kyoto, Japan
- М. Velizarova, **V. Manolov**, V. Vasilev, В. Atanasova, К. Tzatchev, В. Bogov, D. Yonova, E. Vazelov. Heparidin analysis in chronic kidney diseases. 22nd IFCC Worldlab 2014, 22nd BCLF Meeting; 22.06. – 26.06.2014, Istanbul, Turkey