

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

Д-р Виктор Емануилов Манолов

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

Дисертация
за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор”

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:
Доц. Д-р Милена Велизарова, дм
София, 2015 година

Съдържание

I.	Въведение	10
II.	Литературен обзор	17
1.	Хепсидин – синтез, кинетика, функция, регулация	17
1.1.	Хепсидин – синтез	17
1.2.	Хепсидин - кинетика	19
1.3.	Хепсидин – функция	19
1.4.	Хепсидин – регулация	21
1.4.1.	Регулация в зависимост от статуса на желязо	24
1.4.2.	Регулация в зависимост от еритропоезата	25
1.4.3.	Регулация от хипоксия	26
1.4.4.	Регулация от възпаление	27
1.4.5.	Взаимодействие между отделните регулаторни механизми	27
2.	Хепсидин – клинично значение	29
2.1.	Клинично значение при дефицит на хепсидин	29
2.1.1.	Наследствена хемохроматоза	29
2.1.2.	Анемии с натрупване на желязо	32
2.1.3.	Желязо-дефицитна анемия	32
2.1.4.	Придобити форми на не-хемохроматозно свръхобременяване с желязо	33
2.2.	Клинично значение при повишено ниво на хепсидин	34
2.2.1.	Желязо-рефрактерна желязо-дефицитна анемия	34
2.2.2.	Инфекции и възпалителни заболявания	36
2.2.3.	Анемия при хронични заболявания	37
2.2.4.	Бъбречни заболявания	41
2.2.4.1.	Бъбречна трансплантация и хепсидин	44
2.2.5.	Ревматоиден артрит	44
2.2.6.	Заболявания, свързани със затлъстяване	48
2.2.7.	Сърдечно-съдови заболявания	48
2.2.8.	Злокачествени заболявания	49

2.2.9. Хепсидин и спортна медицина	50
2.2.10. Бременност и гинекологични заболявания	51
2.2.11. Заболявания на стомашно-чревният тракт	51
3. Хепсидин – методи за определяне	54
4. Хепсидин модулиращи агенти	58
4.1. Агонисти на хепсидина	58
4.2. Антагонисти на хепсидина	59
5. Изработване на референтни граници	61
III. Цел и задачи	64
IV. Материал	65
1. Проучвания при здрави лица	65
2. Проучвания при болни с различни патологични състояния	68
V. Методи	74
1. Методи за определяне на клиничко-химични показатели	74
1.1. Определяне на глюкоза	74
1.2. Определяне на креатинин	75
1.3. Определяне на аспартат аминотрансфераза	77
1.4. Определяне на аланин аминотрансфераза	78
1.5. Определяне на трансферин	79
1.6. Определяне на С-реактивен протеин	79
1.7. Определяне на феритин	80
1.8. Определяне на желязо	81
1.9. Определяне на ТЖСК	82
1.10. Определяне на процентно трансфериново насищане	82
1.11. Изчислени показатели	82
1.12. Определяне на разтворими трансферинови рецептори	83
2. Методи за определяне на хематологични показатели	84
1.1. Определяне на хемоглобин	84
1.2. Определяне на еритроцити	84
1.3. Определяне на ретикулоцити	85
3. Метод за определяне на хепсидин	86

4. Методи на статистически анализ	90
1.1. При определяне на референтна област	90
1.2. Анализ на клиничния материал	92
1.3. Клинично и диагностично значение на стойности на хепсидин	92
VI. Резултати	96
1. Валидиране на ELISA метод за количествено определяне на серумен хепсидин	96
1.1. Построяване на калибрационна крива	96
1.2. Определяне на граница на откриване на метода	97
1.3. Определяне на LLOQ, MPQ, ULOQ на метода	97
1.4. Определяне на достоверността на метода	98
1.5. Определяне на невъзпроизводимост в серия на метода	99
1.6. Определяне на невъзпроизводимост на метода между отделни аналитични серии	99
1.7. Определяне на стабилността на биологичния материал	100
1.8. Проучване на зависимостта между серумните нива на хепсидин и времето на вземане на биологичен материал	101
2. Определяне на граници на референтна област на серумен хепсидин за българската популация	103
3. Определяне на серумната концентрация на хепсидин при различни заболявания	107
1.1. Серумни нива на хепсидин	107
1.2. Клинико-химични и хематологични показатели	108
1.3. Серумен хепсидин при пациенти с хронично бъбречно заболяване с и без диализа	111
1.4. Серумен хепсидин при пациенти с ревматоиден артрит	112
4. Определяне на корелационни зависимости между хепсидин и различни клинико-химични показатели при контролната група и отделните заболявания	114
1.1. Корелационни зависимости между хепсидин и феритин	114
1.2. Корелационни зависимости между хепсидин и съдържание	117

на хемоглобин в ретикулоцити	
1.3. Корелационни зависимости между хепсидин и процентно трансфериново насищане	120
1.4. Корелационни зависимости между хепсидин и С-реактивен протеин	123
1.5. Корелационни зависимости между хепсидин и индекс на разтворими трансферинови рецептори	127
1.6. Корелационни зависимости между хепсидин и други показатели при различни патологични състояния	129
1.7. Изчислени показатели	133
1.8. Диагностична специфичност и чувствителност на серумен хепсидин при различни патологични състояния	137
VII. Обсъждане	144
VIII. Изводи	165
IX. Приноси	167
X. Книгопис	169
XI. Приложения	188

Използвани съкращения

- АЛАТ (ALT) – аланин аминотрансфераза
АСАТ (AST) – аспартат аминотрансфераза
ВЛКК – вътрелабораторен качествен контрол
ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина
ЕПО – еритропоетин
ЕСП – еритропоеза стимулиращи препарати
ЖРЖДА – желязо-рефрактерна желязо-дефицитна анемия
ЖСК – желязо-свързващ капацитет
ИО – истински отрицателен
ИП – истински положителен
ЛО – лъжливо отрицателен
ЛП – лъжливо положителен
РНК – рибонуклеинова киселина
ССЗ – сърдечно-съдови заболявания
ТЖСК – тотален желязо-свързващ капацитет
ХБЗ – хронично бъбречно заболяване
ACD (АХЗ) – анемия на хроничното заболяване
Alk-2 - Activin A receptor, type I
ALAS2 - делта-амино-левулинова киселина-синтаза-2
BMI – body mass index
BMP-6 – костен морфогенен протеин
BMPR – рецептор на костен морфогенен протеин
C/EBP α - stress-inducible transcription factors CCAAT-enhancer-binding protein
CHOP - C/EBP-homologous protein
CKD-EPI – Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
CLSI – Институт за клинични и лабораторни стандарти
Ср - церулоплазмин
CREBH - транскрипторен фактор cAMP-Response-Element-Binding-protein-H
CRP – С-реактивен протеин

Използвани съкращения

CV – коефициент на вариация

CVD – сърдечно-съдови заболявания

Da – Далтон(a)

DAS28 – disease activity score

Dcytb – дуоденална цитохромоксидаза b

DMT1 - дивалентен метален транспортер 1

EDTA-K2 – етилен-диамин тетраацетат – калиева сол

eGFR – изчислена гломерулна филтрация; estimated glomerular filtration rate

ELISA ((c)ELISA)– (конкурентен) ензимно-свързан имуносорбентен анализ

ERK - Extracellular signal-regulated kinases

GDF15 – growth differentiation factor-15

H⁺ - водороден протон

HAMP - hepcidin anti-microbial peptide gene

Hb (HGB) - хемоглобин

HdP – пациенти на хемодиализа

HFE – ген на хемохроматоза

HIF1 - hypoxia-inducible factor 1

HJV - хемоювелин

HO – хидроксилна група

HRP – horseradish peroxidase

IC-TOF-MS – immunocapture time-of-flight mass-spectrometry

IDA (ЖДА) – желязо-дефицитна анемия

IFCC – Международна Федерция по Клинична Химия

IL-1 – интерлевкин-1

IL-6 – интерлевкин-6

IL-6R – рецептор на интерлевкин-6

IRIDA – iron-resistance iron-deficiency anemia, желязо-резистентна желязо-дефицитна анемия

(i)sTfr – индекс на трансфериново насищане

Използвани съкращения

JAK – Janus Kinase

LC-MS/MS – liquid chromatography tandem – MS techniques

Li-Heparin – литиев хепарин

LLOQ – low level of quantification, ниско ниво на количествено определяне

MALDI-TOF-MS – matrix assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass-spectrometry

MAPK - Mitogen-activated protein kinases

MCH – middle cell hemoglobin; средно хемоглобиново съдържание

MCHC – middle cell hemoglobin concentration; средна хемоглобинова концентрация

MCV – middle cell volume; среден обем на клетки

MDRD – Modification of Diet in Renal Disease

mg - милиграм

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

NGAL - neutrophil gelatinase-associated lipocalin, неутрофилен гелатиназа-асоцииран липокалин

pO₂ – парциално налягане на въглероден диоксид

Q-TOF LC-MS – quadrupole time-of-flight mass spectrometry

RBC – червени кръвни клетки

Ret-Hgb – хемоглобин в ретикулоцити

RETIC – ретикулоцити

RIA – competitive radio-immunoassay

RNA – рибонуклеинова киселина

SD – стандартно отклонение

SDS – натриев додецил сулфат

SELDI-TOF-MS – surface enhanced laser desorption / ionization time-of-flight mass-spectrometry

SF3B1 - spliceosomeassociated фактор 3B1

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

SMAD - mothers against decapentaplegic homologue (Drosophila)

Използвани съкращения

STAT3 - signal transducer and activator of transcription-3

STEAP3 - Six-Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate 3

Tf-Fe₂ – комплекс трансферин - желязо

TFR1, TFR2 – разтворими трансферинови рецептори

TGF- β - Transforming growth factor beta

TMPRSS6 – transmembrane protease, serine 6

TNF- α – тумор некротичен фактор- α

TRSF (Tf) – трансферин

TSAT – процентно трансфериново насищане

TWSG1 - twisted gastrulation protein homolog-1

ULOQ – upper level of quantification, високо ниво на количествено определяне

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

WHO – World Health Organization

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.

Желязото е химичен елемент, метал, с атомен номер 26 и символ „Fe“. Той е част от група 8 и период 4 на периодичната система, поради което се класифицира като преходен метал.

Желязото е шестият най-разпространен химичен елемент във Вселената (McDonald I. И сътр., 2010). То се образува при последния екзотермичен етап на звездния нуклеосинтез, при процеса на силициево изгаряне в масивните звезди. То е най-тежкият устойчив елемент, който се образува по този начин.

На желязото се падат около 5% от количеството вещество в земната кора, но за ядрото, което включва 35% от масата на планетата се смята, че е изградено предимно от сплав на желязо и никел. Така желязото е най-разпространеният елемент на Земята, но едва четвъртият в земната кора (Morgan John W и сътр., 1980).

Желязото играе важна роля в живота на практически всички организми, с изключение на някои бактерии.

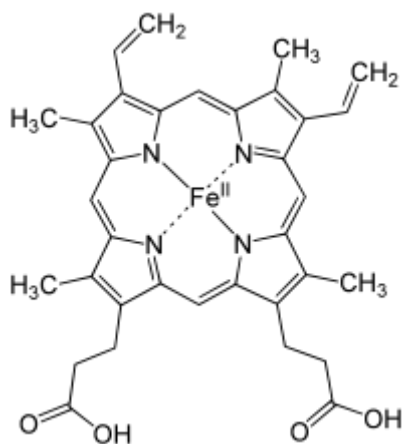
В човешкия организъм желязото влиза в състава на много ензими и протеини, участващи в окислително-редукционните реакции, в процеса на дишането, тъй като то влиза в състава на хемоглобина.

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.

Най-важната група на желязо-свързващи протеини съдържат молекули хем, като всяка от тях съдържа желязо в центъра си.



Фигура 1. Структура на хема

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.

Желязо-сърните протеини са друга важна група на желязо-съдържащи протеини . Някои от тези протеини също са важни части на окислително фосфорилиране. Хората също използват желязо в хемоглобина на червените кръвни клетки, за да се транспортира кислород от белите дробове към тъканите. Желязото е основен компонент на миоглобина, служещ за съхранение и дифузия на кислород в мускулните клетки.

Човешкото тяло се нуждае от желязо за пренос на кислород. Той е необходим за синтез и съществуване на почти всички клетки в организма (зрелите еритроцити са едно изключение). Човешкият организъм стриктно регулира усвояването на желязо и неговото рециклиране.

В отговор на системна бактериална инфекция, имунната система инициира важен процес. За оцеляването на бактериите е необходимо желязо от заобикалящата ги среда. Болестотворните бактерии набавят необходимото им желязо по различни начини, включително освобождаване на желязо-свързващи молекули, наречени сидерофори и след това ги реабсорбират за възстановяване на желязото. Има някои изключения, като Туберкулозния бактерий, който пребивава в макрофагите в богата на желязо среда и *Borrelia burgdorferi*, която оползотворява манган вместо желязо. Хората с повишени нива на желязо, като тези с хемохроматоза, са по-податливи на някои бактериални инфекции.

Въпреки, че този механизъм е елегантен отговор на краткосрочна бактериална инфекция, тя може да предизвика проблеми, ако възпалението продължава по-дълго. Тъй като черния дроб произвежда хепсидин в отговор на възпалителните цитокини, неговите нива могат да се увеличат в резултат на не-бактериален произход на възпалението, като вирусна инфекция, рак, автоимунни заболявания или други хронични заболявания. Когато това се случи, поглъщането на желязо изглежда е основната причина за синдрома на анемия при хронични заболявания, при които няма достатъчно желязо, необходимо за синтез на хемоглобин, съдържащ се в червените кръвни клетки.

Около 70% от желязото в кръвта е свързано с хемоглобина на червените кръвни клетки. Останалото количество желязо е свързано с други протеини – трансферин в кръвта и феритин в костния мозък или се съхранява в други тъкани на организма. След смъртта на червените кръвни клетки се освобождава желязо, което се свързва с трансферин, след което се пренася до костния мозък и до други органи като черния дроб и слезката. В костния мозък желязото се съхранява и се използва за нуждите за производство на червени кръвни клетки.

Източник на желязо е храната – най-вече месото, черния дроб, яйцата, рибата, зеленолистни зеленчуци. Легендата, че спанакът съдържа много желязо, се ражда след печатна грешка. При описване резултатите от направено през 1870 г. немско изследване на съдържанието на желязо в различни храни, десетичната запетая в стойността за спанак била отместена по грешка надясно, като в резултат била публикувана десет пъти по-висока стойност. Грешката била поправена през 1937 г., но в

масовото съзнание вече се бил утвърдил митът за богатия на желязо спанак. Организма има нужда от по-голямо количество желязо по време на растеж, бременност, кърмене, след кръвозагуба.

Обикновено здравите хора си набавят необходимото количество желязо от храната. Мъжете обикновено имат запас от желязо в тялото, който, ако не приемат желязо, може да им стигне за няколко години. Ето защо мъжете рядко развиват анемия. За разлика от тях жените губят голямо количество кръв при менструалното кървене по време на месечен цикъл, по време на бременност или кърмене. Ето защо жените страдат по-често от дефицит на желязо и имат необходимост да приемат добавки, съдържащи желязо. Дефицитът на желязо при жени след менопауза и мъже може да се дължи на хронично кървене от стомашно-чревния тракт – язва на стомах или дванадесетопръстник, рак на дебелото черво.

Абсорбцията на желязо в храната е променлив и динамичен процес. Количеството на абсорбирано в сравнение с количеството погълнато желязо обикновено е по-ниско, но може да варира от 5% до 35% в зависимост от обстоятелствата и вида на желязото. Ефективността, с която се абсорбира желязо варира в зависимост от източника. Абсорбцията на желязо от храната е под формата на железни соли (както е в повечето добавки) и варира до известна степен в зависимост от нуждите на организма от желязо; обикновено е между 10% и 20% от приема на желязо. Абсорбцията на желязо от животински продукти и някои растителни продукти е под формата на хемово желязо, и е по-ефективно, което позволява да се абсорбират от 15% до 35% от приема. Хемовото желязо при животните е от кръв и хем-съдържащите протеини в месото и митохондриите, а в растенията, хемовото желязо се съдържа в митохондриите във всички клетки, които използват кислород за дишане.

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 Fe²⁺ 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.

Докато Dcytb е уникален транспортер на желязо в дванадесетопръстника, феропортина се открива със всички клетки, които съхраняват желязо. По този начин регулирането на феропортиновата функция е основния начин за регулиране на количеството на желязо в кръвообращението на организма. Абсорбция на желязо от храната се увеличава в присъствието на витамин С и намалява от излишния калций, цинк или магнезий.

Клинично намаленото ниво на желязо в организма се изразява с настъпване на желязо-дефицитна анемия. Тя се среща при около 10% от жените в детеродна възраст. Това е най-честата анемия: 80% от всички анемии, като в 80% от случаите са засегнати жени (те имат по-голяма потребност поради менструация, бременност или лактация).

Етиологично желязо-дефицитната анемия може да се дължи на:

- Недостатъчен внос (кърмачета, малки деца, вегетарианци)
- Недостатъчна резорбция (състояние след стомашна резекция, малабсорбционен синдром)
- Повишена потребност (по време на растеж, бременност и кърмене), а също при лечение на Vitamin B12-дефицитна анемия с Vitamin B12
- Най-често железният дефицит се дължи на загуба на желязо в резултат на хронични кръвотечения (80% от случаите). Те могат да бъдат:

- Кръвоизливи от храносмилателния тракт: улцерации, ерозивни гастрити, кръвотечения от варици на хранопровода, карциноми, дивертикулоза на колона, хемороиди, тенийни инфекции и др.
- Генитални кръвотечения при жените
- Кръвозагуби от други органи (урогенитален тракт, орофаринкс, нос, бял дроб)
- Оперативно или травматично обусловени кръвотечения
- Кръвозагуби при хемодиализа и при често вземане на кръв, кръводаряване

Недоимъкът на желязо в организма се развива постепенно и преминава през следните стадии:

1. Прелатентен железен-дефицит: налице е недостиг на желязо в депата
2. Латентен железен-дефицит: това е стадий на желязодефицитна еритропоеза без анемия: концентрацията на желязо в костния мозък и серума е понижена

3. Манифестна анемия: проявява се като желязонедоимъчна анемия
Най-честите лабораторни данни при желязо-дефицитна анемия са:

1. При прелатентен недоимък на желязо (дефицит на депата):
 - Серумният феритин и съдържанието на желязо в костния мозък са понижени
 - Абсорбцията на желязо е повишена
2. При латентен железен недоимък (желязодефицитна еритропоеза):
 - Серумното желязо е понижено
 - Сидеробластите в костния мозък са понижени
 - Трансферинът е повишен
3. При манифестен железен дефицит = желязодефицитна анемия:
 - Хемоглобинът е понижен
 - Еритроцитите са понижени
 - Хематокритът е понижен

Желязо-дефицитните анемии водят първично до понижаване производството на хемоглобин и повлияват по-слабо това на еритроцитите. При намален хемоглобин броят на еритроцитите може да остане на долната граница на нормата.

Диагнозата на желязо-дефицитната анемия се поставя чрез:

1. Подробна анамнеза, клинична картина, лабораторни изследвания (ниски нива на хемоглобин и еритроцити, намалени серумни концентрации на желязо и феритин, увеличаване на трансферина)

2. Изясняване на причината: при поставянето на диагноза „железен дефицит (анемия)“ винаги възниква въпросът каква е причината (най-често кръвотечение!).

Следва търсенето на източника на кървене:

- Изключване на причина от гастроинтестиналния тракт: тест за окултни кръвоизливи в изпражненията, гастроинтестинална диагностика
- Изключване на причина от страна на урогениталните органи (при жените включително и гинекологично изследване)
- Обмисляне на други възможни причини за кръвотечение, напр. кървене от венците, носа, големи хематоми и др.

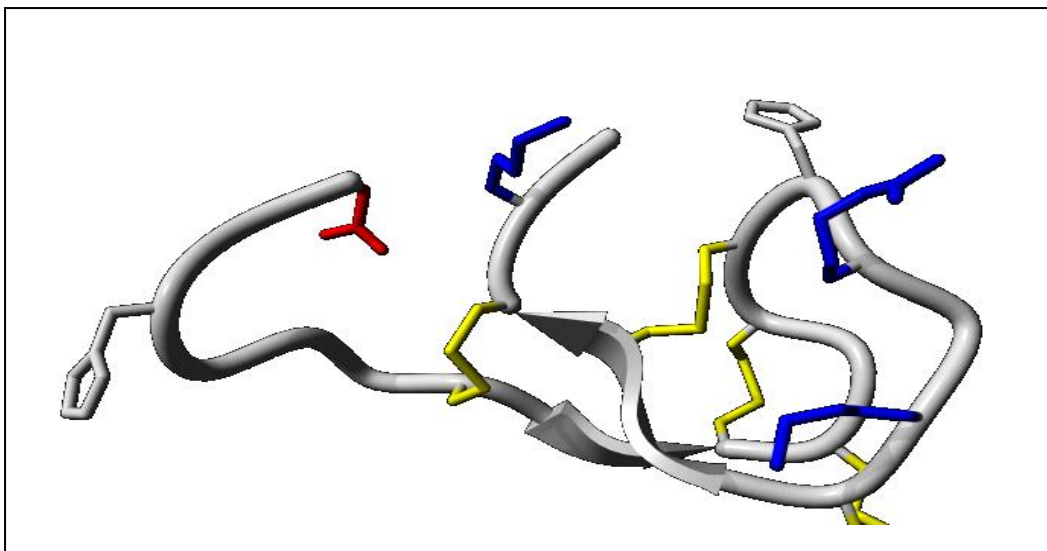
II. Литературен обзор

1. Хепсидин- синтез, кинетика, функция, регулация

Системната хомеостаза на желязото включва: 1. строг контрол на абсорбцията на елемента в чревната лигавица; 2. ефективно използване за нуждите на еритропоезата; 3. ефективно използване от секвестрираните еритроцити; 4. съхранение в хепатоцитите и макрофагите. Използването на желязото в еритрона зависи преди всичко от ефективността на усвояването на елемента чрез трансфериновия цикъл в еритроидните прекурсори. Останалите три важни аспекта на хомеостазата (абсорбция, рециклиране и складиране) се контролират системно и координирано от хепсидина - пептид, синтезиран в черния дроб, който има главната отговорност да модулира наличността на желязо в зависимост от нуждите на организма.

1.1. Хепсидин - синтез

Хепсидинът се синтезира от хепатоцитите като 25-аминокиселинен пептид с молекулно тегло 2789,4 Da, който се секретира в кръвообръщението (Nancy S.Andrews, 2008). Последващи трансформации в тази структура водят до получаването на две по-малки изоформи от 22- и 20- аминокиселинни остатъка. Тези хепсидинови пептиди имат четири вътремолекулни дисулфидни моста (Фиг. 2) (Jordan JB и сътр., 2009). За сега все още малко се знае за произхода на тези по-малки изоформи, но съществуващите данни предполагат участие на панкреаса в този процес (Joyce J.C.Kroot и сътр., 2011). При физиологични условия, двете по-малки изформи присъстват предимно в урината, но не се срещат в серума или се откриват в много ниски концентрации. Интересно е, че малките изоформи имат подчертано присъствие в серума на пациенти със заболявания, при които се наблюдава повишение на изоформата хепсидин-25 (инфаркт на миокарда, сепсис, анемия при хронични заболявания, хронична бъбречна недостатъчност (Kemna EH и сътр., 2007; Kroot JJС и сътр., 2010; Peters HP и сътр., 2010; Suzuki H и сътр., 2009; Tomosugi N и сътр., 2006).



Фигура 2. Молекулна структура на хепсидина предложена от Jordan и сътр., показваща β -пространството, пептидната основа, дисулфидните мостове (1-8, 2-4, 3-6 и 5-7), положително заредени остатъци на аргинин и лизин и отрицателно зареден остатък на аспарагинова киселина.

Съвременни проучвания показват, че освен в хепатоцитите, хепсидинът е представен в по-ниски концентрации и в други клетки: бъбречни тубули, ретина, моноцити, неутрофили, кардиомиоцити, алвеоларни клетки, β -клетки на панкреаса. Тези по-ниски нива нямат значим принос към системните концентрации в кръвообръщението, но те могат да упражняват локални ефекти върху секретиралите тъкани: защита на съседни клетки от развитие на желязен дефицит, предотвратяване на екстрацелуларен оксидативен стрес, възможно влияние върху отговора при възпаление и/или изчерпване на извънклетъчното желязо, което е достъпно за външни патогени.

Хепсидин-25 е ключов регулатор на абсорбцията на желязото и на освобождаването на елемента от клетките. Той блокира действието на феропортина, който е експортер на желязо от макрофагите, хепатоцитите и дуоденалните ентероцити. Хепсидинът се прикрепва към феропортина върху клетъчната мембрана и отключва разграждането на експортера в лизозомите (Nancy C.Andrews, 2008). Този регулаторен механизъм води до повишено отлагане на желязо в клетъчните депа, до намалена абсорбция на желязо в чревната лигавица и до ниски концентрации на елемента в кръвообръщението.

Хепсидинът може да участва и в защитата на организма срещу външни патогени. Първоначално хепсидинът е бил идентифициран като антимикробен пептид. Бактерицидните ефекти обаче предполагат по-високи концентрации от тези, наблюдавани в кръвообръщанието. Подобни високи концентрации могат да бъдат постигнати локално например във фагозомите или в инфектирани макрофаги (Sow FB и сътр., 2007). Хепсидинът може индиректно да стимулира и защитата срещу външни патогени като намалява плазмените нива на желязото. Проучванията показват и роля на хепсидина в острата фаза на възпалителния процес, причинен от бактериални инфекции (De Domenico I и сътр., 2010).

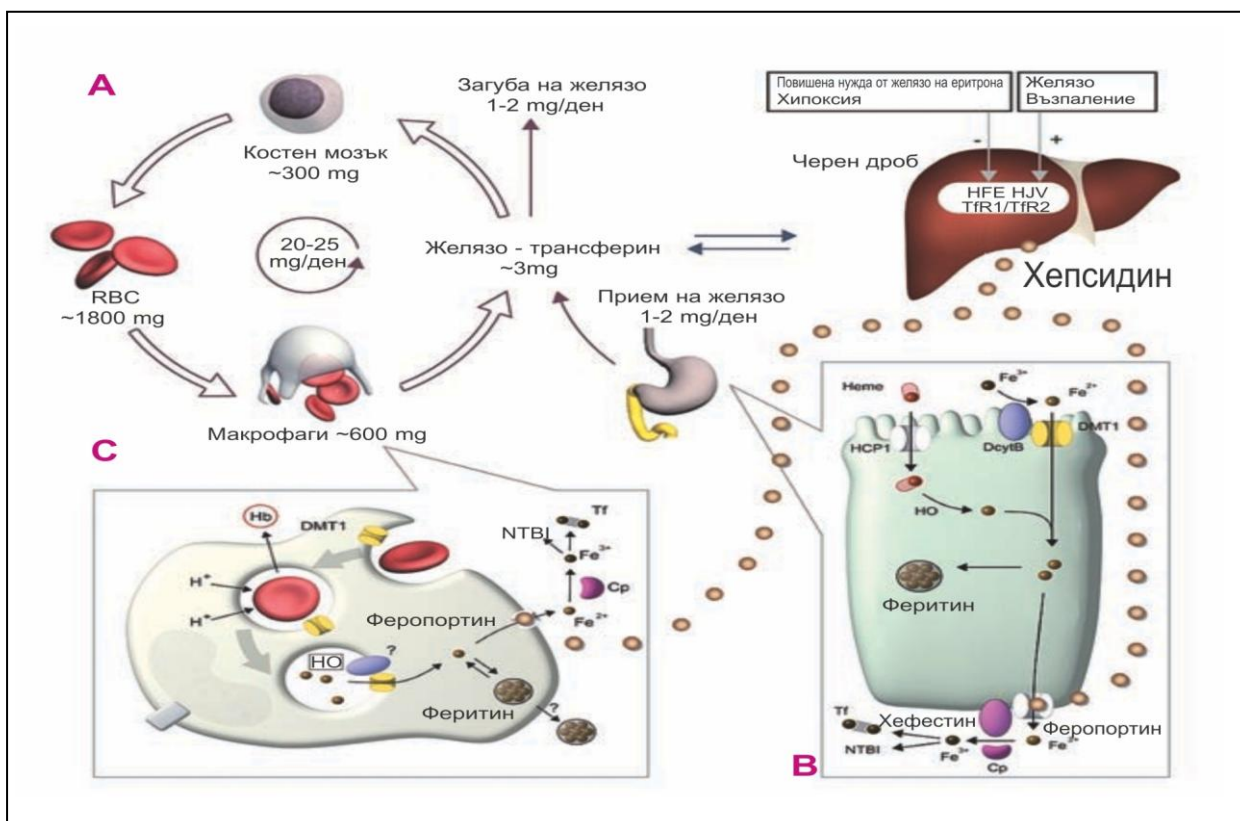
1.2. Хепсидин - кинетика

Регулирането на серумните нива на хепсидина се осъществява чрез модулиране на синтеза му в черния дроб (Nancy C.Andrews, 2008). В същност кинетиката на пептида включва транспорт в кръвообръщението както в свободна форма, така и в свързана предимно с α_2 -макроглобулин структура, филтрация през бъбречната гломерулна мембрана на свободната фракция, тубулна реабсорбция, тубулна секреция и екскреция. Липсата на реабсорбция в тубулите може да играе важна роля при редица нарушения в обмяната на желязото, които се свързват с тубулна дисфункция и повишени концентрации на хепсидин в урината – например при възпаление, свръх-обременяване с желязо и малария. При интерпретация на уринната концентрация на хепсидина като отражение на серумната му концентрация би трябвало да се имат предвид и евентуална тубулна секреция и нарушена тубулна реабсорбция (Joусе J.C.Kroot и сътр., 2011; De Domenico I и сътр., 2010). При всички случаи интерпретацията на уринните и серумни нива на хепсидина изискват комплексен подход с поглед както върху механизмите, регулиращи синтезата му по отношение на желязото, така и върху процесите, протичащи в бъбреците.

1.3. Хепсидин – функция

Счита се, че хепсидин-25 е главен регулатор на абсорбцията на желязо, приемано с храната и неговото клетъчно освобождаване. Тази си роля той осъществява с помощта на феропортина, главен експортер на желязото в мембраната на

макрофагите, хепатоцитите и базолатералните части на ентероцитите (Nemeth E и сътр., 2004; De Domenico I и сътр., 2005; Delaby C и сътр., 2005; Ramey G и сътр., 2010). В резултат на феропортиновото действие се повишават вътреклетъчните нива на желязо, намалява абсорбцията му от храната, понижава се и серумната му концентрация (Фиг. 3)



Фигура 3. Прием и обмен на желязо. (предложена от Swinkels и сътр., 2006)

А. По-голямата част от усвоеното желязо се рециклира в организма след секвестрация на еритроцитите от макрофагите и се връща обратно в костния мозък за включване в прекурсорите на червените кръвни клетки.

В. Черният дроб и ретикулоендотелните макрофаги представляват функционалните депа на желязо в организма. Общото ниво на желязо в организма може да се регулира само чрез абсорбция, докато загубата на желязо се осъществява само по пасивен начин, чрез олющване на клетките от кожата, мукозните клетки и при кръвозагуба. Това води до приблизително усвояване и загуба на желязо от около 1-2 тг на ден.

С. Черният дроб, секретирайки хепсидин регулира плазмените нива на желязо чрез подтискане на екскрецията му от ентероцитите и макрофагите с помощта на феропортина. Повишената секреция на хепсидин води до намаляване на плазмените концентрации на желязо. Експресията на хепсидин се регулира от нивото на желязо в организма, от възпаление, нужда на еритропоезата и хипоксия чрез механизми, въвличащи гените на HFE, Tfr2 и HJV (Cuijpers MLu сътр., 2010; Janssen MC и сътр., 2009).

1.4. Хепсидин – регулация

Различни физиологични и патологични процеси регулират синтеза на хепсидина (Hentze MW и сътр., 2010). Състояния, при които има повишени нужди от желязо (особено при стимулирана еритропоеза), предизвикват намаление в синтеза на хепсидин в черния дроб. Подобни състояния са дефицит на желязо, хипоксия, анемия, и състояния със стимулирана еритропоетична активност. Намалението на хепсидина води до освобождаване на желязо от депата и повишение на абсорбцията на желязо от храната. От друга страна, инфекцията и възпалението повишават синтеза на хепсидин, а това води до недостиг на желязо за нуждите на еритропоезата. Повишеният хепсидин е отговорен за ограничаването на желязо в макрофагите, за намаляването на абсорбцията в чревната лигавица и за ниските серумни нива на желязо при анемия при хронични заболявания.

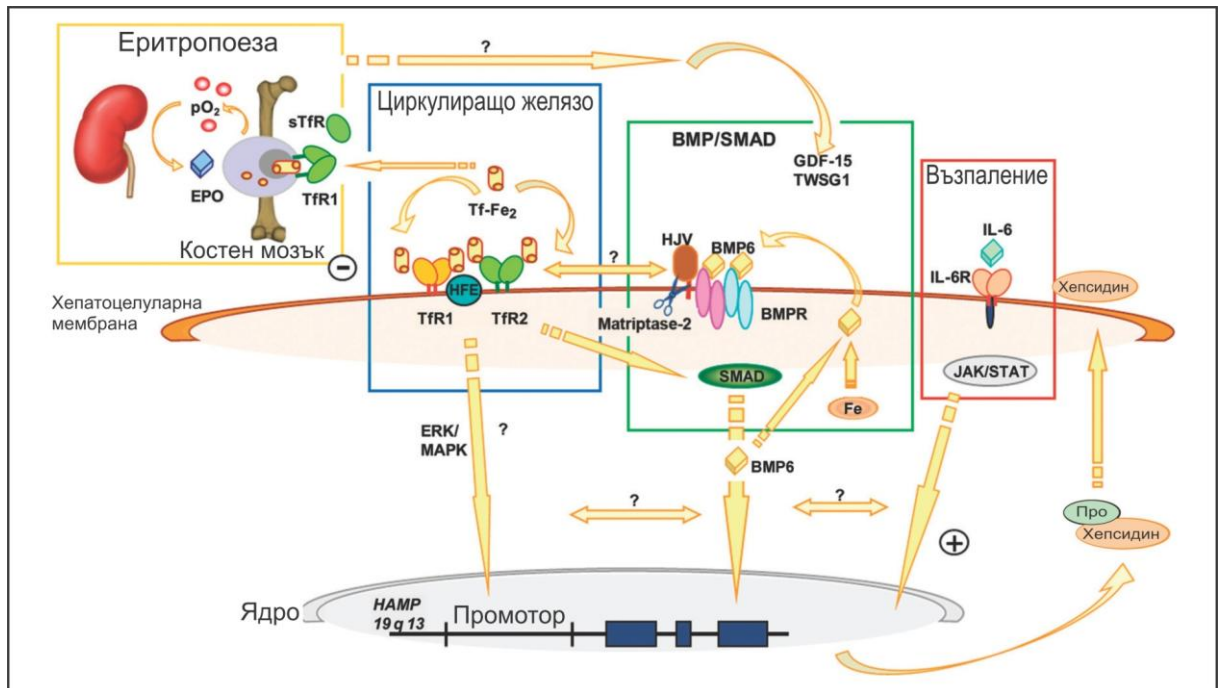
Основните регулаторни механизми, които повлияват експресията на хепсидин, не функционират независимо един от друг, защото различни потенциални възможности предполагат взаимно повлияване между тях.

Серумните концентрации на хепсидина се определят в различна степен от отделните регулаторни фактори. Предложен е алгоритъм, който би могъл да очертае относителната значимост на тези регулатори при пациенти с нарушения в обмяната на желязото и да предскаже относителното ниво на хепсидина на базата на известни клинично-химични параметри (С-реактивен протеин, трансфериново насищане и разтворими трансферинови рецептори), отразяващи степента на възпаление,

концентрацията на серумно желязо и еритропоетичните регулаторни пътища. Този алгоритъм хвърля светлина върху взаимното повлияване на регулаторните пътища, като показва, че инхибирането на хепсидина от еритропоезата пречи на стимулирането му от желязото и, че възпалението силно повишава хепсидина независимо от статуса на желязото и еритропоетичната активност. Нуждите от желязо за еритропоезата намаляват хепсидиновата индукция, дължаща се на отговора при възпаление (Joyce J.C.Kroot и сътр., 2011; Lee PL & Beutler E, 2009). Стимулираната и/или не-ефективна еритропоеза намалява индукцията на хепсидин, която зависи от повишеното желязо в депата. Все още не е изяснено как дефектите в пътя на хемохроматозен железен протеин/трансферинов рецептор 2 повлияват стимулираната регулация, която се дължи на възпаление. Очаква се в бъдеще нови, добре обмислени проучвания да доведат до по-детайлно разбиране на регулацията на хепсидина при различни нарушения в обмяната на желязото.

Функционалните сигнали чрез които се осъществява регулирането на хепсидиновата синтеза са добре проучени. Те могат да се систематизират в четири основни регулаторни пътя (Фиг. 4):

- а) регулация от статуса на желязото,
- б) регулация от страна на еритропоезата,
- в) регулация яот хипоксия,
- г) регулация от възпаление.



Фигура 4. Молекулни и функционални механизми на чернодробната синтеза на хепсидин. (предложена от Кетпа и сътр., 2008).

Представени са молекулните пътища HFE/TfR2, BMP/SMAD и JAK/STAT. Този модел предлага и два сигнала от страна на желязото за контрол върху секрецията на хепсидин – първият медиран от вътреклетъчните запаси на желязо и другият от циркулиращото желязо в организма (свързано с трансферин). Чернодробните депозита на желязо повишават екскрецията на костния морфогенетичен протеин 6 (BMP-6), който действа като автокринен фактор чрез взаимодействие с повърхностните BMP рецептори. Хемоювелинът (HJV) е BMP ко-рецептор, който увеличава способността на BMP за свързване. Последващото активиране на вътреклетъчните SMAD протеини предизвикват сигнал, повишаващ хепсидиновата транскрипция. Молекулата на HJV е подложена на разцепване от фурина, което се регулира от нивото на желязо и хипоксия, за да се формира разтворим компонент (sHJV) (Silvestri L и сътр., 2008). Полученият sHJV действа като антагонист на BMP-6 индуцирана хепсидинова синтеза. В случаи на ниско ниво на желязо, свързаният към мембраната HJV се разцепва от матриптаза-2, като по този начин води до отслабване на сигнала от BMP-6. Извънклетъчният трансферин (Tf-Fe₂), свързан с желязо медира вторичен сигнал от желязото. Тук комплексът Tf-Fe₂ замества HFE

от TfR1. След това HFE се освобождава, за да взаимодейства с TfR2. Комплексът HFE-TfR2 активира хепсидиновата транскрипция чрез BMP/SMAD сигнал. Някои проучвания показват участието на сигнал от чернодробните ERK/MAPK в хепсидиновата регулация от желязото чрез TfR2 и/или HFE (Hentze MW и сътр., 2010). Еритропоезата се контролира отчасти от еритропоетиновата (EPO) синтеза в бъбреците, като взаимодействието с черния дроб става чрез протеините GDF15 и TWSG1, които подтискат сигнала BMP/SMAD за хепсидин. Възпалителни стимули като IL-6 индуцират хепсидиновата синтеза чрез пътя на JAK/STAT (Hentze MW и сътр., 2010).

1.4.1. Регулация в зависимост от статуса на желязо

Депа на желязо в черния дроб и циркулиращите комплекси желязо-трансферин (Tf-Fe₂) осигуряват отделни сигнали, които влияят на хепатоцитната хепсидинова експресия (Hentze MW и сътр., 2010; Ramos E и сътр., 2011; Corradini E и сътр., 2011). Циркулиращият трансферин участва чрез хепатоцелуларен комплекс, включващ трансферинов рецептор-1 (TfR1), TfR2 и протеина на желязната хемохроматоза (HFE). Нарушения в TfR2 и HFE водят до намаляване на хепсидиновата концентрация чрез извънклетъчен сигнал от кинази: 1) ERK/MAPK и/или 2) BMP/SMAD (Фиг. 4). Вътреклетъчните депа на желязо комуникират с хесидина чрез BMP6, който има паракринна или аутокринна функция. Тези извънклетъчни сигнални молекули влияят на хепатоцелуларните BMP рецептори, като активират вътреклетъчния SMAD сигнален път и повишават хепсидиновата транскрипция. Хемоувелинът (HJV), който е ко-рецептор на BMP (Babitt JL и сътр., 2006), е решаващ за секрецията на хепсидин поради факта, че редица регулаторни механизми на хепсидиновата продукция се свеждат до този мембранно свързан протеин. В условия на понижени нива на желязо, мембранно свързаният HJV се отцепва от матриптаза-2, трансмембранна серинова протеаза 6, кодирана от генът TMPRSS6, експресиран предоминантно от черния дроб (Finberg KE и сътр., 2010; Silvestri L и сътр., 2008), като по този начин отслабва сигнала на BMP.

Проведено е клинично проучване, при което е установено наличие на денонощна секреция на хепсидина. Направено е сравнение между серумните нива на хепсидин при бедна на желязо диета и при перорален прием на желязни препарати. Установено е значително повишаване на хепсидина при диета, бедна на желязо (Schaap CCM и сътр., 2013).

Проведено е клинично проучване, при което е установена статистически значима разлика в серумните нива на хепсидин в зависимост от времето на вземане на биологичен материал за изследване. Биологичен материал за количествено определяне на серумен хепсидин е вземан в три различни интервала – сутри, обяд, след обяд. Установена е значителна разлика в нивата на хепсидин в посока нарастване от сутрешните към следобедни резултати, което може да се свърже с циркадианните колебания на желязото в организма.

1.4.2. Регулация в зависимост от еритропоезата

Установено е, че прилагането на еритропоетин стимулиращи средства намалява хепсидиновата продукция при миши модели, хора и при *in vivo* проучвания (Nicolas G и сътр., 2002; Pinto JP и сътр., 2008; Vokurka M и сътр., 2006). За своето функциониране еритропоезата изисква определено количество желязо, при което подтискането на чернодробната хепсидинова синтеза от сигналите на еритропоеза има важно физиологично значение. Все още не е съвсем точно изяснено как активността на еритропоезата регулира продукцията на хепсидина. Хипотезата е, че еритропоетинът може да оказва директно влияние върху хепатоцитните рецептори в клетъчни култури (Pinto JP и сътр., 2008) не може да бъде потвърдена при животински модели с анемия, което показва, че намалената хепсидинова експресия е зависима от еритропоезата и не се медира директно от ЕПО (Vokurka M и сътр., 2006; Pak M и сътр., 2006). Предполага се, че еритропоетичния сигнал включва един или няколко протеина, освобождавани на място при активна еритропоеза, като например GDF15 и TWSG1. Тези молекули принадлежат към трансформиращ рестежен фактор- β (TGF- β) семейството, заедно с BMP и вероятно имат влияние върху сигналния път BMP/SMAD (Фиг. 4). Корелациите

между експресията на TWSG1, показателите за желязен статус в организма и серумните концентрации на хепсидин все още не са установени при хора.

1.4.3. Регулация от хипоксия

Установена е намалена експресия на хепсидин *in vivo* при условия на хипоксия (Nicolas G и сътр., 2002; Nemeth E и сътр., 2004). Това би могло да се дължи на ефекта на хипоксия върху секрецията на ЕПО и по този начин на еритропоетичната активност и/или чрез директно взаимодействие с хепатоцитните рецептори (Pinto JP и сътр., 2008). В допълнение на това ниските концентрации на хепсидин, установени като отговор на хипоксия, може да се дължат на хипоксия индуциращ фактор 1 (HIF1) (Peyssonaux C и сътр., 2007) BMP/SMAD (Silvestri L и сътр., 2008; Lakhali S и сътр., 2010). Съществуват индиректни механизми, по които HIF1 регулира хепсидиновата експресия. Повишената активност на HIF се свързва с интензивно отцепване от матриптаза-2 на хемоювелина, което от своя страна намалява хепсидиновата експресия (Lakhali S и сътр., 2010). Системната регулация на желязото по оста хепсидин-феропортин тясно взаимодейства с контролните механизми на регулация на ниво ентероцитна клетъчна регулация. При миши модели с дефицит на тънкочревна HIF2 α се наблюдава намалена експресия на феропортина и дивалентния метален транспортер 1 (DMT1), главният импортер на желязото, намиращ се на апикалната повърхност на дуоденалния ентероцит, който бива възпрепятстван да осъществи абсорбция дори в случаите, когато е намалена хепсидиновата експресия (Mastrogiannaki M и сътр., 2009). Следователно, в състояние на хипоксия (или желязен дефицит), експресията на HIF2 α усилва абсорбцията на желязо от тънките черва чрез повишена активност на DMT1 и феропортина. Това показва, че HIF2 α води до промени в транспорта на желязо, независимо от действието на регулаторната ос хепсидин-феропортин.

1.4.4. Регулация от възпаление

Повишената експресия на хепсидин при възпаление е медирана главно от интерлевкин-6 (IL-6). Хепатоцелуларното взаимодействие на IL-6 с неговите рецептори активира Janus Kinase (JAK) и signal transducer and activator of transcription (STAT)-3, включвайки по този начин сигналния регулаторен път JAK-STAT (Фиг. 4) (Nemeth E и сътр., 2004; Wrighting DM и сътр., 2006; Verga Falzacappa MV и сътр., 2007). Хепсидиновата експресия нараства и поради оксидативен стрес или стрес на ендоплазматичния ретикулум. Този отговор на стреса би могъл да се контролира от транскрипторен фактор cAMP-Response-Element-Binding-protein-H (CREBH) (Vecchi C и сътр., 2009) или чрез stress-inducible transcription factors CCAAT-enhancer-binding protein (C/EBP α) и C/EBP-homologous protein (CHOP) (Oliveira SJ и сътр., 2009).

Цитокините водят до увеличаване на хепсидина, което води до натрупване на желязо в макрофагите и хипоферемия. Вероятно това е защитен механизъм на тялото за ограничаване наличието на желязо за извънклетъчните патогени; от друга страна, намаляването на циркулиращото желязо води до развитието на анемия на възпаление. В противовес, желязото и еритропоетина стимулират имунните реакции чрез повлияване на имуноефекторните пътища в макрофагите. По този начин, макрофагите, натоварени с желязо губят способността си да убиват вътреклетъчни патогени чрез интерферон-гама медираните ефекторни пътища, като например азотен оксид. Съответно, макрофагите увеличават експресията на вътреклетъчния експортер на желязо – феропортина и по този начин се намалява наличието на желязо за микроорганизмите, докато от другата страна се засилват анти-микробни макрофагиални ефекторни пътища чрез повишено образуване на азотен оксид или тумор некротичен фактор-алфа (Nairz M и сътр., 2014).

1.4.5. Взаимодействие между отделните регулаторни механизми

Активирането на отделните пътища за регулация на хепсидиновата експресия зависи от взаимодействието на циркулиращите или автокринни фактори с хепатоцитната мембрана за осъществяване на контрол върху хепсидиновата

чернодробна секреция с цел поддръжка на системната хомеостаза на желязото (Hentze MW и сътр., 2010).

Серумните хепсидинови концентрации биха могли да бъдат информативно определяни с помощта на С-реактивен протеин, трансфериново насищане и разтворими трансферинови рецептори, които водят до промени върху регулаторните сигнални пътища на възпаление, статус на желязо и еритропоеза (Кемпа ЕН и сътр., 2008).

Установена е зависимост между хепсидина и превръщането на желязото в неговите биеквалентни форми в клетките (Au-Yeung HY и сътр., 2013). Проучено е участието на клетките от ретикуло-ендотелната система (макрофагите) в обмяната на желязо (Kong WN и сътр., 2013). Фериоксидаза SFO води до увеличаване секрецията на хепсидин, което води до повишено натрупване на желязо в тъкани извън черния дроб (Sasaki Y и сътр., 2014).

2. Хепсидин - клинично значение

2.1. Клинично значение при дефицит на хепсидин

2.1.1. Хепсидин при наследствена хемохроматоза

Наследствената хемохроматоза обхваща генетични нарушения в обмяната на желязото с прояви на свръх-обременяване. Натрупването на желязо води до органични увреждания като чернодробна фиброза и цироза. При повечето пациенти няма съответно стимулиране на синтеза на хепсидин в отговор на повишеното съдържание на желязо в депата. Причина за това несъответствие са мутации в гените на хемохроматозен железен протеин, трансферинов рецептор 2, хемоювелин, които стимулират експресията на хепсидина или в по-редки случаи дефекти в гена, кодиращ структурата на самия хепсидин (Lee PL, 2009; Swinkels DW и сътр., 2006). Относително ниските нива на хепсидина при тези болни водят до влошен контрол на чревната абсорбция и освобождаването от макрофагите, повишено серумно желязо и свръх-натрупване на елемента в черния дроб, сърцето и ендокринните тъкани. При пациенти с нелекувана ювенилна хемохроматоза (мутации в структурата на хемоювелин) концентрациите на хепсидина са много ниски (Papanikolaou G и сътр., 2005).

При лекувани пациенти с класическа хемохроматоза поради мутация C282Y в хемохроматозен железен протеин, серумният хепсидин е много нисък вероятно поради комбиниран ефект на генния дефект и на флеботомията върху експресията на хепсидина. При тези пациенти се наблюдава силно повишение на серумното желязо (над това, типично за силно стимулирана абсорбция). Тези наблюдения пораждаат загриженост, че допълнителното понижаване на хепсидина от флеботомията при пациенти с наследствена хемохроматоза може да задълбочи съществуващата патология с много силно изразено освобождаване на излишно желязо в кръвообръщението, а това води до последващ порочен кръг от много чести поддържащи флеботомии (Jouce J.C.Kroot и сътр., 2011). Подобни ефекти не се наблюдават при пациенти на флеботомия с мутации в трансферинов рецептор 2 и такива, които са с хемохроматоза при мутация на хемохроматозен железен протеин, но

не са подлагани на флеботомия - вероятно при такива пациенти ниският хепсидин не стимулира чревната абсорбция при повишено трансфериново насищане. В тези случаи вероятно излишъкът от желязо от храната навлиза в кръвообръщението като не-трансферин свързано, бързо се изчиства от черния дроб и така не рефлектира върху системните серумни нива на елемента.

Мутациите в структурата на трансферинов рецептор 2 не са толкова чести, както тези на хемохроматозен железен протеин. Клиничните прояви на двата типа генетични дефекти не се различават съществено. Тази изоформа на рецептора има значение не толкова за усвояване на фери-трансфериновото желязо, колкото по-скоро регулира цялостния статус на елемента. Повишена експресия на протеина се наблюдава в отговор на трансфериновото насищане (Nancy C.Andrews, 2008).

Хемохроматоза се наблюдава и при мутации в гена, кодиращ структурата на експортера на желязо феропортин. Съществуват два класа мутации във феропортиновата структура:

2.1.1.1. Мутации, при които феропортинът става нечувствителен към действието на хепсидина (ефект от загуба на хепсидиновата регулация). При пациенти с този клас мутации фенотипът е подобен на този при класическата хемохроматоза, но при тях не се наблюдава нисък хепсидин. След флеботомия, която възстановява депата на желязо (оценени чрез серумен феритин), тези пациенти имат концентрация на серумен хепсидин или стойност на отношението серумен хепсидин/феритин в рамките или над референтните интервали. Относително високите нива на хепсидина при някои пациенти биха могли да бъдат следствие от трансфериновото насищане, което остава високо независимо от приложената флеботомия.

2.1.1.2. Мутации, които засягат клетъчната локализация на феропортина и при които той губи своята експортна функция (ефект от загуба на функция) (Nancy C.Andrews, 2008; Кетпа ЕН и сътр., 2007). При тези мутации натрупването на желязо е генерализирано предимно в макрофагите. Фенотипът е различен от

този на класическата хемохроматоза; уринният хепсидин е повишен, когато нарушението не е лекувано.

На базата на съвременните познания за молекулярната патогенеза на хемохроматозата, би могла да се формулира следната класификация (Nancy C.Andrews, 2008; Nweneka CV и сътр., 2010):

- Клас 1 хемохроматоза: мутации в структурата на самия хепсидин - тези дефекти нарушават продукцията на функционалния по отношение на хомеостазата на желязото протеин.
- Клас 2 хемохроматоза: мутации в структурата на трите протеина, регулиращи хомеостазата на желязото - дефектите в тези структури нарушават основните регулаторни пътища, които нормално стимулират експресията на хепсидина.
- Клас 3 хемохроматоза: дефекти в структурата на експортера феропортин, при които той става нечувствителен към хепсидиновата активност.
- Предложено е клиничното състояние, което се дължи на мутации със загуба на феропортиновата транспортна функция, да се нарича «феропортинова болест».

Разработването и валидирането в клинично-лабораторната практика на методи за изследване на хепсидин показват, че пептидът би могъл да се прилага като нов обещаващ маркер в диагностиката (Ророва JG и сътр., 2007). Потенциалните възможности на изследването на хепсидин при пациенти с хемохроматоза (диагностицирана или подозирана) могат да се обобщят в следните направления: а) скрининг за наследствена хемохроматоза при пациенти с повишен феритин; б) приоритетно насочване към генна диагностика (много ниски хепсидинови концентрации насочват към ювенилна хемохроматоза с дефекти в хемоювелина); в) отсяване на пациенти с хомозиготни мутации C282Y, които са рисков контингент за развитие на свръх-обременяване с желязо; г) мониториране на терапията с флеботомия.

2.1.2. Хепсидин при анемии с натрупване на желязо.

При наследствените анемии с натрупване на желязо като β -таласемия (major и intermedia) и наследствената дисеритропоетична анемия тип I и II, а също и придобитите форми като миелодиспластичен синдром типове рефрактерна анемия и рефрактерна анемия с пръстеновидни сидеробласти, болният еритроцит не регулира нормално обмяната на желязото чрез инхибиране на синтеза на хепсидин дори и в присъствие на свръх-обременяване. Съотношението хепсидин/феритин е ниско при тези заболявания. Последствията от неефективната еритропоеза вероятно имат превес над тези, които се дължат на свръх-натрупване на желязо в депата. При сърповидно-клетъчната анемия се добавят и фактори на възпаление. Вероятно повишението на хепсидина от възпалението смекчава токсичността на желязото, което би се наблюдавало при пациенти със сърповидно-клетъчна анемия (Joyce J.C.Kroot и сътр., 2011; De Domenico I и сътр., 2010).

Установена е зависимост от развитие на сърдечно съдови заболявания при пациенти с железен дефицит, намалена секреция на хепсидин и коронарно заболяване. Счита се, че съчетанието на тези три фактора е водеща причина за развитието на тази група заболявания (Bachorzewska-Gajewska H и сътр., 2014).

При пациенти с наследствени форми на анемия, серумните концентрации на хепсидина биха позволили да се отдиференцират най-тежко засегнатите пациенти, да се предскаже и мониторира паренхимното обременяване с желязо.

2.1.3. Хепсидин при желязо-дефицитна анемия.

При пациентите с желязо-дефицитна анемия, както и при тези с нисък серумен феритин в латентна и пре-латентна форма на дефицит без съпровождаща анемия се установяват много ниски нива на хепсидин, често дори под долната граница на откриване на използваните методи за количествен анализ на показателя (Ganz T и сътр., 2008).

Ефект от прилагане на желязни препарати върху концентрациите на хепсидина. При здрави индивиди се наблюдава повишение на концентрацията на хепсидина в серум и урина по време на прием на орални желязо-съдържащи препарати (Joyce J.C.Kroot, 2011). Някои проучвания показват значима отрицателна корелация между серумния хепсидин и скоростта на абсорбция на желязо в червата. Серумните концентрации на хепсидина могат да служат като предиктор на терапевтичния ефект при прием на перорални желязни препарати. Още повече, отговорът на хепсидина към терапията с перорални желязни препарати би могъл да бъде полезен тест за оценка на абсорбцията на желязото при желязен дефицит.

Прилагането на интравенозни препарати отдиференцира пациенти с повишено ниво на хепсидин при желязо-дефицитна анемия. По този начин се предотвратява ненужното натрупване и прилагане на перорална терапия с желязни препарати, поради «резистентност» на организма (Goodnough L и сътр., 2013; Bregman DB и сътр., 2014).

2.1.4. Хепсидин при придобити форми на не-хемохроматозно свръхобременяване с желязо.

Някои ненаследствени увреждания на черния дроб като алкохолна цироза, неалкохолна стеатоза или неалкохолно чернодробно заболяване, се съпровождат с умерено натрупване на желязо в чернодробния паренхим. При тези заболявания е установена нарушена регулация на хепсидиновия синтез като резултат на оксидативен стрес, на стрес в ендоплазмения ретикулум и на медиирани от цитокинен тумор некротичен фактор- α регулаторни механизми - относително намаленият синтез на хепсидин води до акумулиране на желязо в хепатоцитите (Joyce J.C.Kroot и сътр., 2011; Kemna EN и сътр., 2007). Нивото на серумният хепсидин е полезен маркер за нарушена регулация на желязото при тези форми на свръх-обременяване.

При миелодиспластичен синдром се наблюдава подтисната секреция на хепсидин поради неефективна еритропоеза с отлагане на желязо в тъканите.

Прилагането на терапия с хелаторни препарати значително намалява не-трансферин-свързаното желязо и лабилното плазмено желязо (Steensma DP и сътр., 2013).

2.2. Клинично значение при повишено ниво на хепсидин

2.2.1. Хепсидин при желязо-рефрактерна желязо-дефицитна анемия.

Повечето пациенти с това състояние не могат да усвояват желязото при орално суплементиране поради дефект на гена Tmprss6, кодиращ матриптаза-2. Честите венозни трансфузии на еритроцитни концентрати частично повишават хемоглобина и средния обем на еритроцитите (Joyce J.C.Kroot и сътр., 2011; De Domenico I и сътр., 2010; De Mast Q и сътр., 2009). Загубата на активност на матриптаза-2 не позволява да се намали хепсидина при дефицит на желязо. Съответно, пациентите имат генетично-детерминиран висок хепсидин, който води до ниско трансфериново насищане и серумен феритин около долната референтна граница (Joyce J.C.Kroot и сътр., 2011; Kroot J.C. и сътр., 2010). Определянето на серумните нива на хепсидин в тези случаи може да помогне на диагностицирането на дефект в матриптаза-2 при сложни случаи на желязо-дефицитна анемия: подобен подход би спестил назначаването на многобройни излишни клинично-лабораторни изследвания, както и ще позволи да се избегне забавено или неправилно лечение.

Напредъкът в разбирането на метаболизма и системната хомеостаза на желязото позволиха установяването на нови форми редки анемии поради дефекти на протеини, участващи в усвояването на желязото, оползотворяването и рециклирането му. Тези наследствени заболявания обикновено се характеризират с микроцитна и хипохромна анемия, която отразява ниското съдържание на хемоглобин в червените кръвни клетки и вторично от намаляване на вътреклетъчното желязо. От лабораторна гледна точка тези анемии могат да бъдат класифицирани като не-сидеробластни или сидеробластни. Първите са разнородни и включват: А) дефекти в чревната абсорбция на желязо поради прекомерно производство на хепсидин при желязо-рефрактерна желязо-дефицитна анемия (ЖРЖДА). ЖРЖДА е наскоро позната като автозомно-

рецесивно унаследяване, поради мутации на сериновата протеаза TMPRSS6. Установените мутации намаляват или премахват възможността TMPRSS6 да потисне хепсидин. Анемията обикновено се характеризира със силно изразена микроцитоза с ниско насищане на трансферин и нисък или нормален серумен феритин. Класическата черта на ЖРЖДА е неповлияване от перорален прием на желязо и частичен отговор на парентерално лечение с желязо. Б) рецесивни разстройства на цикъла на рецептора на трансферин. Те включват мутации на преносителя на желязо трансферин (атрансферинемия или хипотрансферинемия, мутации на двувалентния метален транспортер 1 (DMT1) и на Six-Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate 3 (STEAP3). Тези дефекти нарушават поглъщането или оползотворяването на желязо от сидеробластите. Клинично протича с умерена или тежка микроцитна анемия с високо насищане на трансферин и серумни нива на феритин, с доказателства за системно натрупване на желязо, особено в черния дроб. В) дефекти на рециклиране на желязото като ацерулоплазминемия поради рецесивни мутации в гена на церулоплазмин. Тъй като церулоплазмина е оксидаза и си сътрудничи с феропортина за изнасяне на желязо от макрофагите, хепатоцитите и глиалните клетки, ацерулоплазминемията представлява синдром, характеризиращ се със системно и чернодробно натрупване на желязо, диабет, ретинопатия и лека или умерена нормоцитна / микроцитна анемия, свързана с неврологични симптоми, които се появяват в средната възраст. Натрупването на желязо се среща в базалните ганглии и поради тази причина заболяването се класифицира като тип невродегенерация с натрупване на желязо в мозъка. Сидеробластната анемия се характеризира с наличието на сидеробласти при изследване на препарат от костен мозък след оцветяване по Пърлс. Сидеробластите натрупват желязо в перинуклеарните митохондрии, следователно показват пръстен от локализацията на желязо. Придобити форми на сидеробластна анемия като рефрактерна анемия с пръстеновидни сидеробласти, са вид миелодисплазии, силно свързани с мутации на spliceosome-associated фактор 3B1 (SF3B1). Сред унаследените сидеробластни анемии може да се наблюдават дефекти на митохондриалното усвояване на желязо при намалена синтеза на хем. Най-честата форма е X-свързана сидеробластна анемия, поради мутации на първия ензим на хем биосинтетичния път, делта-амино-левулинова киселина-синтаза-2 (ALAS2). Някои форми имат лека или

умерена анемия и се подобряват след лечение с пиридоксин. Сред пиридоксин-рефрактерни форми има рецесивни мутации на SLC25A38, митохондриален вносител на глицин, субстрат на делта-амино-левулинова-киселина. Всички редки нетипични анемии, свързани с метаболизма на желязо, трябва да се отличават от другите по-често срещани причини за микроцитоза, които са резултат от класически дефицит на желязо или таласемични синдроми. Грижливо снета анамнеза на пациента и внимателната оценка на хематологичните тестове и параметрите на обмяната на желязо позволяват разграничаването на тези редки заболявания от класическа желязодефицитна анемия или от ограничена еритропоезата поради недостиг на желязо. В повечето случаи са необходими молекулярни изследвания, за да се постави окончателната диагноза, която е от значение за правилното лечение (Camaschella C, 2014).

2.2.2. Хепсидин при инфекции и възпалителни заболявания.

Инфекциите се свързват със значими промени в хомеостазата на желязото. Анемията при малария се характеризира с ниско серумно желязо и повишен хепсидин, който е причина за акумулиране на желязо в ендотелиалната макрофагиална система и до недоимък на желязо за нуждите на еритропоезата (Cherian S и сътр., 2008; De Mast Q и сътр., 2009; De Mast Q и сътр., 2010; Nweneka CV и сътр., 2010). Вероятно повишеният хепсидин играе протективна роля срещу растежа на микроорганизми като намалява екстрацелуларното желязо. От друга страна повишеният хепсидин може да доведе до дефицит на желязо и до невъзможност за ефективно компенсиране при орално суплементиране, защото подтиска абсорбцията на желязо през чревната лигавица. Повишеният хепсидин при възпаление може да увеличи вирулентността на бактериите, която зависи от количеството желязо в макрофагите (*напр. Salmonella, Mycobacteria spp.*). Такива патогени са характерни за ендемичните маларийни райони. Нецелесъобразното суплементиране с желязо на деца от тези региони без дефицит в депата може да доведе до тежки странични ефекти поради стимулирана пролиферация на латентни патогени (Joyce J.C.Kroot и сътр., 2011; Kemna EH и сътр., 2007; De Domenico I и сътр., 2010).

Хепсидинът е важен и за патогенезата на други инфекциозни агенти. При пациенти с вирусен хепатит С се наблюдава високо трансфериново насищане, висок серумен феритин и обременяване на черния дроб с желязо. Тези лабораторни данни за натрупване на желязо са съвместими с ниския серумен хепсидин, който е установен при тях.

Цитокините водят до увеличаване на хепсидина, което води до натрупване на желязо в макрофагите и хипоферемия. Вероятно това е защитен механизъм на тялото за ограничаване наличието на желязо за извънклетъчните патогени; от друга страна, намаляването на циркулиращото желязо води до развитието на анемия на възпаление. В противовес, желязото и еритропоетина стимулират имунните реакции чрез повлияване на имуноефекторните пътища в макрофагите. По този начин, макрофагите, натоварени с желязо губят способността си да убиват вътреклетъчни патогени чрез интерферон-гама медиирани ефекторни пътища, като например азотен оксид. Съответно, макрофагите увеличават експресията на вътреклетъчния експортер на желязо – феропортина и по този начин се намалява наличието на желязо за микроорганизмите, докато от другата страна се засилват анти-микробни макрофагиални ефекторни пътища чрез повишено образуване на азотен оксид или тумор некротичен фактор-алфа (Nairz M и сътр., 2014).

2.2.3. Анемия при хронични заболявания.

Анемията при хронични заболявания е придобито нарушение на хомеостазата на желязото. Това състояние се свързва с инфекция, малигненост, органна недостатъчност, тежка травма или други случаи на възпаление. Анемията обикновено е слабо или умерено изразена, еритроцитите могат да не показват типични характеристики на дефицит на желязо. Подчертаната етиология, свързана с желязото е очевидна: нарушено рециклиране на желязо от макрофагите, нарушена чревна абсорбция на желязо, еритроидните прекурсори реагират бързо на диферитрансферина, но еритропоезата е нарушена поради недостатъчно желязо. Характеристиките на този тип анемия се свързват с индуциран хепсидинов синтез под

влиянието на интерлевкин-6 и други цитокини. Доколкото желязо-рефрактерната желязо-дефицитна анемия също се причинява от висока експресия на хепсидин, би трябвало да се очаква, че анемия при хронични заболявания и желязо-рефракторна желязо-дефицитна анемия би трябвало да имат общи клинични характеристики. Една поразителна разлика е, че желязо-рефракторната желязо-дефицитна анемия се свързва с тежка микроцитоза, докато анемията при хронични заболявания е нормоцитна. Според някои автори нормоцитните еритроцити при анемия при хронични заболявания са резултат от действието на два противоположни ефекта: от една страна недостатъчно желязо, а от друга все още неизяснена в детайли тенденция към макроцитоза вероятно поради нарушена хомеостаза на фолата в отговор на възпалението (Nancy C.Andrews, 2008).

Понастоящем няма лабораторен тест който да може напълно да отличи анемия при хронични заболявания (АХЗ) от желязо-дефицитна анемия (ЖДА) (Joyce J.C.Kroot и сътр., 2011; Hentze MW и сътр., 2010). Отдиференцирането на тези две състояние често се постига чрез комбинирането изследване на различни биохимични маркери на обмяната на желязото. Проучването на хепсидина при анемия при хронични заболявания е затруднено поради липса на златен стандарт като методологичен подход. Оценката на диагностичната значимост на хепсидина много зависи от дефинирането на методология, която сама по себе си е само заместител на златен стандарт. Според някои изследвания хепсидинът е полезен маркер при отдиференцирането на АХЗ от ЖДА / АХЗ, но не и на ЖДА от ЖДА / АХЗ, докато според други хепсидинът позволява да се разграничи ЖДА от ЖДА / АХЗ, но не и АХЗ от ЖДА / АХЗ. Други автори представят данни за това, че концентрацията на хепсидина може да служи като полезен маркер при отдиференцирането и на 3-те групи патологични нарушения.

Изследването на хепсидина има потенциално полезно значение в диагностичните алгоритми за разграничаването на желязо-дефицитна анемия (ЖДА) от анемия при хронични заболявания (АХЗ) и от комбинираното състояние ЖДА / АХЗ. Бъдещи проучвания на отговора на хепсидина към суплементирането с желязо биха могли да приближат диагностиката към златния стандарт по отношение на обмяна на

желязото. Изследването на хепсидина би било ползотворно в предвиждането на последствията от суплементиране с желязо при инфекции и при възпалителни заболявания.

Анемия на хроничните заболявания (АХЗ), известна също като анемия на възпаление, е най-разпространената при хоспитализирани пациенти в целия свят. Наблюдава се при пациенти с остри или хронични възпалителни заболявания, включително инфекции, рак, ревматоиден артрит и хронични бъбречни заболявания (Sun CC и сътр., 2012). АХЗ е хетерогенно заболяване, което обикновено се характеризира с нормоцитна анемия, промени в еритропоетични отговори, ниско серумно желязо, ниска сатурация на трансферин, натрупване на желязо в макрофагите и възможно увеличение на елемента в организма (Sun CC и сътр., 2012). Доскоро молекулярните механизми и патогенезата в нарушеното разпределение на желязо при АХЗ бе неизвестен. Вече е ясно, че възпалителните цитокини, които се освобождават по време на остра инфекция или хронично заболяване могат да променят системния метаболизъм на желязото като стимулират синтез на хепсидин, желязо регулаторен хормон (Sun CC и сътр., 2012). Хепсидинът блокира износа на желязо от клетките като разгражда клетъчния експортер на желязо феропортин; така основна причина за хипоферемията и ограничената еритропоеза при АХЗ е повишеното ниво на хепсидин (Sun CC и сътр., 2012; Ganz T & Nemeth E, 2009). Лечението на анемията се провежда с въвеждане на интравенозно желязо и еритропоеза стимулиращи препарати (ЕСП), без оглед на високите нива на хепсидин при АХЗ. Наличието на неблагоприятни ефекти от тези терапии води до необходимост от алтернативно лечение.

Етиологията на АХЗ е многофакторна и се характеризира с активиране на клетки на имунната система и възпалителни цитокини, които нарушават еритропоетиновата секреция и еритропоезата, намаляват живота на червените кръвни клетки и увреждат хомеостазата на желязото (Sun CC и сътр., 2012). Хематологичните характеристики на АХЗ се различават от тези, типични за желязо-дефицитна анемия (ЖДА) без възпаление. При ЖДА, еритропоезата е стимулирана с поддържане на достатъчно ниво на кислород като се наблюдават микроцитни и хипохромни еритроцити. За разлика от нея, АХЗ обикновено е нормохромна и нормоцитна анемия, а микроцитоза се

установява в случаите с едновременно развитие на желязен дефицит (Sun CC и сътр., 2012). Счита се, че нормоцитната анемия се дължи на възпалението, което предизвиква намаляване на активността на еритропоезата.

Възпалителните цитокини водят до промени в разпределението на желязо. Пациенти с АХЗ имат ниска серумна концентрация на желязо, нисък или нормален тотален желязо-свързващ капацитет и ниска сатурация на трансферин, както и нисък брой на ретикулоцити (Sun CC и сътр., 2012). Важно е да се отбележи, че ключова характеристика на АХЗ е натрупването на желязо в клетките на ретикуло-макрофагиалната система, въпреки намалените нива на желязо. По този начин съществува определено ниво на циркулиращо желязо необходимо за синтез на хемоглобин, дори и при наличието на адекватни или високи нива на желязо в депата на организма. Вероятно това е защитен механизъм за изолиране на желязо в макрофагите с цел защита срещу определени външни патогени, много от които изискват желязо за своето развитие (Sun CC и сътр., 2012; Yu PB и сътр., 2008). Въпреки това, отклоняването на желязо от кръвообращението в макрофагите води до функционален недостиг на желязо в мястото на еритропоезата, което в крайна сметка, ако не се коригира, води до анемия. Важно е да се отбележи, че функционалният дефицит на желязо при АХЗ е различен от истинския недостиг на желязо при ЖДА, където желязото е изчерпано в кръвообращението и макрофагите (Theurl I и сътр., 2009). Множество изследвания през последните 10 години показват, че функционален дефицит на желязо при АХЗ може да се дължи на повишени нива на регулаторния хормон хепсидин. Проучвания при експериментални модели с мишки установяват, че високите хепсидинови концентрации се свързват с обобщените класически характеристики на АХЗ като постоянна хипоферемия и задържане на желязо в макрофагите (Sun CC и сътр., 2012). Подобни наблюдения недвусмислено потвърждават участието на хепсидин в патогенезата на АХЗ и показват, че хепсидиновите инхибитори могат да са полезни в нова терапевтична стратегия за лечение АХЗ.

При клинично проучване е установен препарат TP-0413, повлияващ директно Janus Kinase 2 (Jak2) и Activin A receptor, тип I (Alk-2) – компоненти в синтеза на

хепсидин. Той може да се използва като терапевтичен избор при повишени нива на хепсидин при анемия на хронично възпаление (Stephens VJ и сътр., 2013).

Механизмите, отговорни за разстройствата на хомеостазата на желязо при хронични възпалителни състояния, не са напълно изяснени. При проведено проучване е установено, че генната експресия на няколко желязо-свързани протеини в дванадесетопръстника е значително повишена. При пациенти с улцерозен колит, експресията на протеините двувалентен метал транспортер 1 и феропортин, които участват в усвояването на не-хемовото желязо от храната, е значително по-висока в лигавицата на дуоденума (Sukumaran A и сътр., 2014).

В друго проучване е установена зависимостта между цитокини и интерлевкини, което води до нарастване секрецията на хепсидин при хронично възпаление (Gardenghi S и сътр., 2013).

2.2.4. Хепсидин при бъбречни заболявания.

Анемията е една от най-характерните и видими прояви на хронична бъбречна недостатъчност вече повече от 150 години. Обикновено, това е нормоцитна и нормохромна с костен мозък с нормални клетъчни характеристики. Патогенезата на анемия при хронично бъбречно заболяване е многофакторна. Въпреки неадекватна продукция на еритропоетин, която е най-важният фактор в патогенезата на анемия при хронично бъбречно заболяване, други фактори играят роля и допринасят за лека анемия, която често присъства въпреки използването на рекомбинантен човешки еритропоетин, или други средства, стимулиращи еритропоезата. Основните сред тях са съкратена преживяемост на еритроцитите, загуба на кръв, желязо и други хранителни дефицити, хемолиза, наличието на уремични инхибитори на еритропоезата. Достатъчните желязни запаси са от съществено значение за постигане на максимална ефективност от терапията с еритропоеза стимулиращи препарати (ЕСП). Обикновено, три четвърти от желязото в организма е налично в циркулиращите еритроцити, и една четвърт се съхранява главно в черния дроб и костния мозък. Тъй като необходимостта на костния мозък от желязо често надхвърля неговите запаси, след започване на

терапия с ЕСП, приемът на желязо е от съществено значение. В ерата преди лечението с еритропоетин при напреднало бъбречно заболяване и свързаната с него хипопролиферативна анемия често са се придружавали с излишък на желязо поради честите кръвопреливания. Сега претоварването с желязо е необичайно, като по-често срещан е недостига на желязо. Недостигът на желязо намалява еритропоезата и уврежда отговора на еритропоетина. Пациенти на хемодиализа губят средно по 2 г желязо годишно или до 1,5-3 л кръв (Eschbach JW и сътр., 1977; Malyszko J и сътр., 2007). По този начин, недостига на желязо се развива при почти всички пациенти на диализа, приемащи рекомбинантен човешки еритропоетин или дарбепоедин-алфа, освен ако няма допълнително лечение с желязо. Важен въпрос при диагностицирането на недостиг на желязо при диализираните пациенти е, че лабораторните критерии са отличават от тези при хората с относително нормална бъбречна функция. Абсолютен недостиг на желязо е вероятно да настъпи в крайния стадий на бъбречно заболяване, когато процентното трансфериново насищане пада под 20%, а концентрацията на серумния феритин е < 100 ng/ml (Fernandez-Rodrigues AM и сътр., 1999). Несъответствията в концентрацията на феритин между нормални лица и диализирани пациенти отчасти се дължат на факта, че феритина е острофазов протеин и хроничното бъбречно заболяване и диализното лечение са субклинични възпалителни заболявания.

Разработването на препарати, стимулиращи еритропоезата (ЕСП) като еритропетин (ЕПО) позволи прилагането на ефективна терапия на пациенти с ХБЗ. Оптималната прицелна хемоглобинова концентрация е подложена на различни обсъждания; по време на терапията значителен брой пациенти стават резистентни на ЕСП. Скоро след откриването му, хепсидинът бива тясно свързан с ХБЗ поради неговата роля в настъпващия дисбаланс между хомеостазата на желязо и резистентността към ЕСП (Nicolas G и сътр., 2002; Swinkels DW & Wetzels JF, 2008). Следователно хепсидинът е маркер, който би могъл да се използва за предикция на отговора към ЕСП, както и да ръководи клинициста при провеждане на терапия с ЕСП и интравенозно желязо. В следствие тази му роля бе добре призната в практиката. Това доведе до голям брой клинични проучвания в тази област. В голяма част от тях бяха установени повишени

нива на хепсидин при пациенти с ХБЗ спрямо контролните групи (Tomosugi N и сътр., 2006; Peters HP и сътр., 2010; Ganz T и сътр., 2008; Ashby DR и сътр., 2009; Bansal SS и сътр., 2010; Zaritsky JJ и сътр., 2009). Поради факта, че тези пациенти имат склонност към развитие на анемия, дори малки промени в нивото на хепсидина може да доведе до значителни промени в статуса на желязото. При всички проучвания относно ролята на хепсидина при ХБЗ е установена връзка между концентрациите на хепсидин и феритин. Някои от тези проучвания демонстрират корелация между хепсидина и трансфериновата сатурация (Weiss G и сътр., 2009; van der Putten K и сътр., 2010). Високите нива на хепсидин при ХБЗ се свързват с обременената еритропоеза, в ситуация на железен дефицит и ниските нива на хемоглобин и/или еритроцитния брой (Ashby DR и сътр., 2009; Weiss G и сътр., 2009; Valenti L и сътр., 2009). Нивата на CRP и интерлевкин-6 също имат връзка с настъпването на бъбречна недостатъчност (Peters HP и сътр., 2010; van der Putten K и сътр., 2010; Kuragano T и сътр., 2010; Zaritsky J и сътр., 2010; Ford VA и сътр., 2010). Някои от проучванията показват намаляване на концентрациите на хепсидин след прилагането на ЕПО (Ashby DR и сътр., 2009; Weiss G и сътр., 2009; van der Putten K и сътр., 2010; Nicolas G и сътр., 2002). Те доказват, че необходимостта на еритропоезата от желязо е по-важен и силно регулиращ фактор на хепсидиновата експресия в сравнение с възпалението. Вероятно хепсидинът може да се разглежда като маркер на отговора, а не на резистентността към терапия с ЕСП при тези пациенти.

Намаляването на серумните нива на хепсидин, което ще доведе до понижаване степента на отлагане на вътреклетъчното желязо, има обещаващо приложение при терапията на остро и хронично бъбречно увреждане. Проведено е проучване, показващо успоредно намаляване нивата на neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) и хепсидин, с което се подобрява симптоматиката при двете заболявания (Martines AM и сътр., 2013).

Установяването на железен дефицит при пациенти с хронично бъбречно заболяване се подобрява с прилагането на индекси от три показателя: трансфериново насищане – тотален желязо-свързващ капацитет – феритин. С тяхна помощ се установява хипотрансферинемията и липсата на възпаление при етиологията на

анемия на ХБЗ (Mercadal L и сътр., 2014). Индекс на разтворими трансферинови рецептори – използван за отдифернциране на желязо-дефицитна анемия от анемия на хронично възпаление. Индекс на хепсидин към феритин – използван за отдифернциране на анемия на хронично възпаление от комбинацията АХЗ/ЖДА. Индекс на процентно трансфериново насищане към хепсидин – използван за отдифернциране на желязо-дефицитна анемия от анемия при възпаление (висок при ЖДА).

2.2.4.1. Бъбречна трансплантация и хепсидин

През последните няколко години са проведени редица проучвания в областта на клиничното значение на хепсидин за проследяване на състоянието на хомеостазата на желязо след бъбречна трансплантация. Моделите на проучване показват значително намаляване нивата на серумен хепсидин след бъбречна трансплантация и намаляване нивата на креатинин в кръвта и протеин в урината (Przybylowski P и сътр., 2010).

При пациенти след бъбречна трансплантация е открит Growth differentiation factor 15 (GDF-15), който се счита, че е супресор на секрецията на хепсидин и се синтезира във високи количества при неефективна еритеопоеза. Предполага се неговото участие в патогенезата на анемия след бъбречна трансплантация (Kos-Zorawska E и сътр., 2013).

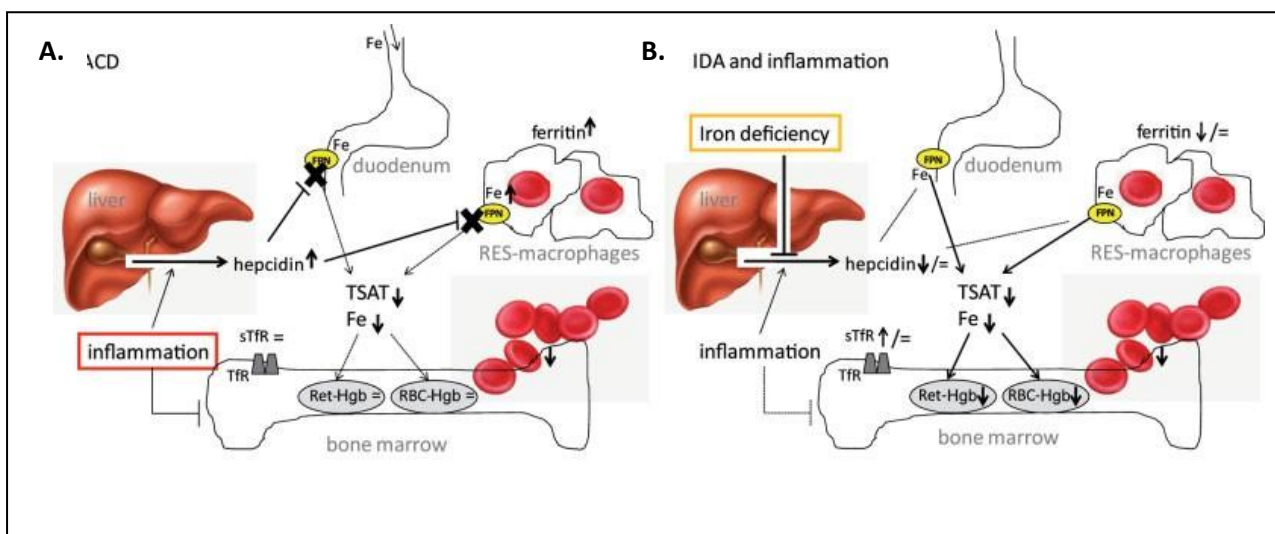
2.2.5. Хепсидин при ревматоиден артрит

Появата на анемия при ревматоиден артрит е многофакторен процес и е свързан с наличието на хронично възпаление. Тя протича като желязо-дефицитна, дължаща се главно на индуцирани от лекарствата стомашно-чревни кръвоизливи и нарушения. Установяването и намирането на правилен терапевтичен подход на железен дефицит при пациенти с анемия на хроничното заболяване има важно клинично значение поради това, че а) желязо-дефицитната анемия може да бъде

лекувана, б) диагнозата може да изисква допълнителни изследвания за установяване на причината за появата

й, в) може да бъде предотвратено ненужно изписване на терапия с желязни препарати.

За съжаление диагнозата на желязен дефицит на този етап от развитието на клинично-лабораторната практика не предоставя точен механизъм за диагностика на желязния дефицит поради неспецифичността на показателите, които се използват за оценка на желязния статус (Brugnara C, 2003; Northrop-Clewes CA, 2008). Проинфламаторни стимули водят до развитие на анемия на хронично заболяване като директно инхибират еритропоезата и индиректно намаляват желязото, доставяно за синтеза на хема (Weiss G, 2005). Този процес се свързва с повишеното ниво на регулаторния пептид хепсидин поради наличието на възпаление. Повишените нива на хепсидин намаляват интестиналната абсорбция на желязото. Едновременно с това се наблюдава задържане на желязо в макрофагите поради настъпване на промени в молекулата на клетъчния експорер на желязото, феропортина. Настъпва секвестрация на желязото в ретикулоендотелната система (Kemna EN и сътр., 2008; Goodnough LT и сътр., 2010). В последствие общото съдържание на желязо в организма е нормално, но все по-малко се доставя за еритропоеза. Противоположен е механизма за развитие на желязо-дефицитна анемия. При нея се наблюдава абсолютен дефицит на желязо, хепсидиновата секреция е подтисната, което води до стимулиране на абсорбцията на желязо в тънките черва. Установяването на различно поведение на хепсидин при възпаление и желязен дефицит предполага, че той би могъл да бъде потенциален биомаркер за установяване на желязен дефицит при пациенти с възпалителни заболявания (Sasu BJ и сътр., 2010; Theurl I и сътр., 2009; Thomas C и сътр., 2011; Kroot JJ и сътр., 2010) (Фиг. 5).



Фигура 5. Схемa на показателите на желязния статус при пациенти с ревматоиден артрит с анемия на хронично заболяване и с желязо-дефицитна анемия. (предложена от van Santen S и сътр., 2011)

A. Анемия на хронично заболяване. В случаи на възпаление повишени нива на хепсидин се освобождават в циркулацията от хепатоцитите. Хепсидинът взаимодейства с феропортина (клетъчния експортер на желязото), като по този начин намалява износа на желязо от ентероцитите и макрофагите към кръвообращението. Като следствие серумните нива на желязо и трансфериново насищане намаляват, докато запасите на желязо в макрофагите нарастват, което води до повишаване нивата на феритина. Предизвиканата от възпалението супресия на еритропоезата противодейства на намаленото ниво на желязо. Поради тази причина серумните нива на разтворимите трансферинови рецептори и хемоглобиновото съдържание в ретикулоцитите и еритроцитите може да останат в границите на нормалните стойности.

B. Желязо-дефицитна анемия. Дефицитът на желязо намалява нивото на хепсидина (дори при наличие на възпаление), като в резултат се получава максимално освобождаване на желязо от ентероцитите и макрофагите в циркулацията. Въпреки това, нивата на феритин, желязо и трансфериното насищане намаляват. В следствие недостига на желязо за костния мозък води до

повишаване на концентрацията на трансфериновите рецептори с цел осигуряване на максимално количество желязо за еритробластите. Нивата на хемоглобин в ретикулоцити и еритроцити са намалени, индикирайки недостатъчност на желязо за еритропоеза.

Хемоглобиновото съдържание на еритроцитите и ретикулоцитите също биват идентифицирани като маркери за диагностика на железен дефицит (Brugnara C и сътр., 2006; Soken-Nakazawa J Song и сътр., 2013; Vovy C и сътр., 2007; van Santen S и сътр., 2011). Двата показателя рефлектират върху хемоглобинизацията на най-ранно отделяните ретикулоцити, циркулиращи за ден-два в организма, както и на зрелите еритроцити (Ullrich C и сътр., 2005). Намалените стойности на хемоглобин в еритроцити и ретикулоцити показват, че доставянето на желязо за костния мозък е недостатъчно и не протича нормална хемоглобинизация на клетките (Soken-Nakazawa J Song и сътр., 2013). Тъй като тези два показателя не се влияят директно от възпалението при наличие на ревамтоиден артрит, те биха могли да се използват за установяване на железен дефицит при състояния на хронично възпаление (Brugnara C и сътр., 2006).

В последните години фокусът на научния интерес е насочен към прилагане на нови терапевтични средства с действие по оста хепсидин-феропортин: те биха могли да инхибират пътищата за синтез на хепсидин (BMP6-HJV-SMAD и IL-6-STAT3) или да стимулират износа чрез феропортин. Подобни терапевтични стратегии биха довели до по-добро управление на нарушенията в разпределянето на желязо и развиващата се в следствие анемия в комбинация с хроничното заболяване.

Про-хепсидинът като прекурсор в секрецията на основния регулатор на хомеостазата на желязото – хепсидин има установена роля при анемия и ревматоиден артрит (Belenkiy D и сътр., 2013).

Препарати, намаляващи екскрецията на тумор некротичен фактор-алфа водят до понижаване серумните нива на хепсидин в организма (Song SN и сътр., 2013).

2.2.6. Хепсидин при заболявания, свързани със затлъстяване.

Адипоцитната тъкан представлява активен ендокринен орган, който секретира редица цитокини и адипокини, които могат да доведат до развитието на системно възпаление от нисък порядък. Нещо повече, адипоцитната тъкан може да секретира и хепсидин (Bekri S и сътр., 2006). Нискостепенното възпаление при затлъстяване при пациенти с дисметаболично натрупване на желязо (характеризирано чрез асоциация между повишени нива на желязо в депата и метаболитни промени), се свързва с повишените нива на хепсидин, водещи до намалена абсорбция на желязото и водейки до АХЗ (del Giudice EM и сътр., 2009; Aeberli I и сътр., 2009; Tussing-Humphreys LM и сътр., 2010; Ruivard M и сътр., 2009). Установено е, че серумните концентрации на хепсидин намаляват и показателите на железен статус и чревна абсорбция се подобряват при пациенти след редукция на теглото (Tussing-Humphreys LM и сътр., 2010; Amato A и сътр., 2010). По този начин при състояния с нискостепенно възпаление, каквото е затлъстяването или метаболитния синдром дори малки нива на хепсидин могат да нарушат баланса между загубата и усвояването на желязо и да доведат до железен дефицит.

Установено е, че с нарастването на body mass index (BMI) при жени настъпва понижаване серумните нива на желязо и покачване нивата на трансфериново насищане и С-реактивен протеин. Това води до хипоферемия с настъпване на железен дефицит (Cheng HL и сътр., 2013; Dao MC и сътр., 2013). Аналогично проучване при деца със затлъстяване показва участието на повишените хепсидинови нива в развитието на анемия (Hamza RT и сътр., 2013).

2.2.7. Хепсидин при сърдечно-съдови заболявания.

Установено е, че анемията при хронично сърдечно заболяване се асоциира с ниските концентрации на хепсидин, не в такава степен като възпалението, а с други механизми (Matsumoto M и сътр., 2010; Divakaran V и сътр., 2011). Едно проучване с пристъп на остра сърдечна исхемия показва, че има наличие на преходно увеличаване на серумните нива на хепсидин-20, докато нивата на хепсидин-25 се задържат

повишени до 7 дни след инцидента. Авторите стигат до извода, че за диагностиката на остър миокарден инфаркт е по-подходящ хепсидин-20 отколкото хепсидин-25 (Suzuki H и сътр., 2009). Някои проучвания показват, че серумните нива на хепсидин може да се използват за оценка на рискът от сърдечно-съдовото заболяване (ССЗ). Изказана е хипотеза, че повишените концентрации на хепсидин може да повишат рискът от ССЗ чрез повишаване на вътреклетъчното макрофагеално ниво на желязо и увеличаване на атерогенният им потенциал (Kraml PJ и сътр., 2005; Lapenna D и сътр., 2007; Sullivan JL, 2007 & 2009). Някои проучвания са установили връзка между повишените нива на хепсидин при възпаление с малка степен при затлъстяване и неалкохолно стеатозно чернодробно заболяване със ССЗ (Bekri S и сътр., 2006; Swinkels DW & Drenth JP, 2008; Barisani D и сътр., 2008; Aigner E и сътр., 2008).

Прилагането на железни препарати при пациенти с ниски нива на серумен хепсидин и белодробна артериална хипертония с желязо-дефицитна анемия подобрява общото състояние и увеличава идържливостта на организма (Veithen T и сътр., 2014).

2.2.8. Хепсидин при злокачествени заболявания.

Пациентите със злокачествени заболявания често имат анемия, най-често свързана с други маркери на възпаление. Проучвания при пациенти с множествен миелом са установили, че нивата на хепсидин се регулират от IL-6 зависими и IL-6 независими механизми, които играят важна роля в развитието на анемия в тези случаи (Sharma S и сътр., 2008; Maes K и сътр., 2010). Заболяването лимфом на Ходжкин се характеризира с ниски нива на IL-6 и е свързано с индукция на хепсидин с развитие на желязо-дефицитна анемия при хронично заболяване. Повишеното ниво на хепсидин не се счита за достатъчна причина за развитие на анемия (Hohaus S и сътр., 2010), предполагайки се, че компенсацията на повишената еритропоеза чрез нарастване на ЕПО продукцията може да обясни липсата на анемия при туморно заболяване, въпреки повишената концентрация на хепсидин (Zucker SD, 2011). При някои проучвания с участие на пациенти с туморни заболявания на терапия с ЕСП, е установен по-добър

отговор на терапията при ниски нива на хепсидин в серума (Ukarma L и сътр., 2009). Тези случаи се различават от установеното при пациенти с ХБЗ, което предполага, че нивата на хепсидин могат да играят роля като предиктивен маркер за установяване на пациенти, които или биха отговорили адекватно на терапия с ЕПО, или подходът би бил изключване на прилаганите ЕСП. Въпреки това все още не е достатъчно добре проучена ролята на хепсидин при туморни заболявания. Необходимо е внимателно подбиране на терапия с ЕСП при пациенти с ХБЗ и терминален стадий на бъбречно заболяване (Nazzari AD и сътр., 2014).

При рак на млечната жлеза се наблюдава желязо-дефицитна анемия. Най-често етиологията на анемията е от възпалението, развиващо се в мястото на туморен растеж. При тях се наблюдават високи нива на серумен хепсидин (Dirugova A и сътр. 2013). При състояния на анемия, свързана със злокачествено заболяване, е установена повишена експресия на растежен диференциращ фактор-15 (GDF15), което води до потискане секрецията на хепсидин и релативно натрупване на желязо в тъканите (Jiang F и сътр. 2014).

2.2.9. Хепсидин и спортна медицина.

Наличието на желязен дефицит е често срещано състояние при атлетите. Няколко биха могли да бъдат причините за това, включително хемолиза, хематурия, изпотяване, гастроинтестинални кръвоизливи (Peeling P и сътр., 2008). Няколко (Roedker L и сътр., 2009; Peeling P и сътр., 2009a & 2009b), но не всички (Trodec MB и сътр., 2009) проучвания показват повишаване на хепсидиновата концентрация в урината след физически упражнения. Това довело Peeling и сътрудници до заключението, че хемолізата предизвикана от упражнения и хепсидиновата експресия може да имат два ефекта. Първо, всеки прием на желязо от макрофагите на RES може да доведе до неговото задържане в клетките, чрез повлияване на хепсидина върху феропортина (транспортера на желязо), възпрепятствайки по този начин върху неговото връщане в циркулацията. Второ, повишената активност на хепсидина след упражненията може да

намали абсорбцията на желязо от храната (Peeling P, 2010). Хепсидинът може да бъде причината за често срещаната се желязо-дефицитна анемия при атлетите.

Физическото натоварване води до промени в организма, наподобяващи микровъзпаление. Това води до известна промяна в хомеостазата на желязо. Проведено проучване показва, че се наблюдава покачване на серумните нива на интерлевкин-6, но не и на хепсидина (Kasprowicz, K и сътр., 2013).

2.2.10. Хепсидин при бременност и гинекологични заболявания

При пациентки с поликистозни яйчници е установено високо ниво на серумно желязо и хепсидин, корелиращо с метаболитните нарушения, които се наблюдават при това състояние (Kim JW и сътр., 2014). Установено е понижаване в секрецията на хепсидин, свързано с развитието на желязо-дефицитна анемия, по-силно изразено във втори и трети триместър на бремеността (van Santen S и сътр., 2013). По време на усложнения на бремеността, като прееклампсия, инфекция от малария, затлъстяване и др., се наблюдава значително покачване на серумните нива на хепсидина, което води до нарушен плацентарен трансфер на желязо (Young MF и сътр., 2012; Koenig MD и сътр., 2014). Допълнителни проучвания доказват отрицателната връзка между затлъстяване при бременост, висок хепсидин при бременната и ниско желязо в кордалната кръв (Dao MC и сътр., 2013). Установена е зависимост между серумните нива на хепсидин по време на бремеността и хода на родилния процес. Високите нива на хепсидин водят до нарастване риска от преждевременно раждане (Koenig MD и сътр., 2014).

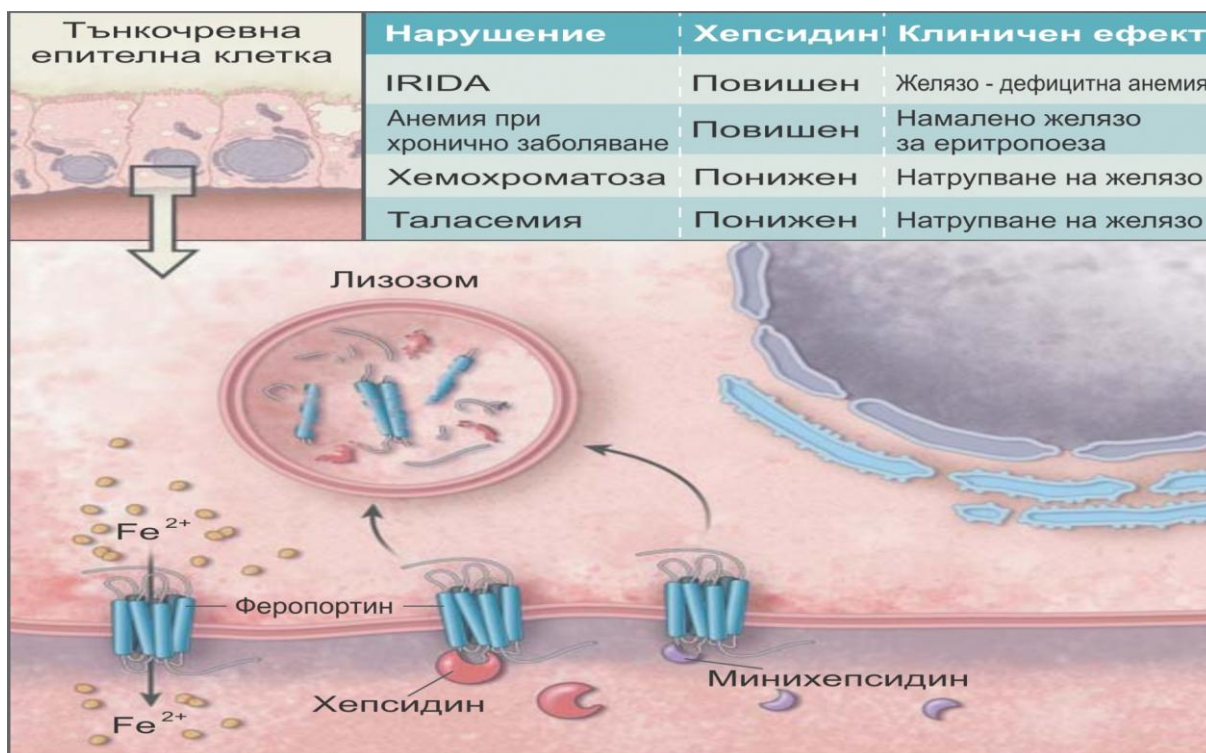
2.2.11. Хепсидин при заболявания на стомашно-чревния тракт

Стомашно-чревните заболявания биват многообразни по своята етиология. Голяма част от тях протичат с елемент на възпаление, което води до промени в секрецията на серумния хепсидин. От друга страна, стомашно-чревният тракт е източник на кръвоизливи и развитие на желязо-дефицитна анемия. С оглед на избор на

подходяща терапия е необходимо количественото определяне на серумен хепсидин (Trabulo D и сътр., 2014).

Противоположно е състоянието при хронични чернодробни заболявания, където се наблюдава намалена секреция на хепсидин от хепатоцитите поради токсичното натрупване на желязо в тях (Радичева МП, 2013).

Информативното съдържание на резултатите от изследване на хепсидин в биологичните течности е в две основни насоки – повишено ниво и понижено ниво на показателя (Фиг. 6 и Таблици 1, 2).



Фигура 6. Схематично представяне на клиничните нарушения в резултат на дисрегулация на хепсидиновата секреция

Таблица 1. Диагностично значение на хепсидин

Заболяване	Очаквана серумна концентрация на хепсидин	Диагностично значение на хепсидин
Класическа наследствена хемохроматоза	Понижена (с компенсация от натрупване на желязо)	Скрининг за наличие на хемохроматоза
		Предиктор кои хомозиготи ще имат натрупване на желязо
		Определя интервала на флеботомия
		Насочва към изследване на генома
Анемии при натрупване на желязо	Понижена (с компенсация от натрупване на желязо след трансфузии)	Идентификация на засегнатите пациенти
		Предиктор и монитор на (паренхимното) натрупване на желязо
Придобити форми на натрупване на желязо	Неуточнен	Маркер за дисрегулация на желязото
ЖРЖДА	Значително повишена	Скрининг за първичен дефект на хепсидиновата регулация
Възпаление и инфекции	Повишена	Диференцира АХЗ от ЖДА
		Насоки по време на заместителната терапия
ХБЗ	Повишена (намалява по време на лечение с ЕПО)	Предиктор на отговора на ЕПО
		Насоки по време на терапията с ЕПО и iv желязо
Остро бъбречно увреждане	Понижено (в урина)	Диагностикана остро бъбречно увреждане
Терапия с антагонисти и агонисти на хепсидина	В зависимост от нарушението	Мониторинг на терапията

Таблица 2. Динамика на желязото и хепсидиновата регулация

Стимулация или подтискане	Секреция на хепсидин	Абсорбция на желязото от дуоденума
Възпаление, инфекция (↑ IL-6)	↑	↓ абсорбция на желязо
Хемохроматоза, хемосидероза (↑ Fe)	↑	↓ абсорбция на желязо
Кървене (↓ Fe)	↓	↑ абсорбция на желязо
Анемия, хипоксемия	↓	↑ абсорбция на желязо
↑ Еритропоеза	↓	↑ абсорбция на желязо

3. Хепсидин – методи за определяне

В съвременната клинично-лабораторна практика изследването на хепсидин в биологични матрици става чрез различни аналитични платформи: първо поколение, полуколичествени методи - SELDI-TOF-MS; второ поколение, количествени методи – мас-спектрометрия в комбинация с хроматография (Q-TOF LC-MS и MALDI-TOF-MS); имуноензимни методи (ELISA); ProteinChip technology.

Въвеждането на изследване на серумните хепсидинови нива в рутинната практика ще доведе до предоставяне на възможност за диагностициране на наследствената и вторична хемохроматоза; при наследствените и придобити анемии с натрупване на желязо; за диагноза, контрол и избор на терапия при желязо-дефицитна анемия; при нарушения, свързани с хепсидиновата секреция и функция.

На този етап за определяне на нива на хепсидин в биологични течности са разработени няколко вида методи, като повечето от тях се базират на платформа,

основана на две големи групи: а) мас-спектрометрия, която включва SELDI-TOF-MS, MALDI-TOF-MS, WCE-TOF-MS, IC-TOF-MS, LC-MS/MS; б) имунохимични методи, които включват (с)ELISA, RIA (Таблица 3).

Таблица 3. Съвременни методи за определяне на хепсидин

Настоящи методи за определяне на хепсидин					
MS	Референции	Имунохимични	Референции	Хепсидин свързващи	Референции
^a MS/MS	Kobold et al. (87) Bansal et al. (88)	c-ELISA	Kroot et al. (13) (Bachem) Ganz et al. (29) Koliaraki et al. (98) Schwarz et al. (99)	Q-TOF LC-MS	Crockett et al. (92)
LC-MS/MS	Murphy et al. (85) Muraio et al. (86) Li et al. (89)	c-RIA	Bushbridge et al. (96) (Bachem) Grebentchikov et al. (97)	HBD assay	De Domenico et al. (43)
MALDI-TOF MS	Kroot et al. (13) Swinkels et al. (30) Anderson et al. (91)	Sandwich ELISA	Butterfield et al. (100)		
SELDI-TOF MS	Campostrini et al. (90) Altamura et al. (94) Ward et al. (95)				

^a UPLC, ultra-high pressure LC; MS/MS, tandem MS; Q, quadrupole; HBD, hepcidin-binding domain.

SELDI-TOF-MS представлява surface enhanced laser desorption / ionization time-of-flight mass-spectrometry. При този метод пробите директно се нанасят върху хидрофилни нормално-фазови чипове (NP20 ProteinChip). Като стандарт за мас-калибрация се използва синтетичен хепсидин-25. Разработен е подвид на този метод, при който първоначално хепсидина се екстрахира от пробата чрез Macro-Prep[®]CM Support beads. Екстрахируваният материал се нанася върху NP20 чипове. Синтетичен пептид хепсидин-24 се използва като вътрешен стандарт.

MALDI-TOF-MS – matrix assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass-spectrometry. При този метод пробите предварително се пречистват с помощта на C8 Clinprot beads. Отчитането става с Cu²⁺ натоварени IMAC чипове.

WCE-TOF-MS – weak cation exchange time-of-flight mass-spectrometry. Този метод използва за вътрешен стандарт синтетичен хепсидин-24.

IC-TOF-MS – immunocapture time-of-flight mass-spectrometry. При този метод се използват заешки хепсидинови антитела, които са прикрепени към протеин A sepharosa beads. Вътрешният стандарт е синтетичен хепсидин-24.

LC-MS/MS – liquid chromatography tandem – MS techniques. Като вътрешен стандарт се използва [¹⁵N, ¹³C₂] Gly-хепсидин (тежък хепсидин). За екстракцията на хепсидин се използват магнитни наночастици (Itkonen O и сътр., 2012).

(c)ELISA – competitive enzyme-linked immunosorbent assay. Ямките са натоварени със синтетичен хепсидин-25 и поликлонални антитела срещу рекомбинантен хепсидин-25. Като второ антитяло се използват анти-заешки антитела маркирани с пероксидаза.

RIA – competitive radio-immunoassay. Използва се маркиран хепсидин-25 с ¹²⁵I в комбинация със заешки анти-хепсидин поликлонални антитела. Синтетичен хепсидин-25 се използва като външен стандарт.

При оценка на хепсидиновите нива с помощта на всички методи възникват някои неудобства: (а) използването на различни калибрационни разтвори с различни нива на стандарти; (б) агрегация на хепсидина към стандартните разтвори или към пробите; (в) свързване на хепсидина към α_2 -макроглобулин или албумин; (г) трудно разграничаване на съществуването на трите изоформи на хепсидина – 25, 22 и 20. Тези фактори оказват най-голямо влияние тези фактори оказват при сравняване на техниките, основани на принципа мас-спектрометрия спрямо имунохимия. Циркулиращият хепсидин в около 90% е свързан с α_2 -макроглобулина в кръвта. Този факт навежда към въпроса кой хепсидин да се изследва – тотален, свързан или несвързан. Голямата разлика в двете основни групи методи имунохимични и мас-спектрометрия се дължи на факта, че все още няма метод от първата група, който със сигурност да направи диференциация между изоформите на хепсидина – биоактивната 25 и неактивните 22 и 20.

В последно време е разработен конкурентен ELISA метод със специфичност на антителата към хепсидин-25. Направено е сравнително определяне на нивата на хепсидин в серума с LC-MS (Koliaraki V и сътр., 2009). Този нов метод е с възможност за по-широка употреба в клиничната практика поради факта, че не е необходимо закупуване на скъпо-струваща платформа за LC-MS. Сандвичевият ELISA метод ще намери широко приложение при диагностиката и проследяване на терапията при различни състояния с нарушена хомеостаза на желязото – ревматоиден артрит, туморни заболявания, наследствена хемохроматоза – случаи, при които много ниското ниво на хепсидин не би могло да бъде установено с други ELISA методи. При пациенти с анемия на хронично заболяване при които няма отговор от прилагания еритропоетин, този метод би могъл да даде отговор на причината за липса на този ефект – а именно със сигурност установени високи нива на хепсидин.

При пациенти с хронично бъбречно заболяване този метод може да предостави по-голяма яснота при избора на терапевтично поведение. Методът е приложим и при отдиференциране на желязо-дефицитна анемия от анемия на хронично заболяване. При пациенти с анемия на хронично заболяване със съчетан желязен дефицит се очаква по-ниска концентрация на хепсидин.

Използването на две антитела в „сандвичев” метод водят до повишаване на специфичността при определяне на биологично активната форма хепсидин-25, отговорна за поддържане на хомеостазата на желязото в организма. Този метод осигурява висока специфичност, долна граница на откриваемост от 0,01 µg/l. На този метод се възлага надеждата да стане част от рутинен панел, използван в автоматизираната лабораторна практика. Този панел може да включва определяне на серумно желязо, феритин, трансфериново насищане и хепсидин-25.

Като заключение може да се отбележи наличието на голямо разнообразие от методите за определяне на хепсидин в биологични течности. В бъдеще предстои тяхната хармонизация с помощта на няколко стъпки: а) въвеждане на вътрешен стандарт, основан на принципа на мас-спектрометрията; б) уеднаквяване на нивата на стандарти и калибратори, въведени в практиката; в) производство на калибратор,

наподобяващ човешки серум; г) въвеждане на междулабораторен качествен контрол за този показател – хепсидин.

4. Хепсидин модулиращи агенти

Терапията, насочена към коригиране на хепсидиновото ниво в организма ще доведе до подобрене на нарушената хомеостаза на желязо при пациентите. Въпреки, че все още не са установени терапевтични методики, няколко подхода са в процес на разработване – това са хепсидинови агонисти и антагонисти (Nemeth E, 2010; Pietrangelo A, 2011). Агонистите на хепсидина биха могли да се използват за превенция от натрупване на желязо в организма, в резултат на дефицит в секрецията на хепсидина. Това са заболявания като наследствена хемохроматоза, β -таласемия майор и други анемии с натрупване на желязо, включително някои придобити форми на не-хемохроматозно увеличение на желязото в тъканите и органите. Хепсидиновите антагонисти от друга страна, биха намерили приложение при състояния, протичащи с повишено количество на хепсидин в организма и протичащи със системно намаляване на желязото в серума и тъканите. Това са заболявания като желязо-рефрактерна желязо-дефицитна анемия (IRIDA), анемия на хронично заболяване (АХЗ), включваща ревматоидни заболявания, възпалителни заболявания на стомашно-чревния тракт, автоимунни заболявания; хронично бъбречно заболяване (ХБЗ), множествен миелом и други злокачествени заболявания; железен дефицит при затлъстяване и сърдечно-съдови заболявания (CVD).

4.1. Агонисти на хепсидина

Преклинични и някои клинични проучвания показват напредък в изолирането на синтетичен хепсидин-25, малки хепсидинови пептиди, агонисти на BMP, стабилизатори на HIF, които целят предотвратяване на натрупване на желязо, настъпило в резултат на дефицит на хепсидин. Малките хепсидинови пептиди,

основани на аминок-терминални последователности, показват агонистично действие при миши модели *in vivo* (Nemeth E, 2010). Установено е, че свръхекспресията на хепсидин при β -таласемия интермедиа при миши модели намалява натрупването на желязо и дори подобрява неефективната еритропоеза (Gardenghi S и сътр., 2010).

Концентрациите на хепсидина могат да бъдат променени чрез влияние върху сигналния път BMP (Фигура 3). Прилагането на BMP-2 при миши модели води до повишаване на чернодробната експресия на хепсидин и намалява концентрацията на желязо *in vivo* (Babitt JL и сътр., 2007). Супра-физиологични дози на BMP-6 за 10 дни подобрява дефицита на хепсидин, редуцира серумното желязо и води до преразпределяне на желязото в тъканите (ретикуло-ендотелни макрофаги, слезка) при миши модели с HFE хемохроматоза (Corradini E и сътр., 2010). Антагонисни на HIF се използват при злокачествени заболявания, с цел подтискане на туморната ангиогенеза (Semenza GL, 2006). Блокирането на HIF би могло да повиши концентрацията на хепсидина при състояния на натрупване на желязо.

4.2. Антагонисти на хепсидина

Преклинични и клинични проучвания показват, че хепсидинови антагонисти като антитела срещу хепсидин, антагонисни на BMP, антитела срещу цитокиновите рецептори и стабилизатори на HIF, могат да доведат до намаляване на хепсидиновата експресия и да коригират патологичните промени на желязния статус (Babitt JL и сътр., 2007; Sasu BJ и сътр., 2010; Yu PB и сътр., 2008; Fatih N и сътр., 2010; Song SN и сътр., 2010; Hashizume M и сътр., 2010; Poli M и сътр., 2011).

Направено е проучване, което предлага използване на анти-хепсидинова терапия с / или без комбинация от прилагане на ECA, което би подобрило отговора на еритропоезата и би позволило прилагането на по-ниски дози ЕПО (Sasu BJ и сътр., 2010). Някои вещества могат да оказват влияние върху сигналния път BMP-SMAD. Прилагането на Dorsomorphin, представляващ инхибитор на BMP сигнала,

предотвратява индукцията на хепсидин от статуса на желязо при миши модели (Yu PB и сътр., 2008). GDF-15 и TWSG-1 са антагонисти на BMP; те се секретират от еритробластите и могат да подтиснат хепсидиновата експерия *in vitro*. Тези протеини биха могли да имат терапевтичен потенциал. Разтворимият HJV също действа като антагонист на BMP сигнала, намалявайки експерията на хепсидин при миши модели, мобилизирайки депата на желязо в ретикуло-ендотелната система (слезка), повишавайки съдържанието на желязо в черния дроб и конкурентно повишава серумната му концентрация (Babitt JL и сътр., 2007). Установено е, че хепарин и хепаринови производни могат да подтискат хепсидиновата експерия *in vitro* и *in vivo* чрез влияние върху сигналния път на BMP (Poli M и сътр., 2011). Анти-интерлевкин-6 антитела (tocilizumab) може да подтиска IL-6 индуцираната хепсидинова секреция при заболяването на Catleman (рядко срещано състояние със системно възпаление и анемия) и подобрява анемичния синдром при експериментални модели с маймуни (Song SN и сътр., 2010; Hashizume M и сътр., 2010). Инхибитори на водещия инициатор на клетъчния отговор на хипоксия като пролил-хидроксилаза предпазват инактивацията и разрушаване на HIF и биха могли да бъдат ефективни супресори на хепсидина, възстановявайки обмяната на желязо при анемия (Braliou GG и сътр., 2008). Необходими са по-задълбочени проучвания и въвеждане на постигнатите резултати от експерименталните животински модели към клиничната практика при хора (Tjalsma H и сътр., 2011).

5. Изработване на референтни граници

По-съществените етапи в процеса на практическото изработване на референтните граници са: 1) Подбор на клинично-здрави индивиди. 2) Подготовката им и вземането на материал за изследване. 3) Контрол на аналитичната вариация по време на изследването. 4) Статистическа обработка на получените стойности и определяне границите на референтната област. 5) Представяне границите на референтната област и използването им при сравняване на наблюдавания лабораторен резултат от тях.

За практическите подходи във всеки един от тези етапи има публикувани теоретично обосновани препоръки на Експертната група по теория на референтните стойности към IFCC (Dybkaer K, 1973 и 1979; Gräsbeck R и сътр., 1979; Petit Clerc C и сътр., 1984; Solberg HE, 1988).

Изследването на хепсидина в биологичен материал се характеризира с редица специфични особености, които следва да се имат предвид във всеки един етап от изработването на референтните му граници. Подборът на референтните случаи обикновено се извършва ретроспективно, т.е. от голяма група вече изследвани лица чрез съответни за определяния параметър критерии, или проспективно, т.е. от общата популация чрез съответните критерии. Проспективният метод е по-достъпен и икономичен, но изисква грижлив подбор на критериите за включване и изключване. При прилагането им за определяне референтните граници на хепсидин освен общо препоръчаните критерии за изключване като бъбречна недостатъчност, хроничен възпалителен процес, чернодробна недостатъчност, желязо-дефицитна анемия, хемоглобинопатия, следва да се включат и критерии относно експозицията с желязни препарати – хранителна, битова, професионална.

Поддържането на аналитичната вариация и точността на използваните методи в допустими граници на изработването на референтните стойности се осъществява с помощта на системен вътрелабораторен качествен контрол (Меньшиков ВВ, 1981; Buttner J и сътр., 1998). Контролът на точността на определянето на хепсидин в кръвен серум е затруднен поради липса на подходящи контролни материали. Проверка на

точността в този случай следва да се извърши чрез сравнение с друг метод, основаващ се на различен принцип (Mertz W, 1995).

Върху получените резултати, респективно референтната област, основана на еднократно изследване на репрезентативна група лица, оказват влияние освен аналитичната вариация и редица други фактори (Таблица 4). Всички тези фактори следва да се описват, наблюдават и контролират в процеса на изработване на референтните граници.

Таблица 4. Фактори, оказващи влияние върху клинично-лабораторния резултат (по Keller H, 1974)

Пациент				Материал за изследване	Проба
Индивидуални фактори					
Постоянни	Дълготрайни		Краткотрайни		
Пол	Възраст	Малформации	Нахранване	Вземане	Подготовка
Раса	Тегло	Заболявания	Физическо натоварване		
	Начин на живот	Медикаменти	Стрес	Обработка	Анализ
			Преданалитична		
Биологична вариация				Вариация	
				Грешки	

За определяне границите на референтната област на хепсидин в кръвен серум са използвани статистическите методи, препоръчвани от Експертната група по теория на референтните стойности (EPTRV) към Международната федерация по клинична химия (IFCC). Алгоритъмът на препоръчвания от EPTRV и използван от нас метод за определяне на референтни граници е представен на Фигура 18. Този алгоритъм лежи в основата на разработената от Solberg (1983) 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.

III. 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 набеязани 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.

IV. Материал

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 хемодиализа;
- 40 пациенти с ревматоиден артрит;
- 15 пациенти с желязо-дефицитна анемия;
- 10 пациенти с β -таласемия майор.

1.2. Проучвания при здрави индивиди

Определяне границите на референтната област на изследвания хепсидин в кръвен серум при клинично здрави лица.

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 5. Изследванията са проведени в периода 2012 - 2014 г.

Таблица 5. 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

За оценка на здравословното състояние на клинично здравите индивиди от българска националност се използват предварително подбрани критерии:

- За изключване 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) (Levey AS и сътр., 2009);
- За изключване на възпалителен процес – определяне на CRP;
- За изключване на чернодробно заболяване – определяне на чернодробните ензими АСАТ и АЛАТ;
- За изключване на диабет – определяне нивото на серумна глюкоза, еднократно, сутрин, на гладно;
- За изключване на нарушена хомеостаза на желязото – определяне на желязо и ТЖСК, феритин, трансферин, разтворими трансферинови рецептори;
- При определяне на референтните граници на хепсидин освен общо препоръчваните 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.
- Изследване на пълна кръвна картина с допълнителни показатели:
 - ✓ ретикулоцити – абсолютен брой и процентно съдържание;

- ✓ ниво на хемоглобин в ретикулоцити;
- ✓ хемоглобин;
- ✓ общ брой червени кръвни клетки;
- ✓ хематокрит;
- ✓ цитометрични показатели – MCV, MCH, MCHC.

За всеки клинично здрав индивид бе попълван формуляр за събиране на данни, включващ:

- имена
- пол
- възраст
- дата и час на вземане на биологичен материал
- наличие на заболяване, свързано с нарушена хомеостаза на желязото
- прием на медикаменти, съдържащи желязо
- прием на витамини
- предшестващо кръвопреливане
- тютюнопушене

Формулярът за събиране на данни за клинично здрав доброволец за определяне на референтни граници на хепсидин в кръвен серум в българската популация е изработен от В. Манолов, Б. Атанасова и В. Василев, въз основа на препоръките на Скандинавския комитет по референтни стойности (Alström T и сътр., 2009) и собствени съображения. Клинично здравите лица подписаха 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, серумна 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.

1.2. Проучвания при болни с анемия при хронично бъбречно заболяване (стадии II до V), ревматоиден артрит, желязо-дефицитна анемия и β -таласемия майор.

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 6.

Таблица 6. 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)	Мъже	Жени
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	Мъже	Жени
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	Мъже	Жени
Брой	7	3
Минимална възраст (в год.)	23	25
Максимална възраст (в год.)	36	40
Средна възраст (в год.)	30	30,7

Продължение на Таблица 6. Разпределение на изследваните болни с различни патологични нарушения в обмяната на желязото по пол и възраст

Пациенти с ревматоиден артрит	Мъже	Жени
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. Всички пациенти, участващи в проучването подписаха информирано съгласие, съгласно декларацията от Хелзинки (Директива 2001/20/ЕО).

За оценка на здравословното състояние на пациентите с анемия при различни патологични състояния бяха използвани предварително подбрани критерии:

- За оценка 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) (Levey AS и сътр., 2009);
- 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) (Schipper LG и сътр., 2010);

- За определяне на активността на възпалителен процес – опереляне на CRP;
- За оценка на налично чернодробно заболяване – определяне на чернодробните ензими АСАТ и АЛАТ;
- За оценка на наличен диабет – определяне нивото на серумна глюкоза, еднократно, сутрин, на гладно;
- За оценка на степента на нарушение на хомеостаза на желязото – определяне на желязо и ТЖСК, феритин, трансферин, разтворими трансферинови рецептори.
- Изследване на пълна кръвна картина с допълнителни показатели:
 - ✓ ретикулоцити – абсолютен брой и процентно съдържание;
 - ✓ ниво на хемоглобин в ретикулоцити;
 - ✓ хемоглобин;
 - ✓ общ брой червени кръвни клетки;
 - ✓ хематокрит;
 - ✓ цитометрични показатели – MCV, MCH, MCHC.

За всеки пациент с анемия при различни патологични състояния бе попълван формуляр за събиране на данни, включващ:

- имена
- пол
- възраст
- дата и час на вземане на биологичен материал
- наличие на заболяване, свързано с нарушена хомеостаза на желязото
- прием на медикаменти, съдържащи желязо
- прием на витамини
- предшестващо кръвопреливане
- тютюнопушене
- период на включване на хемодиализа

Формулярът за събиране на данни за пациент с патологично състояние в обмяната на желязо е изработен от В. Манолов, Б. Атанасова и В. Василев, въз основа на препоръките на Скандинавския комитет по референтни стойности (Alström T и сътр., 2009) и собствени съображения. Клинично здравите лица подписваха информирано съгласие, съгласно декларацията от Хелзинки (Директива 2001/20/ЕО).

Клинико-химичните показатели са определяни 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 се взима сутрин, между 08,00 и 09,00 часа на гладно. За целта се използват игли за еднократна употреба и вакутейнери (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, серумна 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 опеределяне 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.

V. Методи

1. Методи за определяне на клиничко-химични показатели

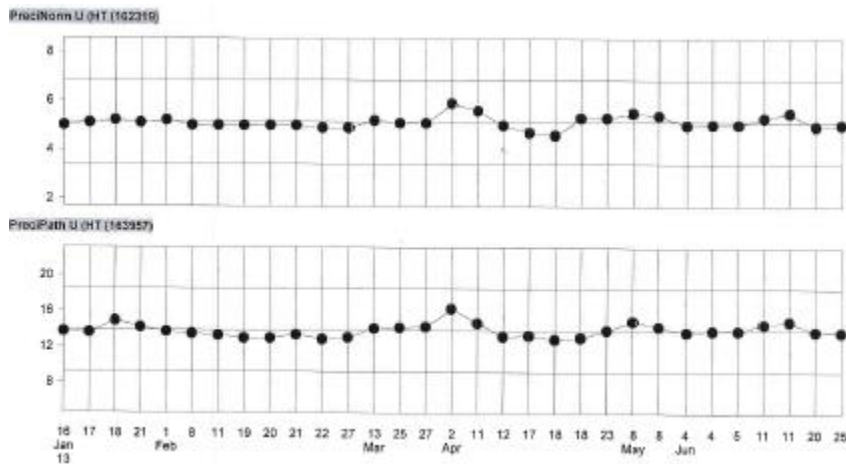
За определяне на **клиничко-химични показатели в серум** – серумна глюкоза, чернодробни ензими (АСАТ и АЛАТ), креатинин бе използвана венозна кръв, взета във вакуети с активатор на съсирването и сепарационен гел. След 40 минутен престой на стайна температура (20°C), вакуетите бяха центрофугирани на 4000 об./15 min. 250 µl от отделения серум бе прехвърлен във вторична епруветка тип „Епендорф“ за определяне на серумни концентрации на глюкоза, АСАТ, АЛАТ, креатинин, CRP, трансферин, феритин, разтворими трансферинови рецептори. Останалото количество серум бе замразявано за определяне на серумни нива 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 об./15 min. 500 µl от получената плазма се използват за определяне на желязо. За измерването на ТЖСК се използват 500 µl от плазмата.

1.1. Определяне на глюкоза

Определянето на глюкоза се извършва по ензимен, референтен метод с хексокиназа. Отчитането се извършва на биохимичен анализатор Cobas Integra 400 на Hoffmann-La Roche Ltd след отчитане на контролен материал в две нива (нормално и патологично). Обявени стойности за нормален контролен материал Precinorm U (лот № 162319 версия 1): 4,36 mmol/l – 5,92 mmol/l; \bar{x} средно - 5,14 mmol/l. Обявени стойности за патологичен контролен материал Precipath U (лот № 163957 версия 1): 11,8 mmol/l – 16,00 mmol/l; \bar{x} средно – 13,9 mmol/l.



Фигура 8. Контролна карта за ВЛКК на глюкоза

Таблица 7. Статистическа оценка на контролна карта за ВЛКК на глюкоза

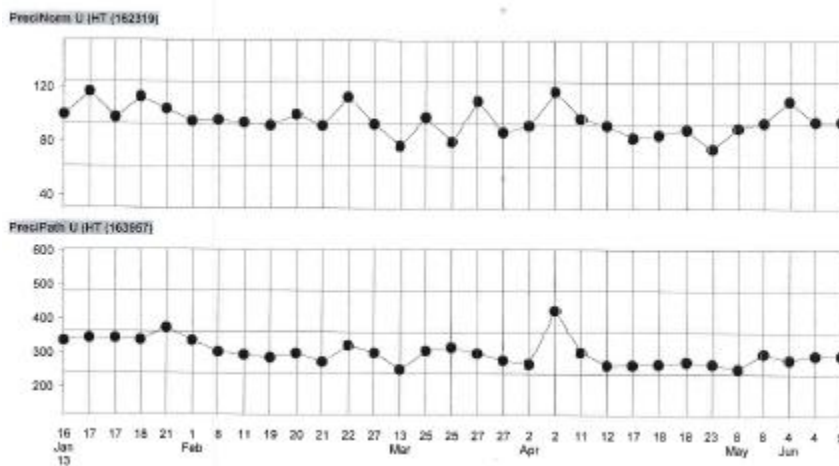
Статистика	\bar{x}	CV%	n
PreciNorm U	5,12 mmol/l	4,9	31
PreciPath U	13,87 mmol/l	5,3	31

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. Отчитането се извършва на биохимичен анализатор Cobas Integra 400 на Hoffmann-La Roche Ltd след отчитане на контролен материал в две нива (нормално и патологично). Обявени стойности за нормален контролен материал Precinorm U (лот № 162319 версия 1): 76,4 $\mu\text{mol/l}$ – 110,0 $\mu\text{mol/l}$; \bar{x} средно – 93,2 $\mu\text{mol/l}$. Обявени стойности за патологичен контролен материал Precipath U (лот № 163957 версия 1): 298,0 $\mu\text{mol/l}$ – 430,0 $\mu\text{mol/l}$; \bar{x} средно – 364,0 $\mu\text{mol/l}$.

Преди отчитането на креатинин в урина, биологичният материал се разрежда с дестилирана вода в съотношение 1:10. Получените резултати от креатинин в еднократна порция урина се умножават по 11. Стойностите се изразяват в mmol/l.

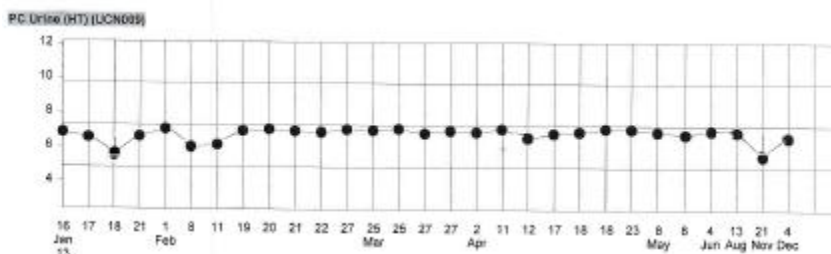
Отчитането се извършва на биохимичен анализатор Cobas Integra 400 на Hoffmann-La Roche Ltd след отчитане на контролен материал в едно ниво. Обявени стойности за контролен материал Level 1 (лот № UCN009): 5.84 mmol/l – 8.76 mmol/l; \bar{x} средно – 7.30 mmol/l.



Фигура 9. Контролна карта за ВЛКК на креатинин в серум

Таблица 8. Статистическа оценка на контролна карта за ВЛКК на креатинин в серум

Статистика	\bar{x}	CV%	n
PrciNorm U	96,04 $\mu\text{mol/l}$	9,9	31
PrciPath U	303,42 $\mu\text{mol/l}$	10,8	31



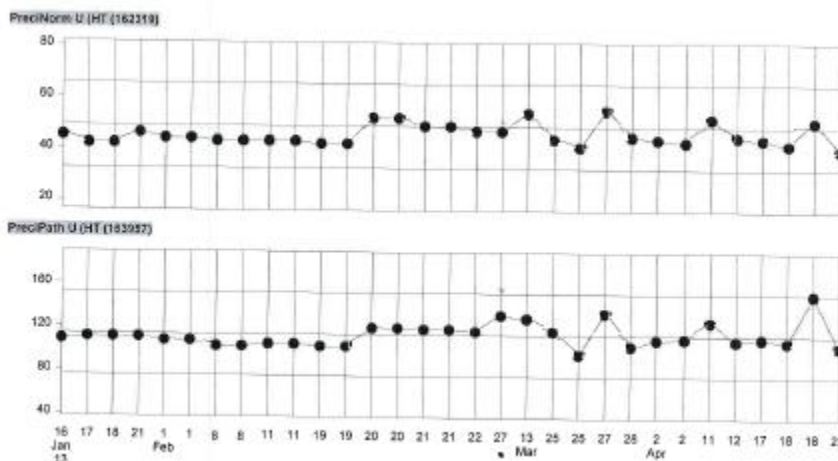
Фигура 10. Контролна карта за ВЛКК на креатинин в урина

Таблица 10. Статистическа оценка на контролна карта за ВЛКК на АСАТ

Статистика	\bar{x}	CV%	n
PreciNorm U	48,9 U/l	8,3	31
PreciPath U	158,7 U/l	11,3	31

1.4. Определяне на АЛАТ (ALT)

Определянето на чернодробен ензим АЛАТ (ALT) 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. Отчитането се извършва на биохимичен анализатор Cobas Integra 400 на Hoffmann-La Roche Ltd след отчитане на контролен материал в две нива (нормално и патологично). Обявени стойности за нормален контролен материал Precinorm U (лот № 162319 версия 1): 40,2 U/l – 57,6 U/l; \bar{x} средно – 48,9 U/l. Обявени стойности за патологичен контролен материал Precipath U (лот № 163957 версия 1): 93,0 U/l – 135,0 U/l; \bar{x} средно – 114,0 U/l.



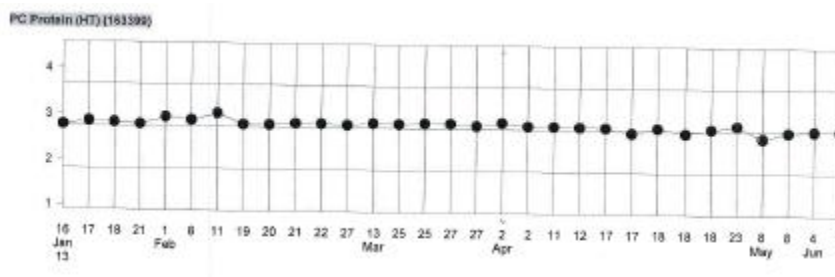
Фигура 12. Контролна карта за ВЛКК на АЛАТ

Таблица 11. Статистическа оценка на контролна карта за ВЛКК на АЛАТ

Статистика	\bar{X}	CV%	n
PreciNorm U	46,1 U/l	11,9	31
PreciPath U	115,2 U/l	11,5	31

1.5. Определяне на трансферин

Определянето на трансферин се извършва чрез имунотурбидиметричен метод. Човешкият трансферин аглутинара със специфичен антисерум. Отчитането се извършва на биохимичен анализатор Cobas Integra 400 на Hoffmann-La Roche Ltd след отчитане на контролен материал в едно ниво. Обявени стойности за контролен материал PreciNorm Protein (лот № 163399 версия 1): 2.24 g/l – 3.26 g/l; \bar{x} средно – 2.75 g/l.



Фигура 13. Контролна карта за ВЛКК на трансферин

Таблица 12. Статистическа оценка на контролна карта за ВЛКК на трансферин

Статистика	\bar{X}	CV%	n
PreciNorm Protein	2,802 g/l	4,6	31

1.6. Определяне на CRP

Определянето на С-реактивен протеин (CRP) се извършва чрез имунотурбидиметричен метод. Човешкият CRP аглутинара с латексови частици,

натоварени с моноклонални анти-CRP антитела. Отчитането се извършва на биохимичен анализатор Cobas Integra 400 на Hoffmann-La Roche Ltd след отчитане на контролен материал в едно ниво. Обявени стойности за контролен материал Precinorm Protein (лот № 163399 версия 1): 7.22 mg/l – 10.82 mg/l; \bar{x} средно – 9.02 mg/l.



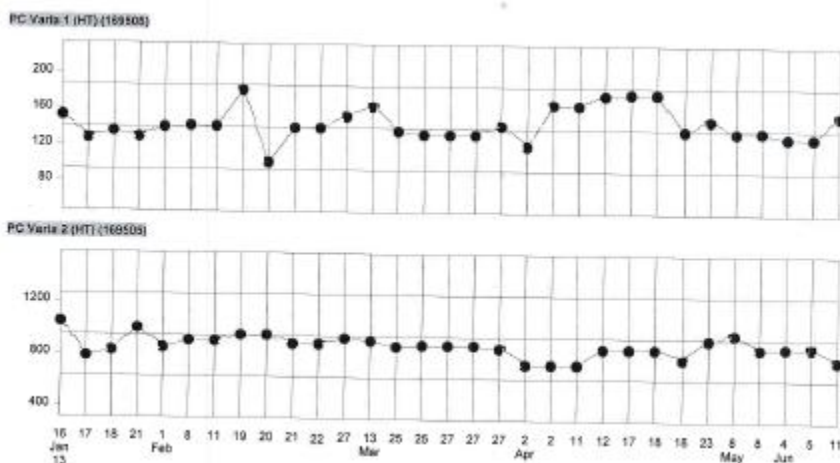
Фигура 14. Контролна карта за ВЛК на С-реактивен протеин

Таблица 13. Статистическа оценка на контролна карта за ВЛК на С-реактивен протеин

Статистика	\bar{X}	CV%	n
PreciNorm Protein	11.059 mg/l	4.3	31

1.7. Определяне на феритин

Определянето на феритин се извършва чрез електро-хемилюминесцентен метод на сандвичев принцип. Отчитането се извършва на имунологичен анализатор Cobas Elecsys 2010 на Hoffmann-La Roche Ltd след отчитане на контролен материал в две нива (нормално и патологично). Обявени стойности за нормален контролен материал Precicontrol Varia 1 (лот № 169505): 102 ng/ml – 178 ng/ml; \bar{x} средно – 140 ng/ml. Обявени стойности за патологичен контролен материал Precicontrol Varia 2 (лот № 169505): 691 ng/ml – 1201 ng/ml; \bar{x} средно – 946 ng/ml.



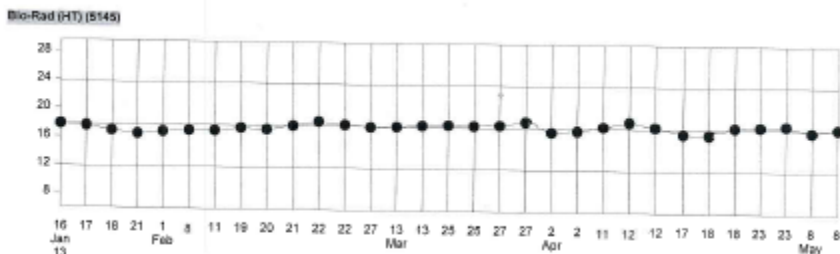
Фигура 15. Контролна карта за ВЛКК на феритин

Таблица 14. Статистическа оценка на контролна карта за ВЛКК на феритин

Статистика	\bar{X}	CV%	n
PreciControl Varia 1	144,03 ng/ml	12,8	31
PreciControl Varia 2	862,68 ng/ml	10,1	31

1.8. Определяне на серумно желязо

Определянето на серумно желязо се извършва с пламъков атомно-абсорбционен спектрофотометър Analyst 300 на Perkin-Elmer. Отчитането се извърши след построяване на калибрационна крива и определяне на контролен материал с обявена стойност 17.8 $\mu\text{mol/l}$.



Фигура 16. Контролна карта за ВЛКК на серумно желязо

Таблица 15. Статистическа оценка на контролна карта за ВЛКК на желязо

Статистика	\bar{X}	CV%	n
Bio-Rad	18,17 $\mu\text{mol/l}$	5,3	31

1.9. Определяне на ТЖСК

Определянето на тотален желязо-свързващ капацитет се извършва с пламъков атомно-абсорбционен спектрофотометър Analyst 300 на Perkin-Elmer. Отчитането се извършва след построяване на калибрационна крива.

1.10. Определяне на процентно трансфериново насищане

За определяне на процентно трансфериново насищане се използват измерените 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:

$$\text{A) TSAT \%} = (\text{Fe} / \text{ТЖСК}) \times 100$$

Изчислението на TSAT чрез серумно желязо и трансферин се извършва по формулата:

$$\text{Б) TSAT \%} = ((\text{Fe} / (\text{TRSF}/0.01)) \times 398)$$

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

Изчисляването на индекса на разтворими трансферинови рецептори се извърши с помощта на формулата

$$(i)sTfr [\text{mg/ng}] = \text{solTRfr} / \text{Ferritin}$$

1.12. Изчисляване на индекс хепсидин / феритин

Изчисляването на индекс хепсидин / феритин се извърши с помощта на формулата:

$$\text{Hepcidin / Ferritin } [\mu\text{g/ng}] = \text{хепсидин} / \text{феритин}$$

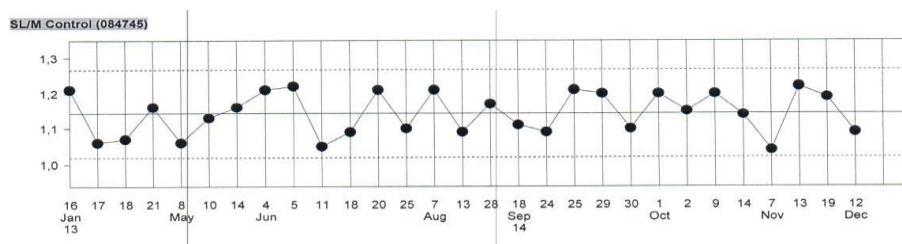
1.13. Изчисляване на индекс процентно трансфериново насищане / хепсидин

Изчисляването на индекс процентно трансфериново насищане / хепсидин се извърши с помощта на формулата:

$$\text{TSAT / Hepcidin } [\%/\mu\text{g}] = \text{процентно трансфериново насищане} / \text{хепсидин}$$

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. Образованите комплекси разсейват преминаващата светлина през реакционната смес. Интензитетът на разсейване на светлината е пропорционален на количеството разтворими трансферинови рецептори. Отчитането се извършва на анализатор BN ProSpec на Siemens Healthcare след отчитане на контролен материал. Обявени стойности за нормален контролен материал N/T Protein Control SL/M (лот № 084745): 1,02 mg/l – 1,38 mg/l; \bar{x} средно – 1,2 mg/l.



Фигура 17. Контролна карта за ВЛКК на серумно желязо

Таблица 16. Статистическа оценка на контролна карта за ВЛКК на желязо

Статистика	\bar{X}	CV%	n
N/T Protein Control SL/M	1,143 mg/l	5,3	29

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, еритроцитни индекси (MCV, MCH и MCHC), 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

Химични реакции

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 (RBC)

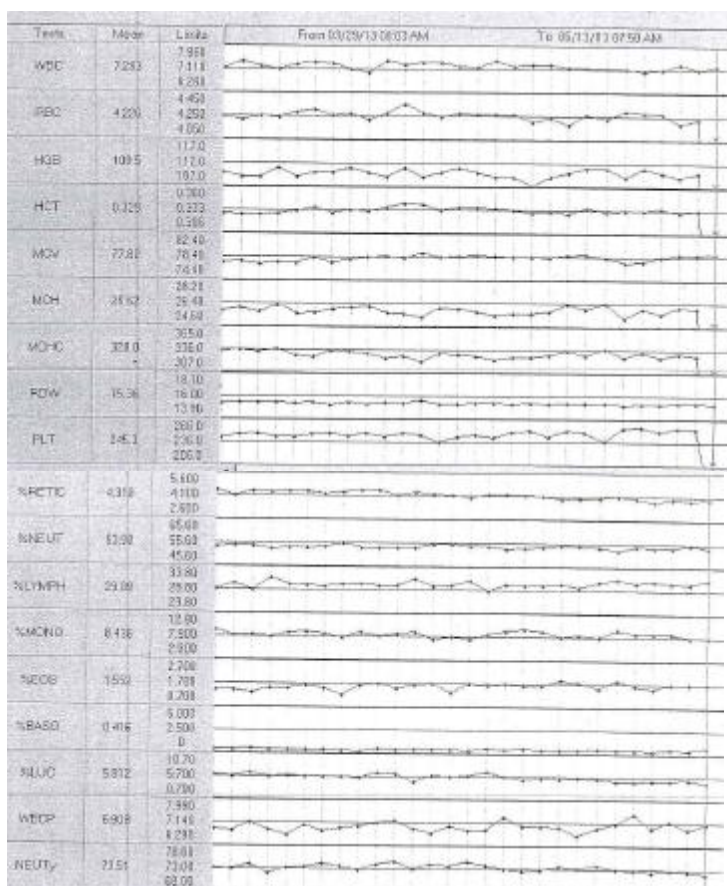
Еритроцитите се изброяват изоволуметрично чрез отчитане на разсеяната светлина под малък ъгъл (2° - 3°) и под голям ъгъл (5° - 15°). Използвайки теорията на Mie за разсейване на светлината за хомогенни сфери, измерването на разсейването на

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 (RNA).

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.



Фигура 18. Контролна карта за ВЛКК на хематологични показатели

Таблица 17. Статистическа оценка на контролна карта за ВЛКК на хематологични показатели

Статистика	\bar{X}	CV%	n
HemControl RBC	4,25 x10 ¹² /l	8,5	26
HemControl HGB	112,0 g/l	6,6	26
HemControl HCT	0,333 l/l	7,5	26
HemControl MCV	78,40 fl	7,1	26
HemControl MCH	26,40 pg	6,9	26
HemControl MCHC	336,0 g/l	7,0	26
HemControl RETIC	4,1 %	5,0	26

3. Определяне на хепсидин

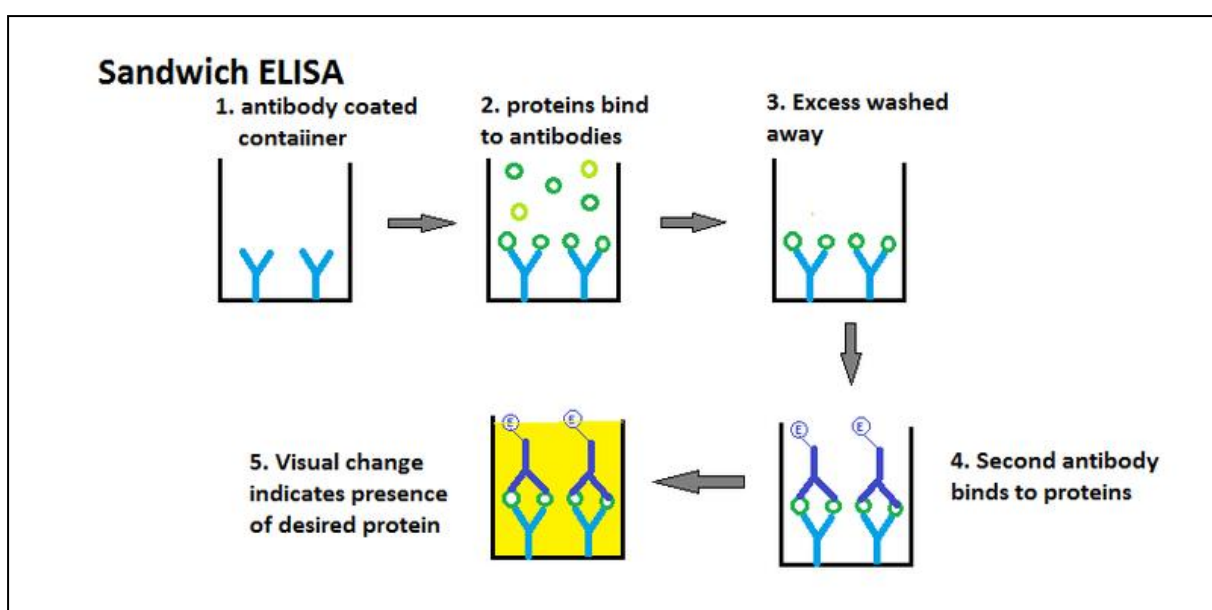
Принципът на имунологичния метод ELISA се основава на реакцията антиген – антияло чрез белязани антители. Обикновено се белязва не самото антияло, което реагира с антигена и се нарича първо антияло, а специално получено анти-имуноглобулиново антияло, което реагира с първото антияло и се нарича второ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

Тя е удобна за рутинни клинични тестове и може да се провежда не само като качествен, а и като количествен метод.

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 отсмукуват и в тях се нанася разтворът на първото антитяло. Дава му се време да реагира с антигена, след което се отсмукува 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 19. Схема на конкурентен ELISA метод за количествено определяне на хепсидин

На различните етапи от реакцията се поставят контроли – ямки без антиген, първо антитяло или/и второ антитяло. След като цветната реакция се развие, ямките-проби се сравняват с контролите. Точното отчитане на резултата се извършва с помощта на фотометър. Има специални фотометри за тази цел, наречени "четци на ELISA", в които вместо традиционната кювета се слага самата плака.

ELISA спада към т. нар. твърдофазови имунологични методи. Общо за тях е, че в началото антигенът или антитялото се адсорбира върху някаква повърхност. После на

всеки етап реагентите, които не са се свързали специфично, могат лесно да се отмият, докато свързаните остават в комплекс върху повърхността.

За определяне на хепсидин се използва ELISA метод на „сандвичев“ принцип. Микроплаката е натоварена с антитела специфични за човешки хепсидин-25.

Предварителна подготовка на реактивите и пробите

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, Radboud University Medical Centre; Nijmegen, Холандия) се разтваря с 1,0 ml дилуент стандарт. Оставя се за 10 min 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 об./10 min.
- ✓ Пробите се разреждат предварително с PBS буфер с pH 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 min 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 min 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.

При валидиране на метода за определяне на хепсидин се построява калибрационна крива от 7 стандарта с двукратно определяне. Бланката се отчита десетократно за определяне на Limit of Detection (LoD). Стандарти от 0.0625 µg/l, 0.500 µg/l и 2 µg/l се накапват десетократно за определяне на Low Level Of Quantification (LLOQ), Middle Point Of Quantification (MPQ) и Upper Level Of Quantification (ULOQ). Проби на здрави доброволци и пациенти с патологични състояния на обмяната на желязо предварително разредени с буфер PBS, pH 7.4 са определени двукратно.

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 чрез метода recovery (добавено/намерено)
- ✓ Невъзпроизводимост на метода в серия
- ✓ Невъзпроизводимост на метода между различни аналитични серии
- ✓ Определяне стабилността на изследвания материал

4. Метод на статистически анализ

1. 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 (EPTRV) към Международната федерация по клинична химия (IFCC). На фигура 20 е представен алгоритъмът на препоръчвания от EPTRV и използван от нас метод за определяне на референтни граници. Този алгоритъм лежи в основата на разработената от Solberg (1983) 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 (стъпка 3) 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 (стъпка 4) се използва визуална оценка на хистограмата както и съответни математически тестове.

Изборът на статистически метод за определяне на референтни граници (стъпка 5) 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 0,90 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).

2. Статистически методи, използвани при анализа на клиничния материал

За статистическата обработка на получените резултати от проучванията при болни 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.

3. 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:

a. **ROC крива** – за определяне праговата стойност на количествените признаци.

b. **Критерии за валидизация на скрининг тестове**

За оценяване **валидността** на скринирация (диагностициращия) тест се използват следните критерии (Шипковенска Е и сътр., 2002):

- Чувствителност;
- Специфичност;
- Положителна предсказваща стойност;
- Отрицателна предсказваща стойност;
- Точност (% на верните отговори).

Таблица 18. Възможни резултати от теста

Резултати от теста	Със заболяване	Без заболяване	Общо
Положителен	a истински положителни	b фалшиво положителни	a+b
Отрицателен	c фалшиво отрицателни	d истински отрицателни	c+d
Общо	a+c	b+d	a+b+c+d

Чувствителността (Sensitivity) представлява способността на теста да открива лицата със заболяване. Измерва се с вероятността за *позитивен* тест при скринираните болни лица:

$$Se = \frac{a}{a + c}$$

Специфичността (Specificity) характеризира способността на теста да открива здравите лица. Измерва се с вероятността за *отрицателен* тест при скринираните здрави лица:

$$Sp = \frac{d}{b + d}$$

Положителната предсказваща стойност (*Positive predictive value*) на теста се измерва с вероятността за *наличие на заболяване* при лицата с *положителен тест*:

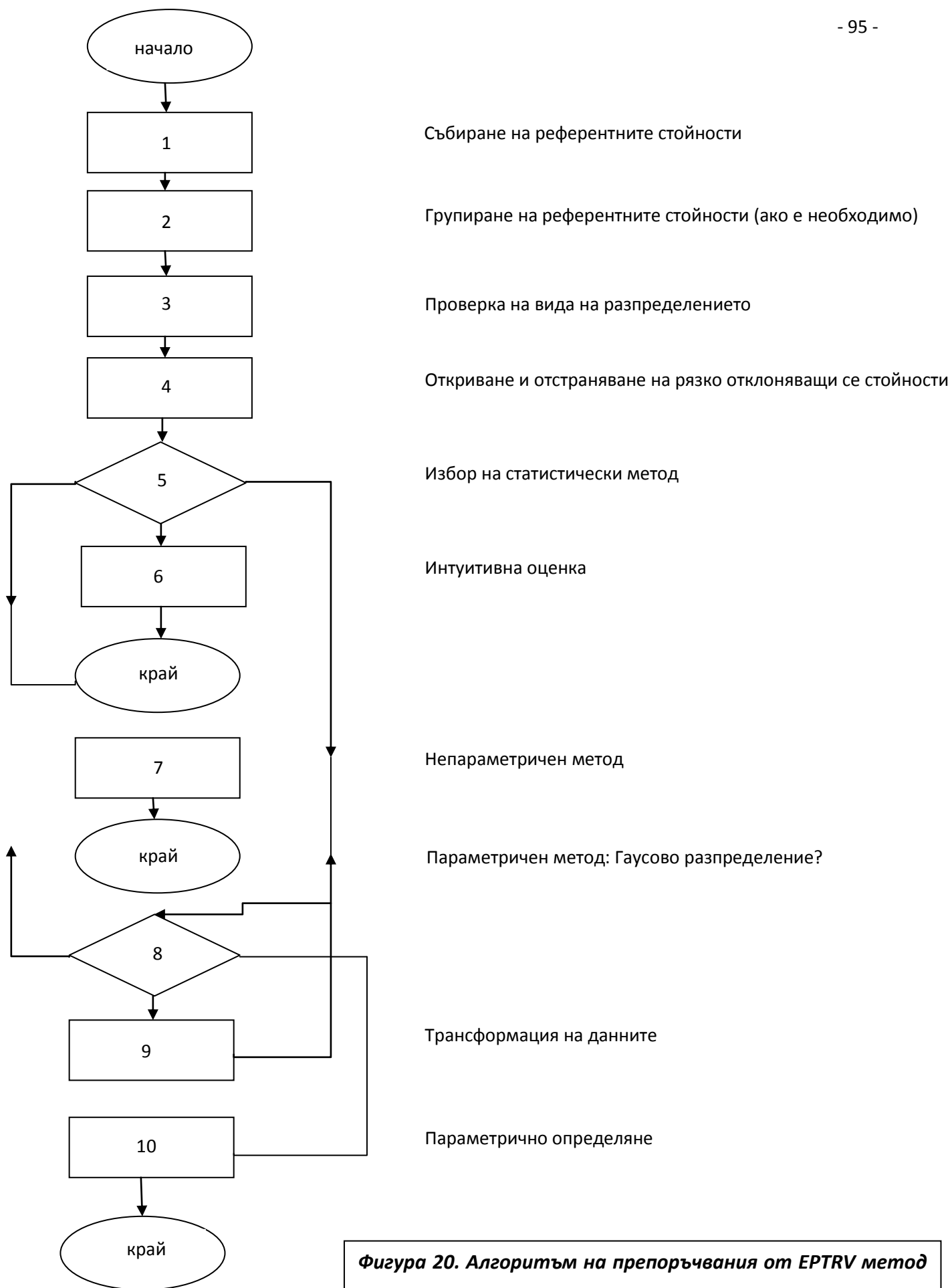
$$PV = \frac{a}{a + b}$$

Отрицателната предсказваща стойност (Negative predictive value) на теста се измерва с вероятността за *отсъствие на заболяване* при лицата с *отрицателен тест*:

$$NV = \frac{d}{c + d}$$

Точност (Accuracy) – относителен дял на верните отговори:

$$Ac = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$



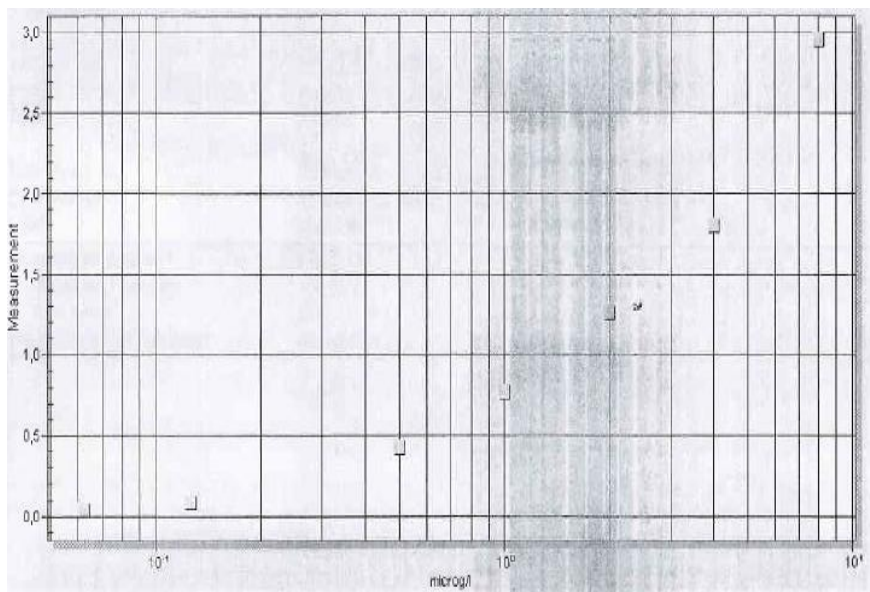
Фигура 20. Алгоритъм на препоръчвания от EPTRV метод за определяне на референтните граници (Solberg HE, 1983)

VI. 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 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, 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 µg/l, 4 µg/l, 2 µg/l, 1 µg/l, 0.5 µg/l, 0.250 µg/l, 0.125 µg/l, 0.0625 µg/l).

Всеки един от стандартите е определен двукратно. Стойностите са коригирани с двукратно определената сляпа проба за реактиви (стандарт дилуент). Построи се калибрационна крива (Фиг. 21):



Фигура 21. 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 $\mu\text{g/l}$, което осигури на метода много висока диагностична чувствителност.

1.3. Верифициране точността на получената крива чрез определяне на долна и 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 $\mu\text{g/l}$ за LLOQ, 0.500 $\mu\text{g/l}$ за MLPQ, 2 $\mu\text{g/l}$ за ULOQ, определени петкратно. Получените резултати са представени в Таблица 19.

Таблица 19. Определяне на LLOQ, MPQ, ULOQ

(n=5)	LLOQ	MPQ	ULOQ
X_0	0,0625	0,5	2
X_i	0,069	0,511	2,003
SD	0,005	0,024	0,076
CV %	7,810	4,790	3,799
bias %	9,952	2,14	0,16

1.4. Определяне на достоверността на метода

Достоверността на метода е определена с помощта на метода recovery (добавено/намерено). Доказа се област на recovery от 97.6% до 96.5%. Получените резултати са представени в Таблица 20.

Таблица 20. 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. Определяне на 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 21.

Таблица 21. 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
невъзпроизводимост в серия	0,204	1,088	4,101
	0,211	1,045	4,098
	0,209	1,069	4,154
	0,211	1,098	4,162
	0,23	1,101	4,114
X_i	0,21	1,08	4,15
SD	0,01	0,01	0,02
CV %	4,62	1,37	0,46

1.6. Определяне на 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 22.

Таблица 22. Невъзпроизводимост на метода между различни аналитични серии, 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
невъзпроизводимост между отделни аналитични серии	0,212	1,089	4,148
	0,201	1,071	4,159
	0,199	1,069	4,117
	0,221	1,105	4,149
	0,217	1,078	4,168
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 биологичния материал

Стабилността на биологичния 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 23 .

Таблица 23. Стабилност на изследвания материал

(n=5)	Проба 1 (µg/l)	Проба 2 (µg/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 серумните нива на хепсидин и времето на 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 доброволци 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.

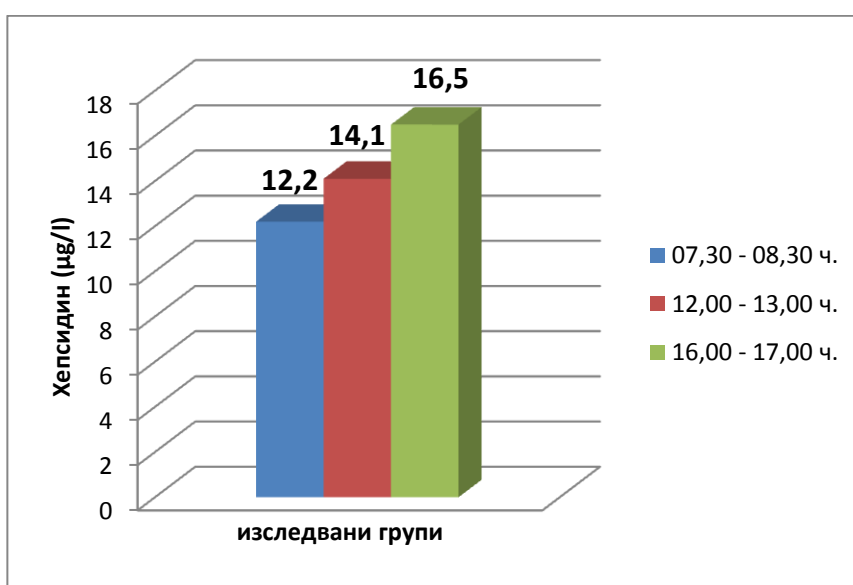
Демографските показатели на изследваните доброволци са представени на Таблица 24. Получените резултати от количествено определяне на серумен хепсидин са представени в Таблица 25 и Фигура 22.

Таблица 24. 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 25. 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 22. 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 серумен 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 26.

Таблица 26. 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

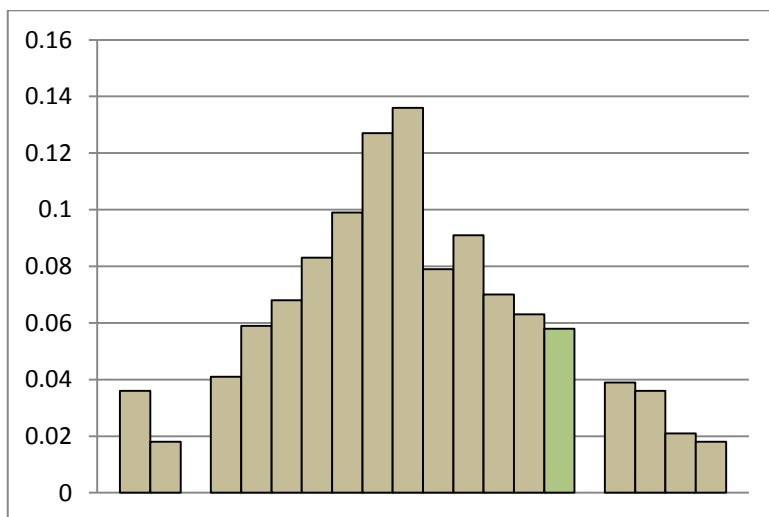
Б) Параметрична оценка

Таблица 27. 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 23.

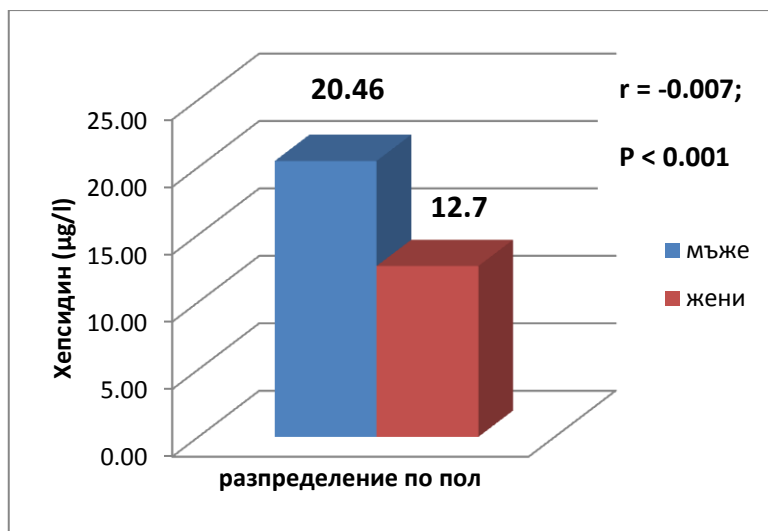


Фигура 23. Разпределение на получените данни за серумен хепсидин при контролна група клинично здрави лица от българската популация

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 24.



Фигура 24. Разпределение на резултатите от определяне на серумен хепсидин по пол при клинично здрави лица от българската популация на възраст от 18 до 76 години

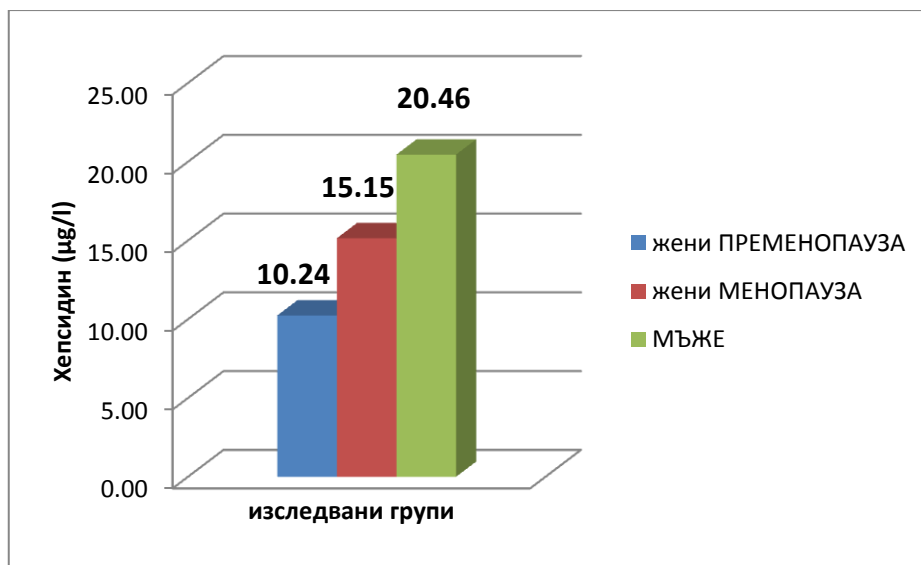
Установи се статистически значима разлика между двата пола ($P < 0.001$).

Таблица 28 представя концентрацията на серумен хепсидин при мъже и жени от контролната група.

Таблица 28. Концентрация на серумен хепсидин

Мъже (n=66)	Жени (n=114)
20.5 ± 5.2 µg/l	12.7 ± 5.2 µg/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 25.



Фигура 25. 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 $r = 0,075$, $P < 0,005$.

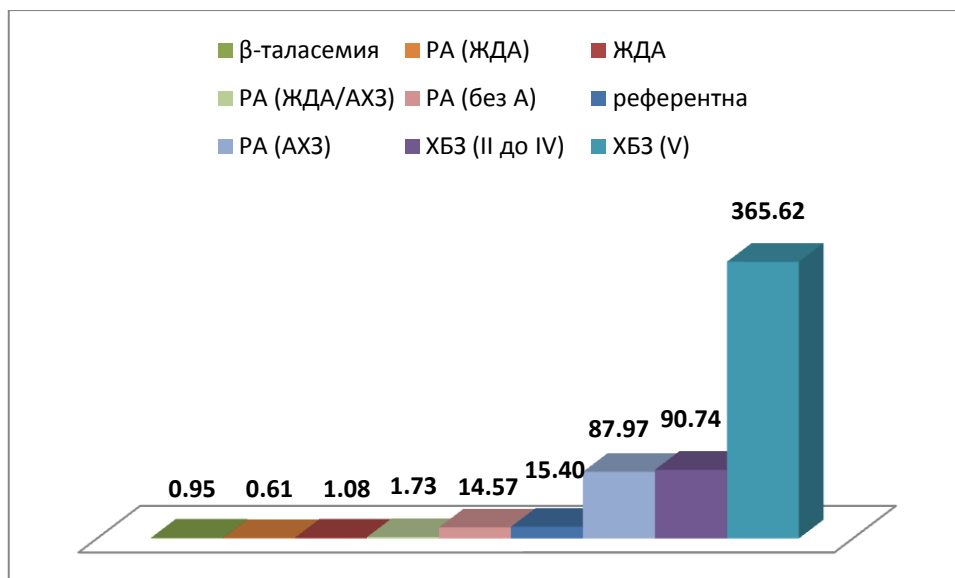
3. Определяне на серумната концентрация на хепсидин при пациенти с различни заболявания

1.1. 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 в Таблица 29 и Фигура 26.

Таблица 29. 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 26. 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.

1.2. Резултати от определянето на клиничко-химични и хематологични показатели на изследваните групи лица

В Таблица 30 са представени резултатите от определените количествено клиничко-химични и хематологични показатели при изследване на – здрави доброволци и пациенти с различни патологични състояния в обмяната на желязо. В таблицата са включени стойности на общ брой червени кръвни клетки, хемоглобин, хематокрит, ретикулоцити, хемоглобин в ретикулоцити, MCV, MCH, MCHC, желязо, ТЖСК, трансферин, разтворими трансферинови рецептори, феритин, процентно трансфериново насищане, разтворими трансферинови рецептори, индекс на разтворими трансферинови рецептори, съотношения хепсидин / феритин и процентно трансфериново насищане / хепсидин, С-реактивен протеин и креатинин в серума.

Таблица 30. Средни стойности и стандартно отклонение на определените клинично-химични и хематологични показатели при контролна група, пациенти с ХБЗ (стадии II до IV), ХБЗ (стадий V), ревматоиден артрит, с желязо-дефицитна анемия и с β -таласемия майор

Група		Клинично здрави	ХБЗ, стадии II до IV	ХБЗ, стадий V	РА	ЖДА	β -таласемия майор
Показател	статистика						
RBC ($\times 10^*12/l$)	\bar{X}	4,98	3,85	3,34	4,52	4,61	3,54
	SD	0,55	0,6	0,5	0,6	0,7	0,6
Hgb (g/l)	\bar{X}	142,6	114,6	100,9	125	106,9	98,6
	SD	13,4	18,8	12,7	17,6	23,7	9,1
Hct (l/l)	\bar{X}	0,432	0,352	0,313	0,393	0,350	0,300
	SD	0,04	0,05	0,04	0,06	0,07	0,02
Retic (%)	\bar{X}	1,54	1,88	1,37	1,57	1,6	5,35
	SD	0,45	0,45	0,45	0,7	0,8	2,1
Retic ($\times 10^*9/l$)	\bar{X}	78,1	79,7	46,04	68	68,2	192,7
	SD	26,3	0,45	17,3	29,01	19,5	68,2
CHr (pg)	\bar{X}	32,34	31,40	35,90	29,79	25,83	23,04
	SD	2,43	2,1	3,1	2,4	3,9	2,15
MCV (fl)	\bar{X}	87,35	90,56	94,28	87,97	75,83	85,60
	SD	6,26	7,7	7,3	6,1	7,1	6,4
MCH (pg)	\bar{X}	28,83	29,64	30,41	28,40	23,11	27,50
	SD	2,3	3,1	2,7	5,8	3,2	2,3
MCHC (g/l)	\bar{X}	330,2	326,1	322,6	312,6	304,1	320,0
	SD	11,1	16,5	11,7	10,8	17,4	6,6
Fe ($\mu\text{mol/l}$)	\bar{X}	18,78	13,19	12,20	12,48	6,93	60,40
	SD	7,61	6,2	5,9	5,0	4,5	23,8

Продължение на Таблица 30. Средни стойности и стандартно отклонение на определените клинично-химични и хематологични показатели при контролна група, пациенти с ХБЗ (стадии II до IV), ХБЗ (стадий V), ревматоиден артрит, с желязо-дефицитна анемия и с β -таласемия майор

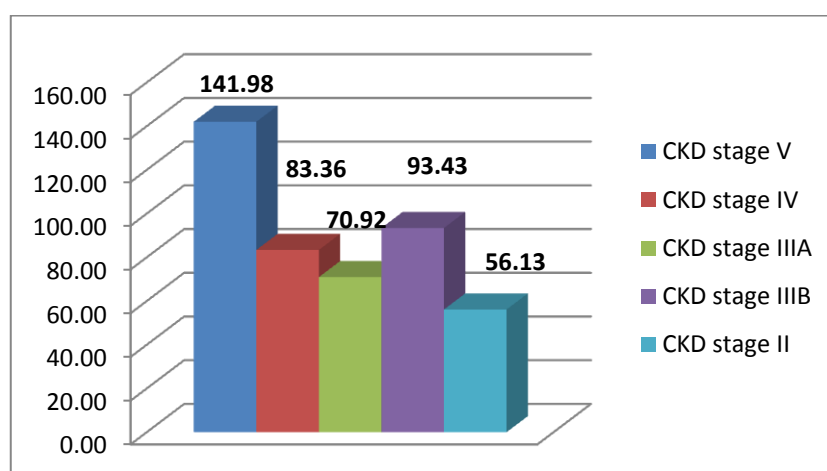
Група		Клинично здрави	ХБЗ, стадии II до IV	ХБЗ, стадий V	РА	ЖДА	β - таласемия майор
Показател	статистика						
ТЖСК ($\mu\text{mol/l}$)	\bar{X}	64,4	63,4	45	64,2	76,1	96,1
	SD	9,2	11,5	6,5	17,9	12,4	29,7
TRSF (g/l)	\bar{X}	2,96	2,46	1,87	2,64	3,71	2,27
	SD	0,5	0,5	0,4	0,7	0,6	0,31
TSAT (%)	\bar{X}	30	22	28	21	9,0	64
	SD	6,1	11,4	12,5	9,7	6,8	25
solTRfR (mg/l)	\bar{X}	2,93	5,71	2,98	3,7	8,81	2,92
	SD	0,9	2,9	2,02	1,7	1,2	0,9
(i)sTfr (mg/ng)	\bar{X}	0,108	0,100	0,014	0,292	1,864	0,010
	SD	0,3	0,2	0,02	0,6	1,5	0,01
Hepc/Ferr ($\mu\text{g/ng}$)	\bar{X}	0,363	1,316	1,640	0,312	0,230	0,002
	SD	0,4	4,2	2,2	0,3	0,2	0,004
TSAT/Hepc (%/ μg)	\bar{X}	2,270	0,321	0,088	6,735	11,700	68,560
	SD	1,5	0,2	0,05	22,9	9,1	26,2
CRP (mg/l)	\bar{X}	1,65	11,49	11,5	22,8	1,41	8,78
	SD	2,0	15,2	3,7	25,9	1,5	8,1

Продължение на Таблица 30. Средни стойности и стандартно отклонение на определените клинично-химични и хематологични показатели при контролна група, пациенти с ХБЗ (стадии II до IV), ХБЗ (стадий V), ревматоиден артрит, с желязо-дефицитна анемия и с β -таласемия майор

Група		Клинично здрави	ХБЗ, стадии II до IV	ХБЗ, стадий V	РА	ЖДА	β -таласемия майор
Показател	статистика						
Креатинин s ($\mu\text{mol/l}$)	\bar{X}	73,2	237	716	74,1	67,2	н.о.
	SD	17,4	186	182	16,9	15,7	н.о.
Феритин (ng/ml)	\bar{X}	89,91	313,1	536,3	104,1	21,1	1056,73
	SD	87,9	306,1	396,1	99,02	32,1	646,1

1.3. Серумен хепсидин при пациенти с хронично бъбречно заболяване с и без хемодиализа

Установихме разлика в серумните нива на хепсидин между отделните стадии на ХБЗ. Получените стойности са: а) за IIри стадий на ХБЗ (eGFR 61 – 90) – 56.13 $\mu\text{g/l}$; б) за IIIA стадий на ХБЗD (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 27.



Фигура 27. 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 31.

Таблица 31. Корелация на серумен хепсидин между отделните стадии на ХБЗ

r	p	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.

1.4. 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:

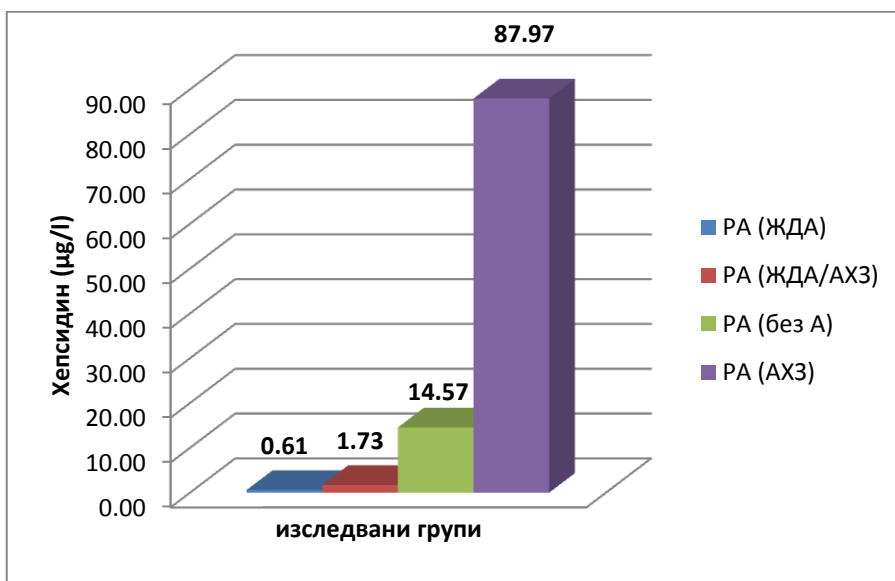
1. Класифицирахме пациентите с ревматоиден артрит и желязо-дефицитна анемия при липса на активно възпаление (определено чрез ниво на CRP < 10 mg/L) и поне едно от следните условия: 1) процентно насищане на трансферин $< 20\%$ и ниво на феритин < 30 ng/mL; 2) индекс на sTfR > 1 mg/ng.
2. Класифицирахме 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 28.



Фигура 28. Средни стойности на серумен хепсидин при отделните групи пациенти с ревматоиден артрит

4. Определяне на корелационни зависимости между хепсидин и различни клиничко-химични показатели при контролната група и отделните заболявания

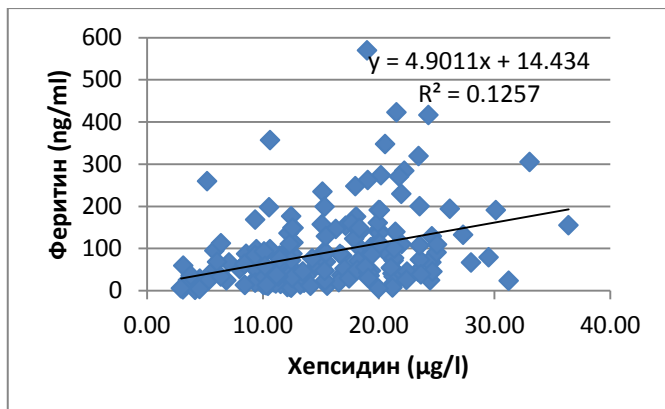
При определяне на корелационни зависимости между хепсидин и клиничко-химични или хематологични показатели използвахме следната таблица за степен на корелационна зависимост между два показателя (Таблица 32).

Таблица 32. 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

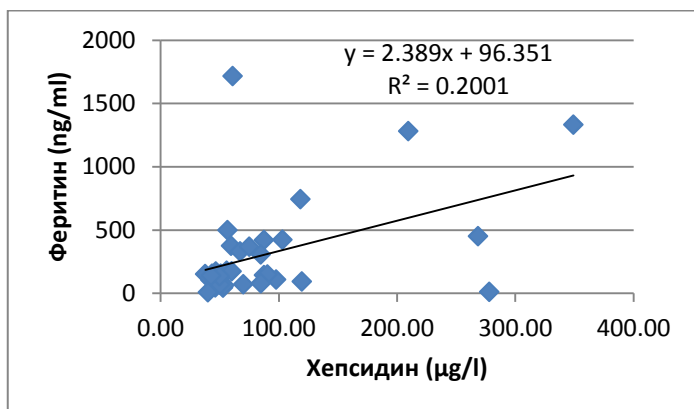
1.1. Определяне на корелационни зависимости между серумните нива на хепсидин и феритин

А) при здрави лица – ниво на корелация $r = 0,354$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 29).



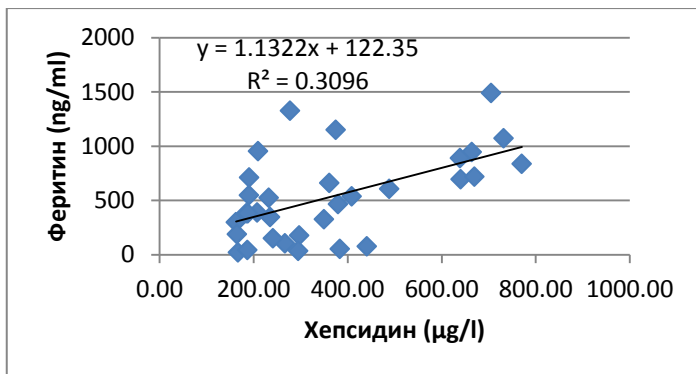
Фигура 29. Корелация между серумните нива на хепсидин и феритин при здрави лица

Б) при пациенти с ХБЗ (стадии II до IV, без диализа) - ниво на корелация $r = 0,447$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 30).



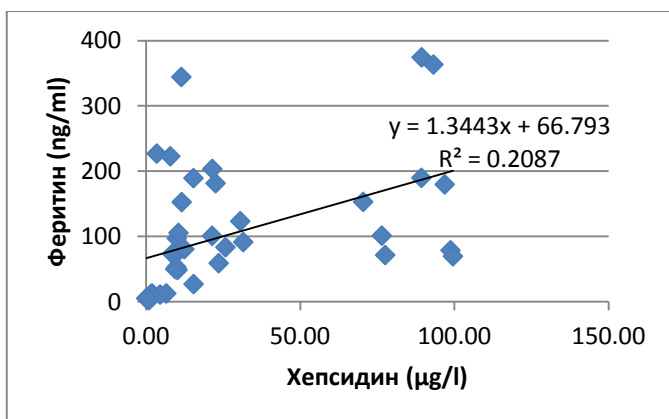
Фигура 30. Корелация между серумните нива на хепсидин и феритин при пациенти с ХБЗ (стадии II до IV, без диализа)

В) при пациенти с ХБЗ (стадий V, на диализа) - ниво на корелация $r = 0,556$; степен на значимост $p < 0,005$ (Фиг. 31).



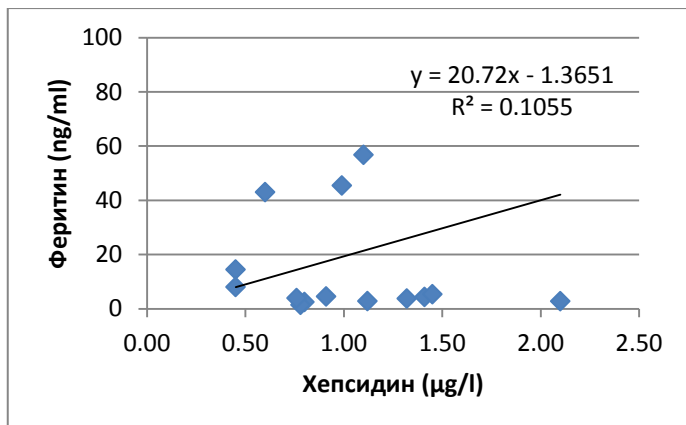
Фигура 31. Корелация между серумните нива на хепсидин и феритин при пациенти с ХБЗ (стадий V, на диализа)

Г) при пациенти с ревматоиден артрит - ниво на корелация $r = 0,457$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 32).



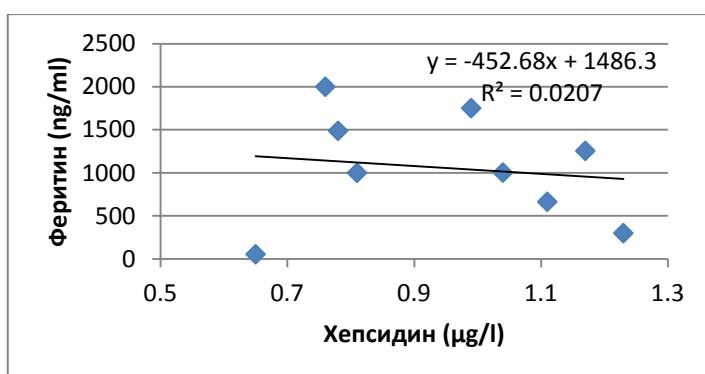
Фигура 32. Корелация между серумните нива на хепсидин и феритин при пациенти с ревматоиден артрит

Д) при пациенти с желязо-дефицитна анемия - ниво на корелация $r = 0,325$; степен на значимост $p < 0,05$ (Фиг. 33).



Фигура 33. Корелация между серумните нива на хепсидин и феритин при пациенти с желязо-дефицитна анемия

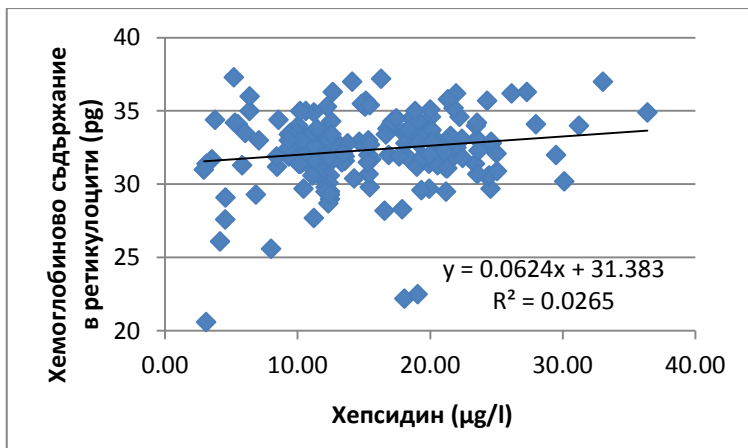
Е) при пациенти с β-таласемия майор - ниво на корелация $r = -0,144$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 34).



Фигура 34. Корелация между серумните нива на хепсидин и феритин при пациенти с β-таласемия майор

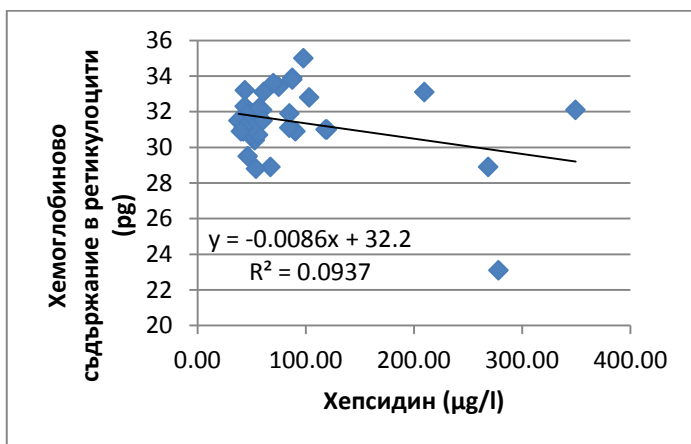
1.2. Определяне на корелационни зависимости между серумните нива на хепсидин и съдържание на хемоглобин в ретикулоцити

А) при здрави лица – ниво на корелация $r = 0,163$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 35).



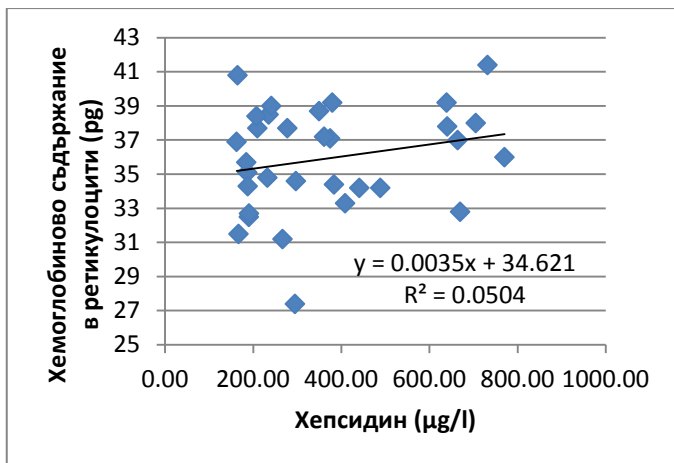
Фигура 35. Корелация между серумните нива на хепсидин и съдържание на хемоглобин в ретикулоцити при здрави лица

Б) при пациенти с ХБЗ (стадии II до IV, без диализа) - ниво на корелация $r = -0,306$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 36).



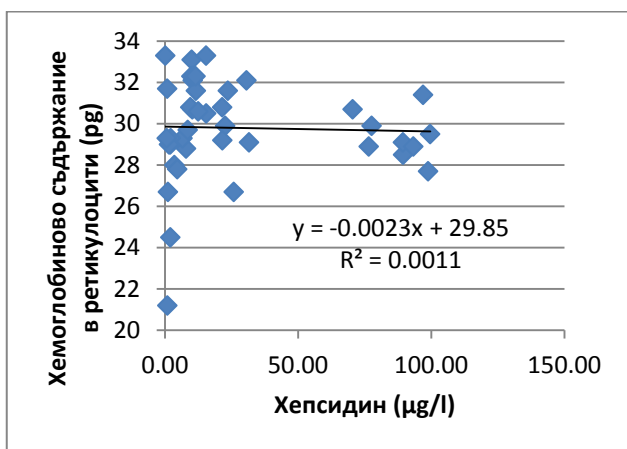
Фигура 36. Корелация между серумните нива на хепсидин и съдържание на хемоглобин в ретикулоцити при пациенти с ХБЗ (стадии II до IV, без диализа)

В) при пациенти с ХБЗ (стадий V, на диализа) - ниво на корелация $r = 0,224$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 37).



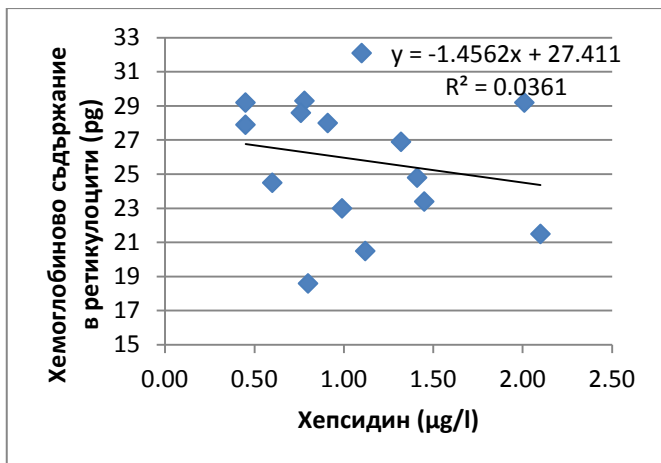
Фигура 37. Корелация между серумните нива на хепсидин и съдържание на хемоглобин в ретикулоцити при пациенти с ХБЗ (стадий V, на диализа)

Г) при пациенти с ревматоиден артрит - ниво на корелация $r = -0,033$; степен на значимост $p < 0,5$ (Фиг. 38).



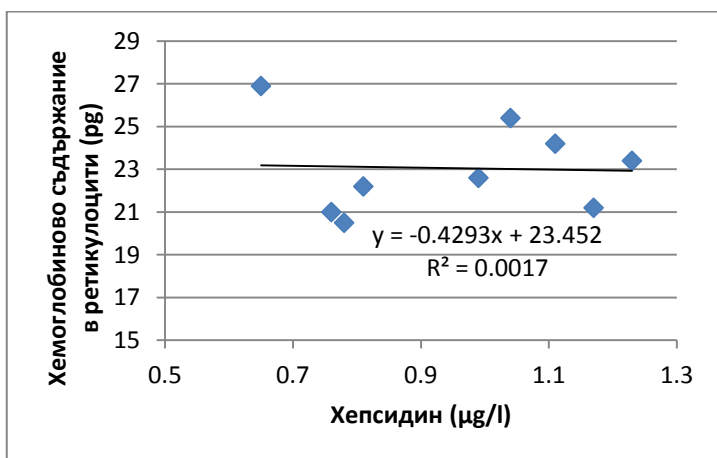
Фигура 38. Корелация между серумните нива на хепсидин и съдържание на хемоглобин в ретикулоцити при пациенти с ревматоиден артрит

Д) при пациенти с желязо-дефицитна анемия - ниво на корелация $r = -0,190$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 39).



Фигура 39. Корелация между серумните нива на хепсидин и съдържание на хемоглобин в ретикулоцити при пациенти с желязо-дефицитна анемия

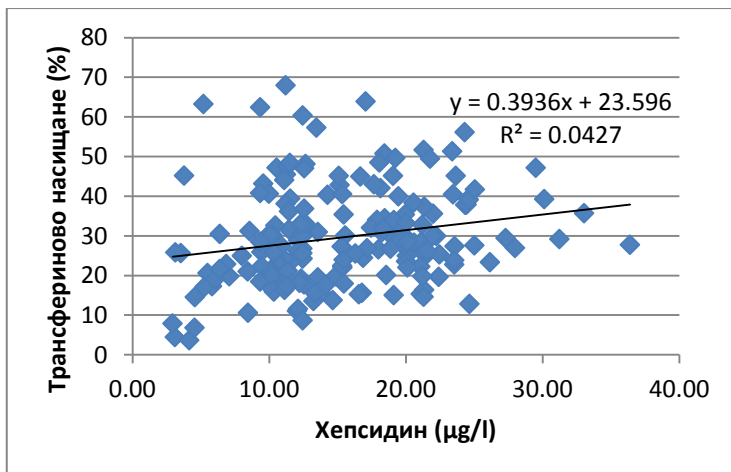
Е) при пациенти с β -таласемия майор - ниво на корелация $r = -0,041$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 40).



Фигура 40. Корелация между серумните нива на хепсидин и съдържание на хемоглобин в ретикулоцити при пациенти с β -таласемия майор

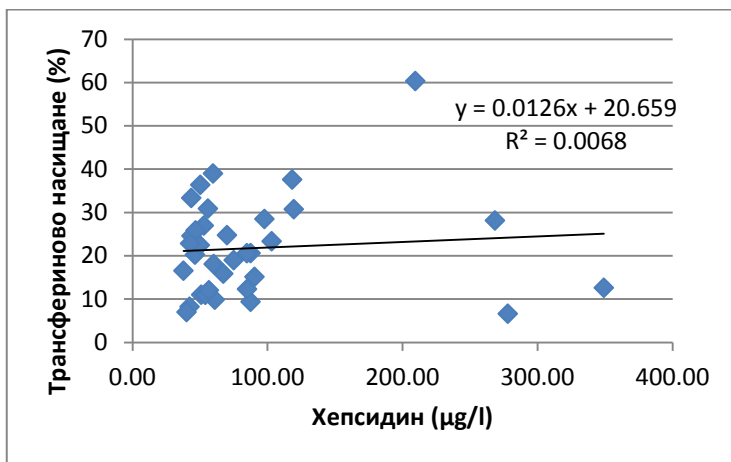
1.3. Определяне на корелационни зависимости между серумните нива на хепсидин и процентно трансфериново насищане

А) при здрави лица – ниво на корелация $r = 0,207$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 41).



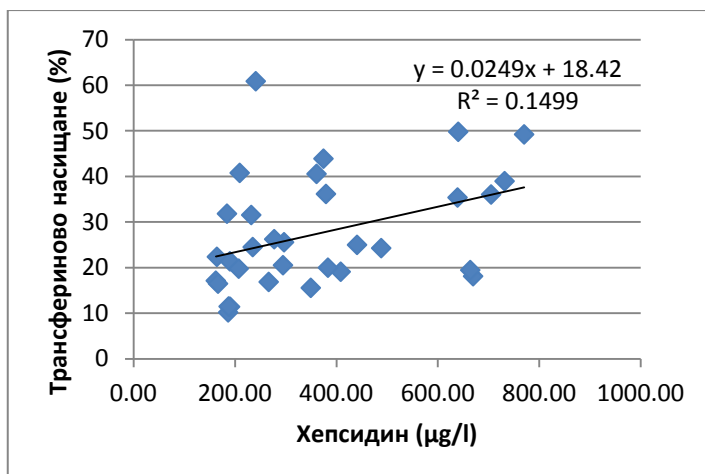
Фигура 41. Корелация между серумните нива на хепсидин и процентно трансфериново насищане при здрави лица

Б) при пациенти с ХБЗ (стадии II до IV, без диализа) - ниво на корелация $r = 0,082$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 42).



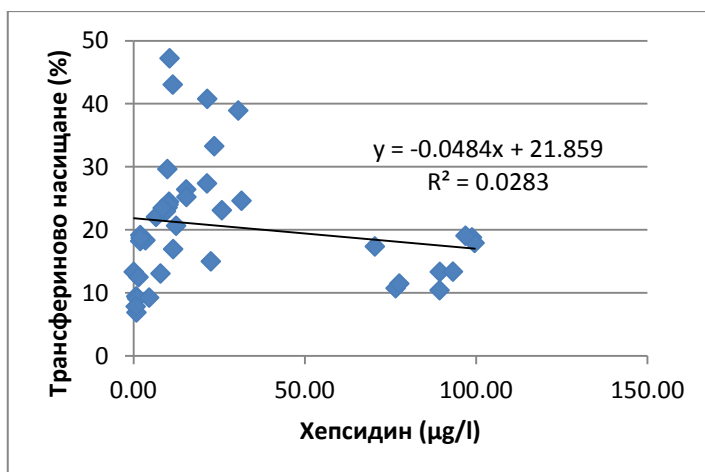
Фигура 42. Корелация между серумните нива на хепсидин и процентно трансфериново насищане при пациенти с ХБЗ (стадии II до IV, без диализа)

В) при пациенти с ХБЗ (стадий V, на диализа) - ниво на корелация $r = 0,387$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 43).



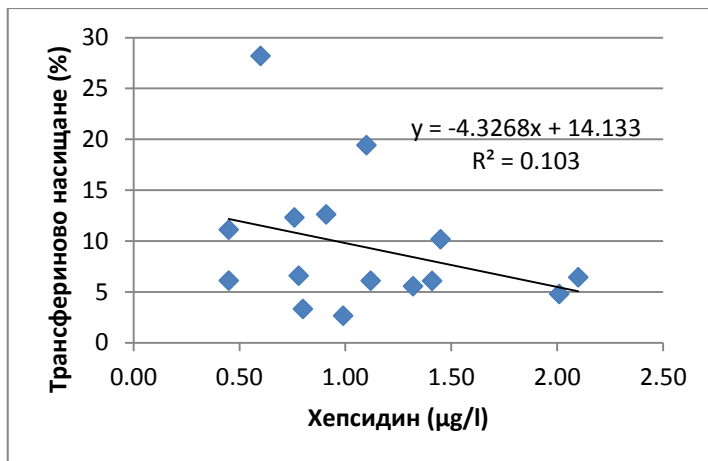
Фигура 43. Корелация между серумните нива на хепсидин и процентно трансферриново насищане при пациенти с ХБЗ (стадий V, на диализа)

Г) при пациенти с ревматоиден артрит - ниво на корелация $r = -0,168$; степен на значимост $p < 0,5$ (Фиг. 44).



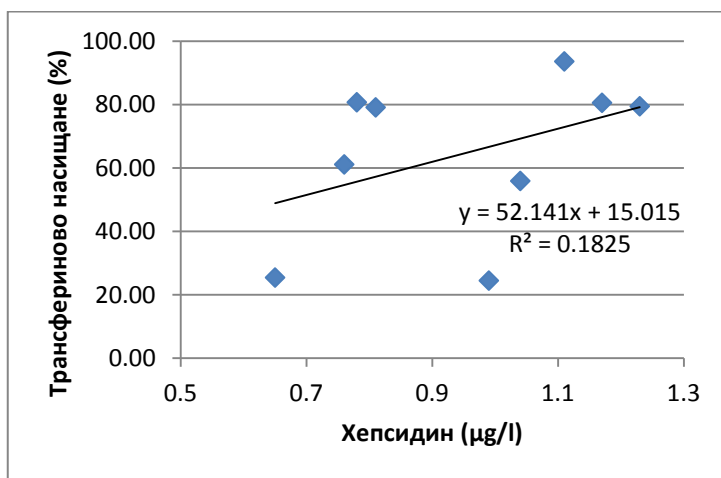
Фигура 44. Корелация между серумните нива на хепсидин и процентно трансферриново насищане при пациенти с ревматоиден артрит

Д) при пациенти с желязо-дефицитна анемия - ниво на корелация $r = -0,321$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 45).



Фигура 45. Корелация между серумните нива на хепсидин и процентно трансфериненово насищане при пациенти с желязо-дефицитна анемия

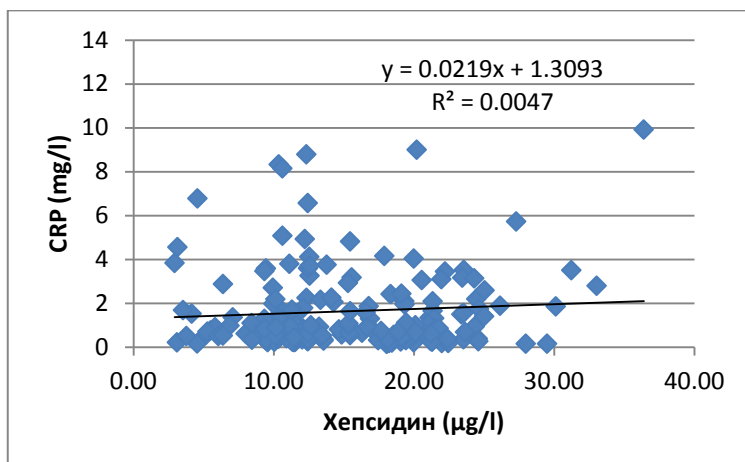
Е) при пациенти с β -таласемия майор - ниво на корелация $r = 0,134$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 46).



Фигура 46. Корелация между серумните нива на хепсидин и процентно трансфериненово насищане при пациенти с β -таласемия майор

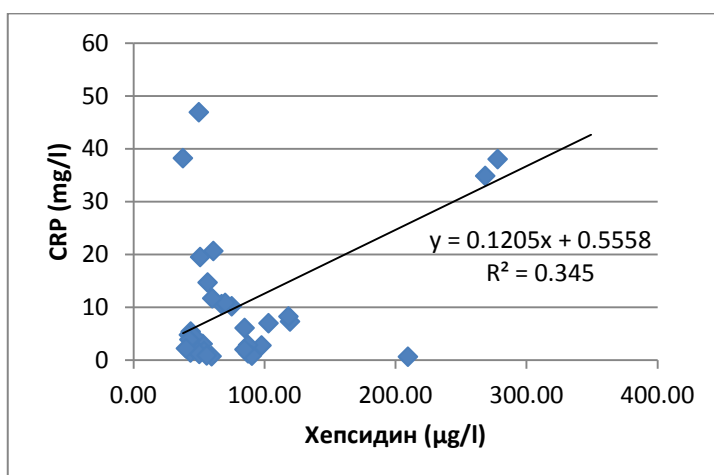
1.4. Определяне на корелационни зависимости между серумните нива на хепсидин и С-реактивен протеин

А) при здрави лица – ниво на корелация $r = 0,069$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 47).



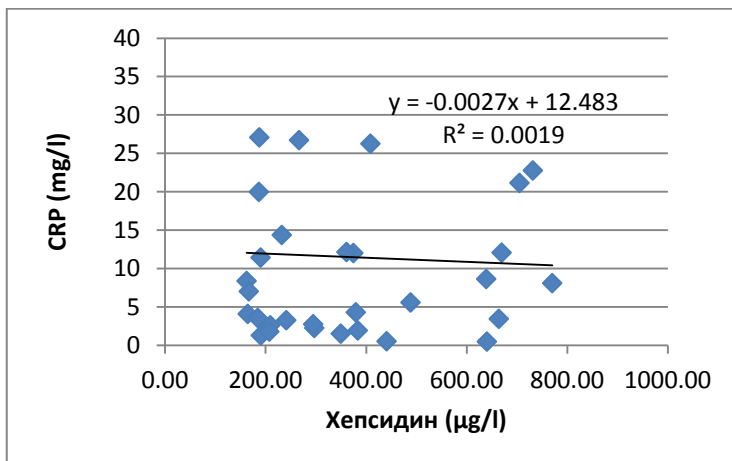
Фигура 47. Корелация между серумните нива на хепсидин и С-реактивен протеин при здрави лица

Б) при пациенти с ХБЗ (стадии II до IV, без диализа) - ниво на корелация $r = 0,587$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 48).



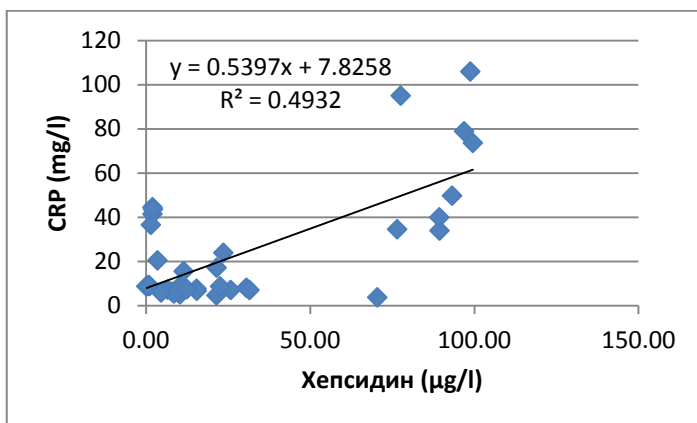
Фигура 48. Корелация между серумните нива на хепсидин и С-реактивен протеин при пациенти с ХБЗ (стадии II до IV, без диализа)

В) при пациенти с ХБЗ (стадий V, на диализа) - ниво на корелация $r = -0,043$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 49).



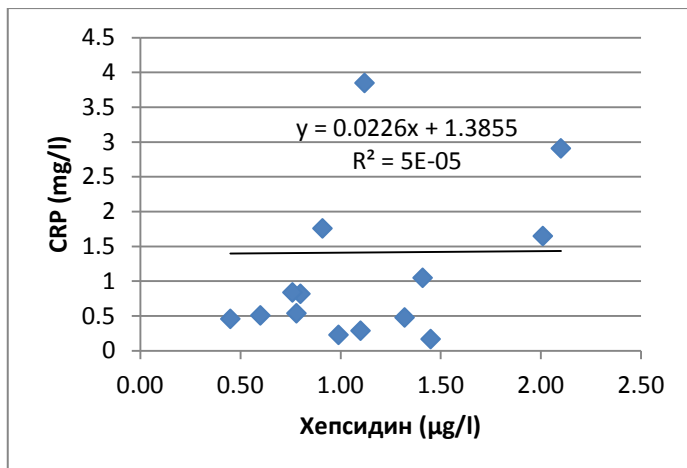
Фигура 49. Корелация между серумните нива на хепсидин и С-реактивен протеин при пациенти с ХБЗ (стадий V, на диализа)

Г) при пациенти с ревматоиден артрит - ниво на корелация $r = 0,702$; степен на значимост $p < 0,1$ (Фиг. 50).



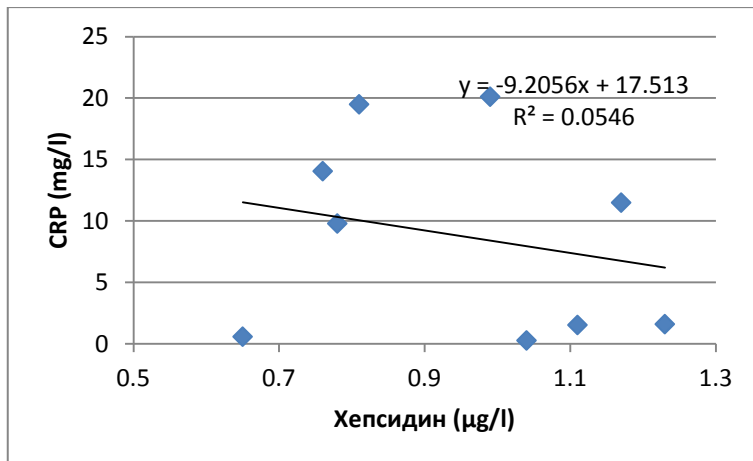
Фигура 50. Корелация между серумните нива на хепсидин и С-реактивен протеин при пациенти с ревматоиден артрит

Д) при пациенти с желязо-дефицитна анемия - ниво на корелация $r = 0,007$; степен на значимост $p < 0,5$ (Фиг. 51).



Фигура 51. Корелация между серумните нива на хепсидин и С-реактивен протеин при пациенти с желязо-дефицитна анемия

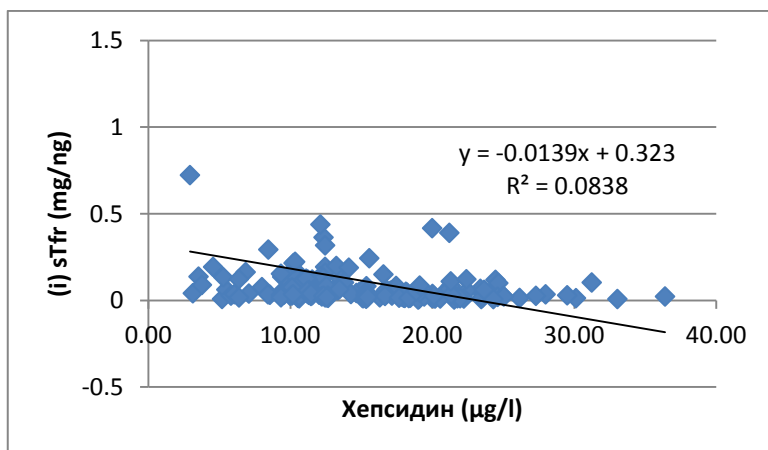
Е) при пациенти с β -таласемия майор - ниво на корелация $r = -0,234$; степен на значимост $p < 0,05$ (Фиг. 52).



Фигура 52. Корелация между серумните нива на хепсидин и С-реактивен протеин при пациенти с β -таласемия майор

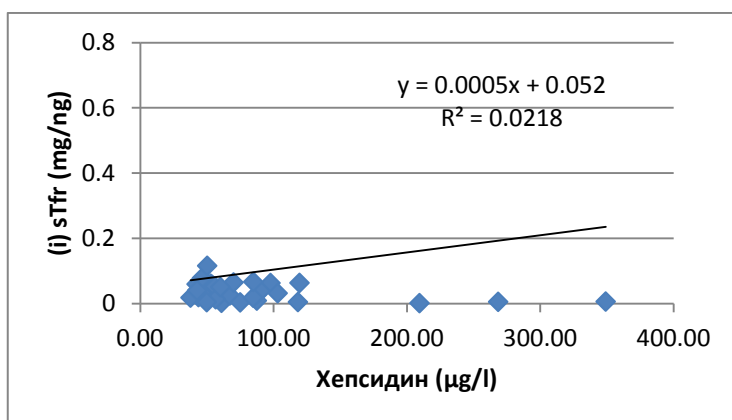
1.5. Определяне на корелационни зависимости между серумните нива на хепсидин и индекс на разтворими трансферинови рецептори [(i)sTfr]

А) при здрави лица – ниво на корелация $r = -0,289$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 53).



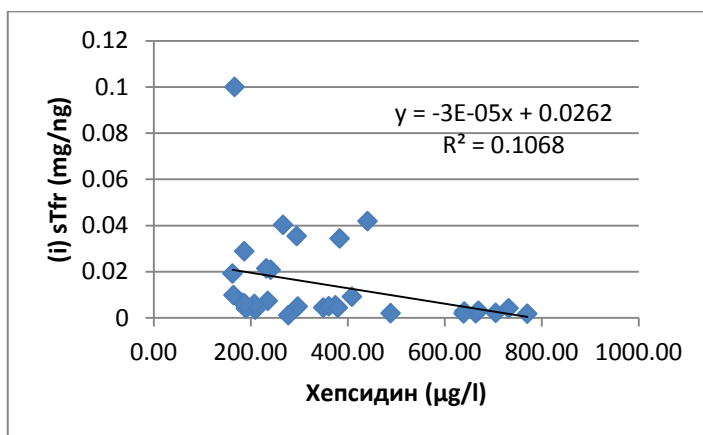
Фигура 53. Корелация между серумните нива на хепсидин и индекс на разтворими трансферинови рецептори при здрави лица

Б) при пациенти с ХБЗ (стадии II до IV, без диализа) - ниво на корелация $r = 0,148$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 54).



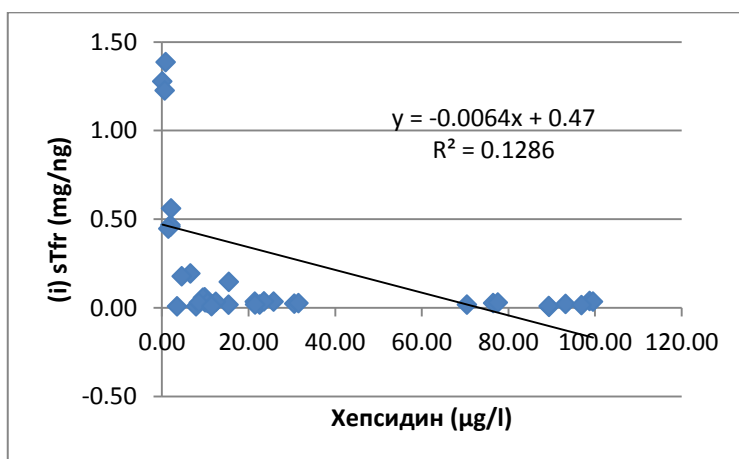
Фигура 54. Корелация между серумните нива на хепсидин и индекс на разтворими трансферинови рецептори при пациенти с ХБЗ (стадии II до IV, без диализа)

В) при пациенти с ХБЗ (стадий V, на диализа) - ниво на корелация $r = -0,327$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 55).



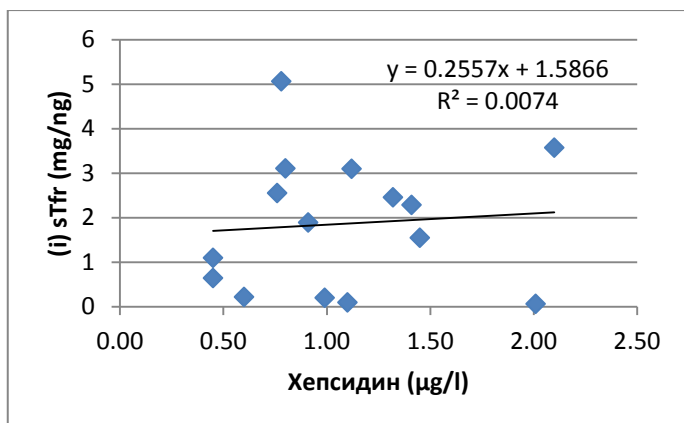
Фигура 55. Корелация между серумните нива на хепсидин и индекс на разтворими трансферинови рецептори при пациенти с ХБЗ (стадий V, на диализа)

Г) при пациенти с ревматоиден артрит - ниво на корелация $r = -0,359$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 56).



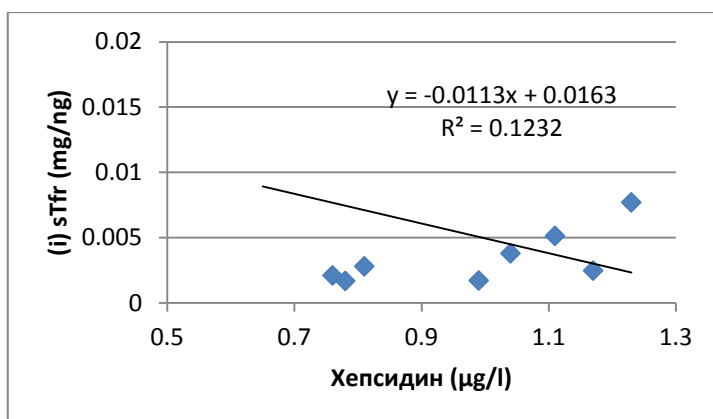
Фигура 56. Корелация между серумните нива на хепсидин и индекс на разтворими трансферинови рецептори при пациенти с ревматоиден артрит

Д) при пациенти с желязо-дефицитна анемия - ниво на корелация $r = 0,086$; степен на значимост $p < 0,05$ (Фиг. 57).



Фигура 57. Корелация между серумните нива на хепсидин и индекс на разтворими трансферинови рецептори при пациенти с желязо-дефицитна анемия

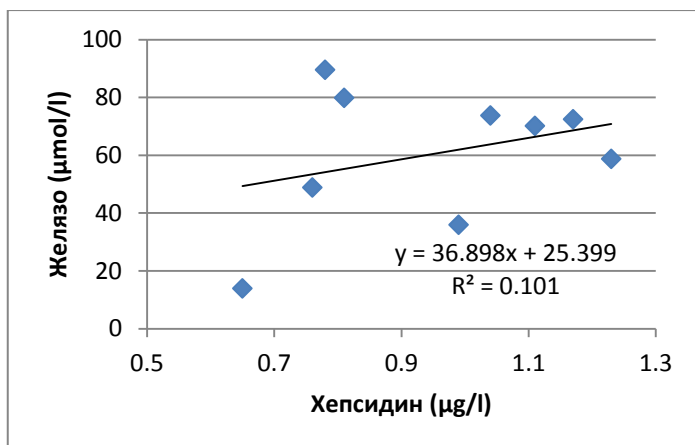
Е) при пациенти с β -таласемия майор - ниво на корелация $r = -0,351$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 58).



Фигура 58. Корелация между серумните нива на хепсидин и индекс на разтворими трансферинови рецептори при пациенти с β -таласемия майор

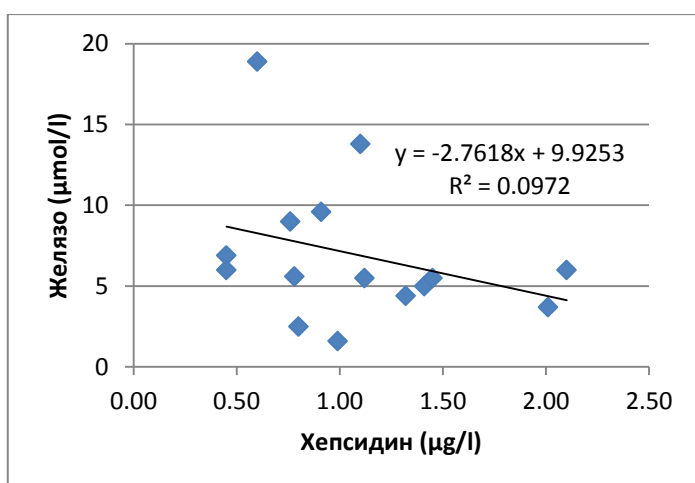
1.6. Определяне на корелационни зависимости между серумните нива на хепсидин и други клиничко-лабораторни показатели при отделни заболявания

А) при пациенти с β -таласемия майор корелация с желязо – ниво на корелация $r = 0,317$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 59).



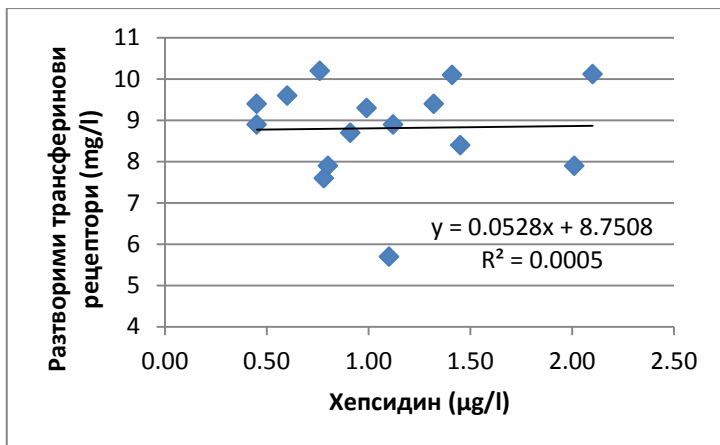
Фигура 59. Корелация между серумните нива на хепсидин и желязо при пациенти с β -таласемия майор

Б) при пациенти с желязо-дефицитна анемия корелация с желязо - ниво на корелация $r = -0,312$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 60).



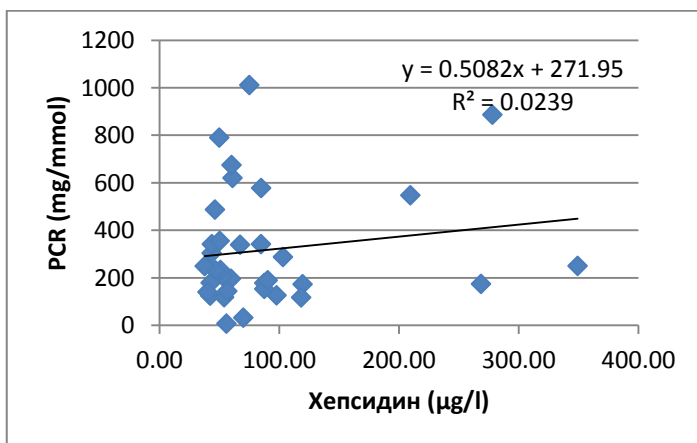
Фигура 60. Корелация между серумните нива на хепсидин и желязо при пациенти с ЖДА

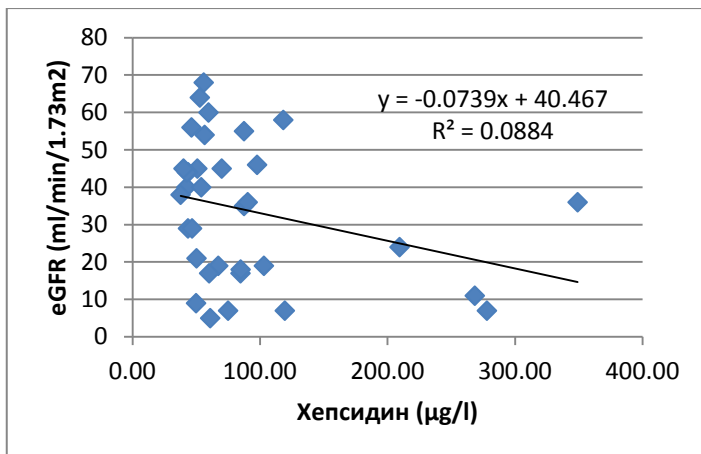
В) при пациенти с желязо-дефицитна анемия корелация с разтворими трансферинови рецептори - ниво на корелация $r = 0,022$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 61).



Фигура 61. Корелация между серумните нива на хепсидин и разтворими трансферинови рецептори при пациенти с ЖДА

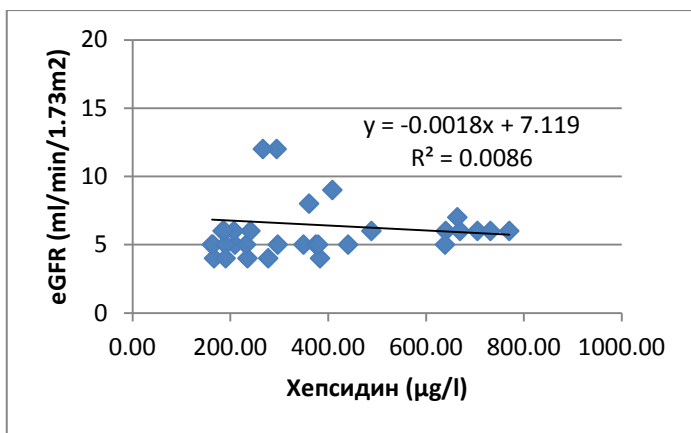
Г) при пациенти с ХБЗ (стадии II до IV, без диализа) корелация с количество белтък в урината (PCR) - ниво на корелация $r = 0,155$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 62).





Фигура 63. Корелация между серумните нива на хепсидин и eGFR при пациенти с ХБЗ (стадии II до IV, без диализа)

Е) при пациенти с ХБЗ (стадий V, на диализа) корелация с гломерулна филтрация (eGFR) - ниво на корелация $r = -0,093$; степен на значимост $p < 0,001$ (Фиг. 64).



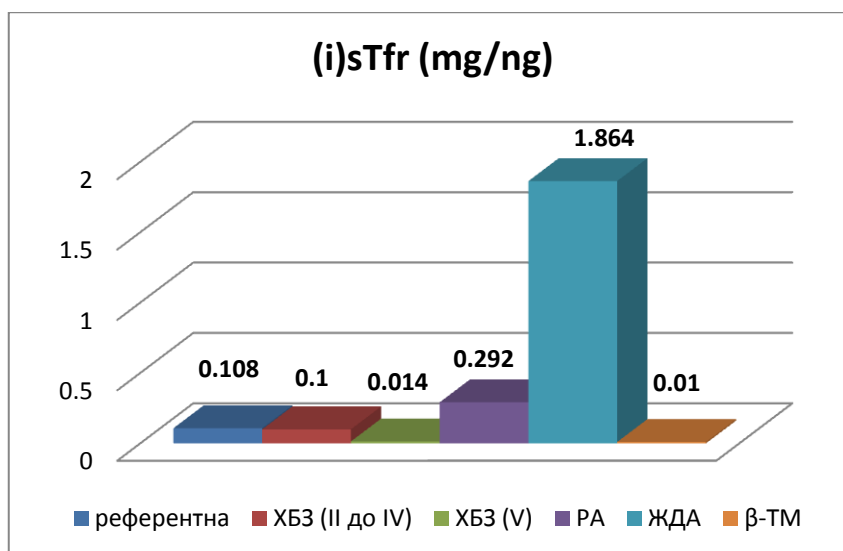
Фигура 64. Корелация между серумните нива на хепсидин и eGFR при пациенти с ХБЗ (стадий V, на диализа)

1.7. Изчислени показатели

На базата на серумните нива за хепсидин, феритин, разтворими трансферинови рецептори и изчислено процентно насищане на трансферина определихме следните индекси (Фиг. 65 - 70).

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

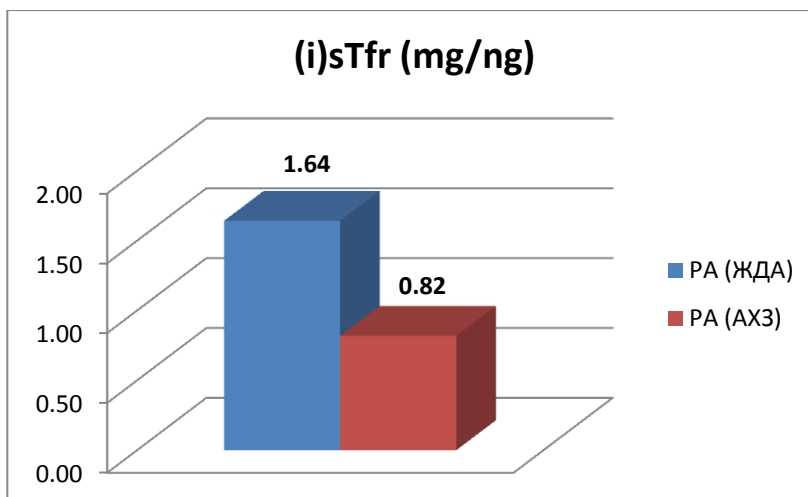
Определихме cut-off стойност на индекс на разтворими трансферинови рецептори към феритин за отдиференциране на желязо-дефицитна анемия от анемия на хронично възпаление от 0,108 mg/ng.



Фигура 65. Индекс на разтворими трансферинови рецептори към феритин

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

А1) Индекс на разтворими трансферинови рецептори към феритин при пациенти с ревматоиден артрит

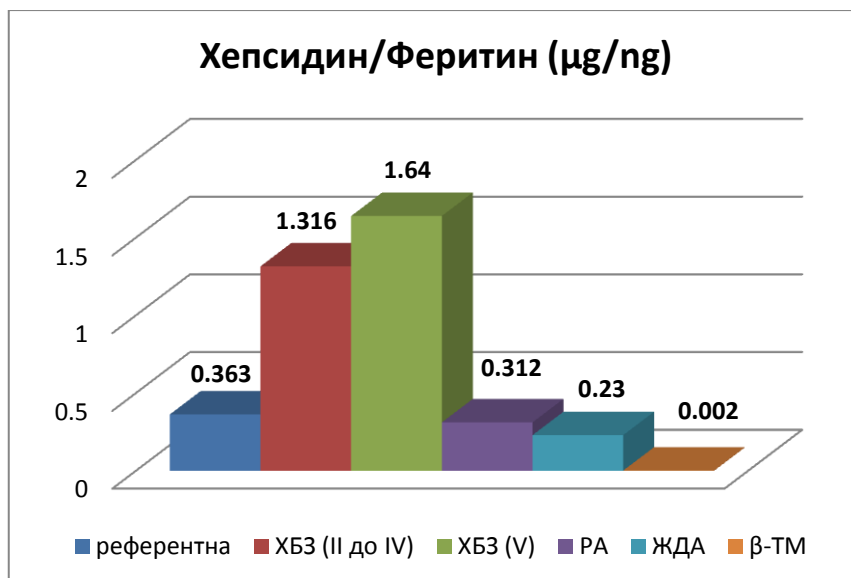


Фигура 66. Индекс на разтворими трансферинови рецептори към феритин при пациенти с РА

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; $r = 0,388$, $p < 0,01$.

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

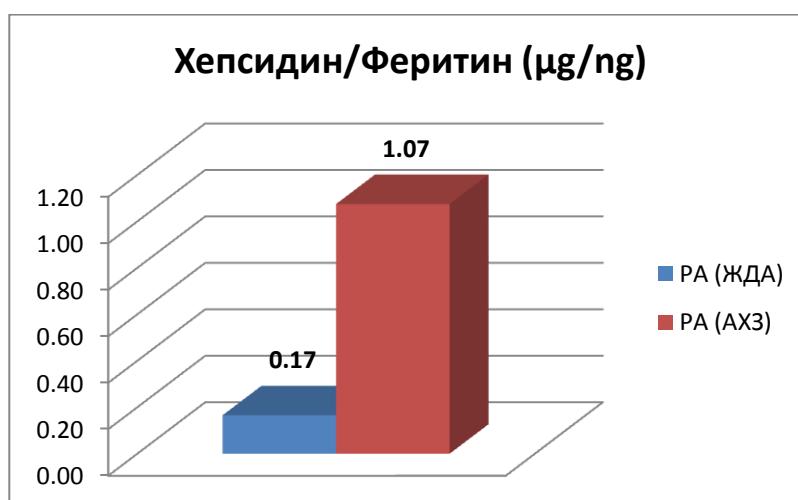
Определихме cut-off стойност на индекс на хепсидин към феритин, използван за отдиференциране на анемия на хронично възпаление от комбинацията АХЗ/ЖДА от 0,363 $\mu\text{g}/\text{ng}$.



Фигура 67. Индекс хепсидин към феритин

Установени са най-високи стойности при пациенти с хронично бъбречно заболяване стадии II до IV (1,316 µg/ng) и ХБЗ стадий V (1,64 µg/ng).

Б1) Индекс на хепсидин към феритин при пациенти с ревматоиден артрит

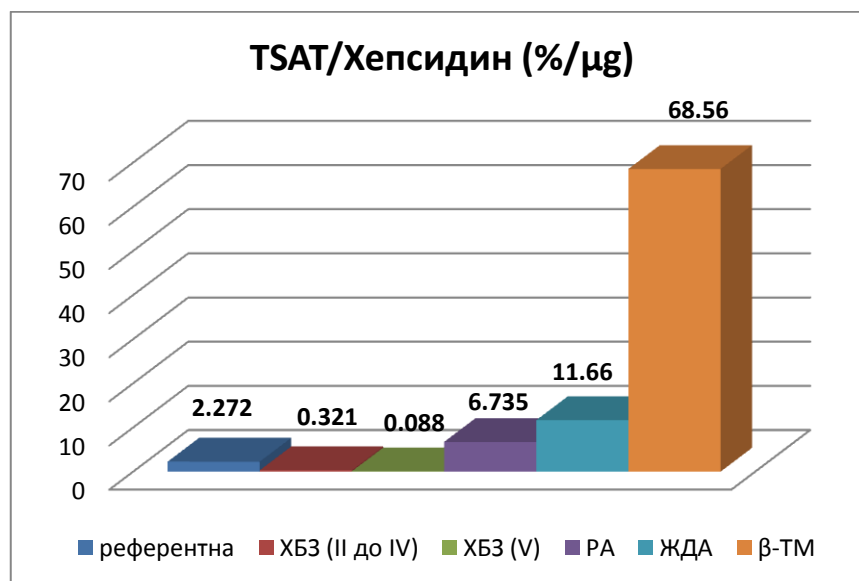


Фигура 68. Индекс хепсидин към феритин при пациенти с РА

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; $r = 0,353$, $p < 0,01$.

В) Индекс на процентно трансфериново насищане към хепсидин – използван за отдиференциране на желязо-дефицитна анемия от анемия при възпаление (висок при ЖДА)

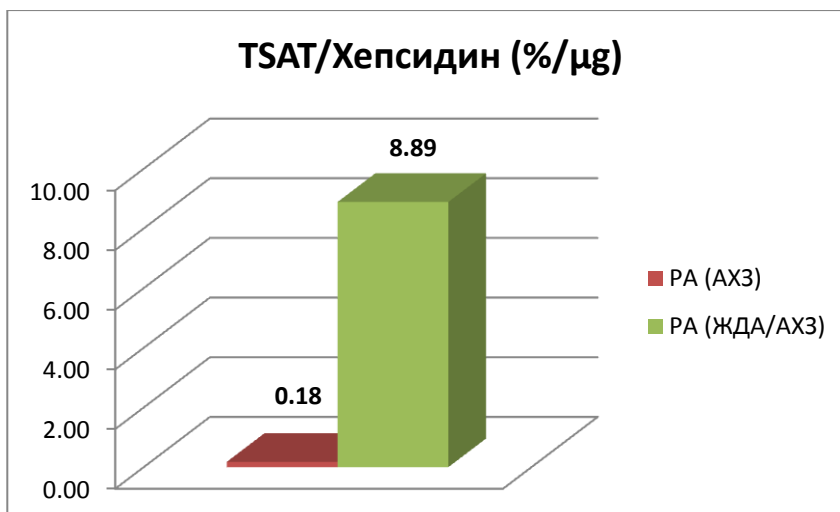
Определихме cut-off стойност на индекс на процентно трансфериново насищане към хепсидин, използван за отдиференциране на желязо-дефицитна анемия от анемия при възпаление от 2,272 %/ μg .



Фигура 69. 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).

В1) Индекс на процентно трансфериново насищане към хепсидин при пациенти с ревматоиден артрит



Фигура 70. 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; $r = 0,396$, $p < 0,001$.

1.8. Диагностична специфичност и чувствителност на серумен хепсидин при различни патологични състояния

Определяне на прагови стойности на хепсидин и стойности на критериите за валидизация при отграничаването на изследваните групи от референтната

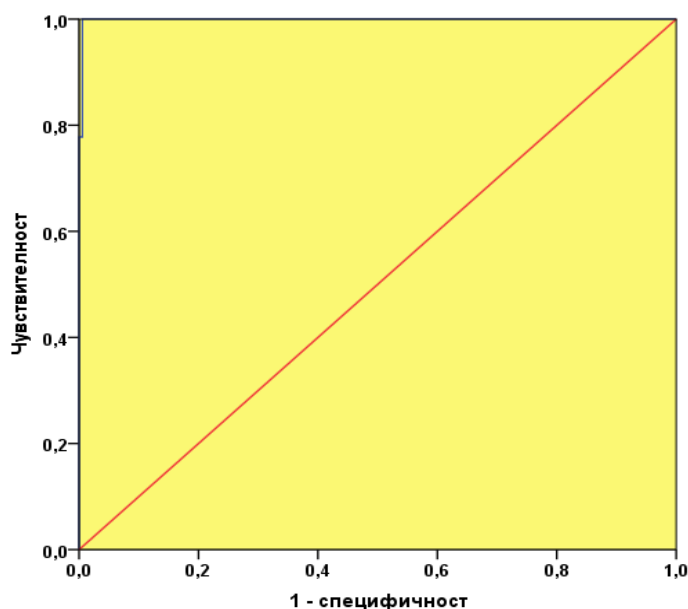
За да се определят праговите стойности на количествените променливи бе приложен ROC curve анализ.

Получените резултати (Фиг. 71 - 77 и Таблица 33) показват, че:

- 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 и на диализа се получават максимални стойности на критериите за валидизация – всички са равни на 100%;

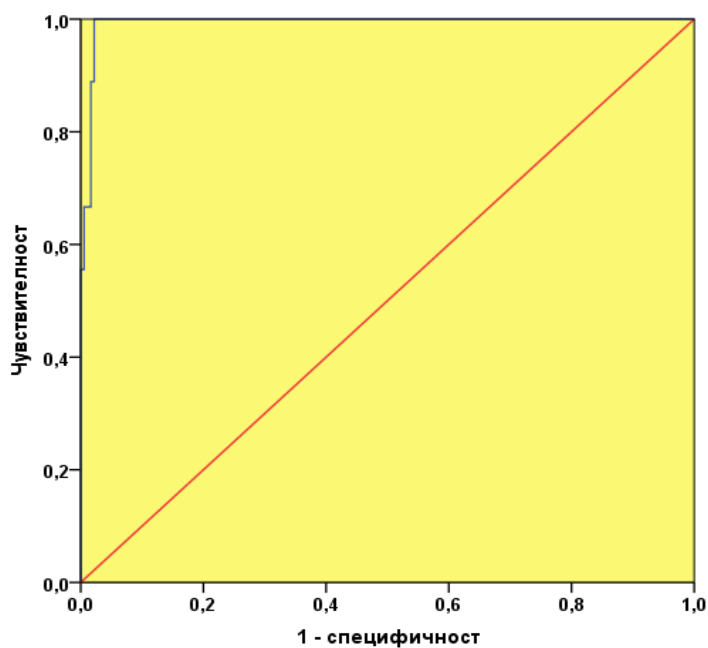
- При останалите групи чувствителността и отрицателната предиктивна стойност също са 100%, но останалите критерии са с по-ниски величини (69 – 99%);
- Показателят хепсидин дава отлични възможности за отдиференциране на разглежданите групи от референтната с изключение на пациентите с ревматоиден артрит и нормален хепсидин.

При прагова стойност $\leq 1,385$ групата с **β -таласемия майор** може да се отдиференцира от контролната група.

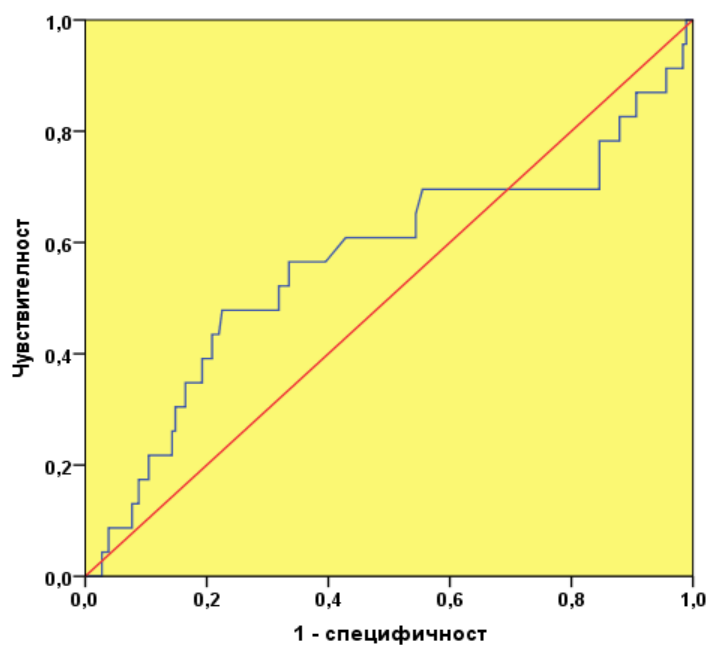


Фигура 71: ROC крива на хепсидина за определяне праговата му стойност при отграничаването на пациентите с β -таласемия майор от контролната група (площ под кривата 0,999, $p < 0,001$)

При прагова стойност $\leq 2,63$ групата с **ревматоиден артрит и желязо-дефицитна анемия** може да се отдиференцира от контролната група.

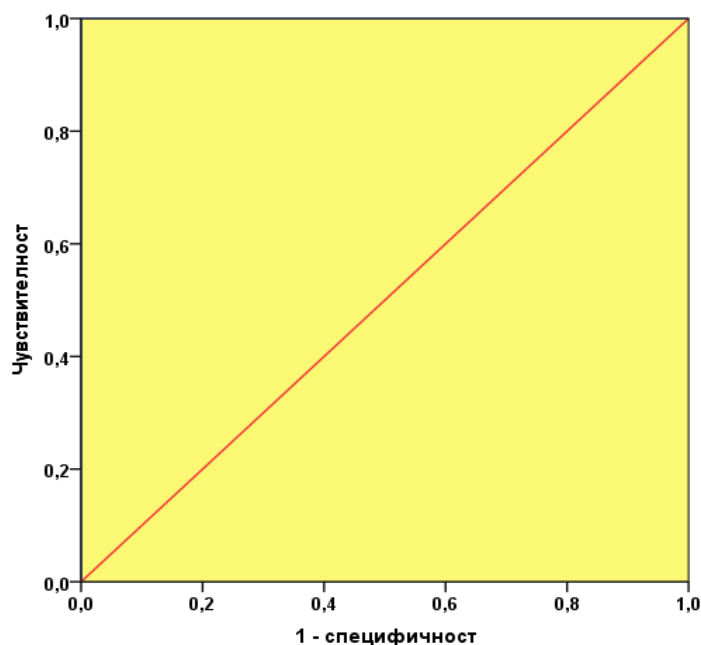


Фигура 72: ROC крива на хепсидина за определяне праговата му стойност при отграничаването на пациентите с ревматоиден артрит и желязо-дефицитна анемия от контролната група (площ под кривата 0,993, $p < 0,001$)



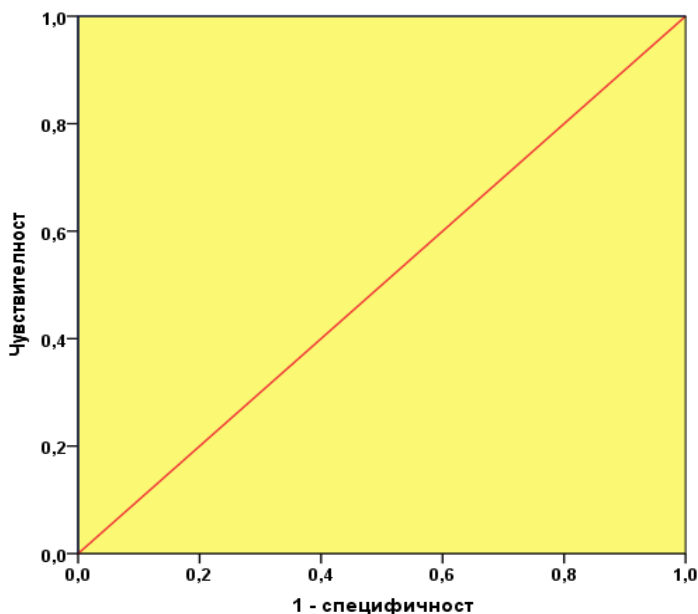
Фигура 73: ROC крива на хепсидина за определяне праговата му стойност при отграничаването на пациентите с ревматоиден артрит без анемия от контролната група (площ под кривата 0,566, $p = 0,302$)

При прагова стойност $\geq 53,42$ групата с **ревматоиден артрит и анемия при хронично заболяване** може да се отдиференцира от контролната група.



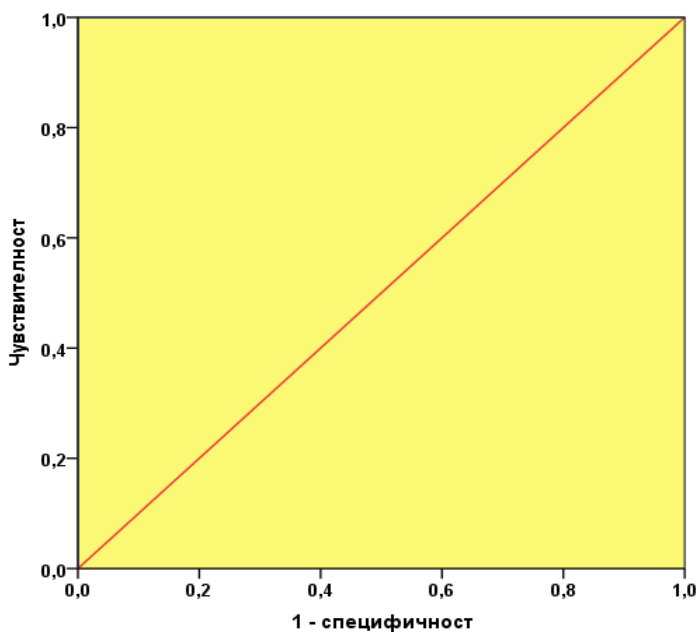
Фигура 74: ROC крива на хепсидина за определяне праговата му стойност при отграничаването на пациентите с ревматоиден артрит и анемия на хронично възпаление от контролната група (площ под кривата 1,000, $p < 0,001$)

При прагова стойност $\geq 37,07$ групата с **хронично бъбречно заболяване, стадии II до IV** може да се отдиференцира от контролната група.



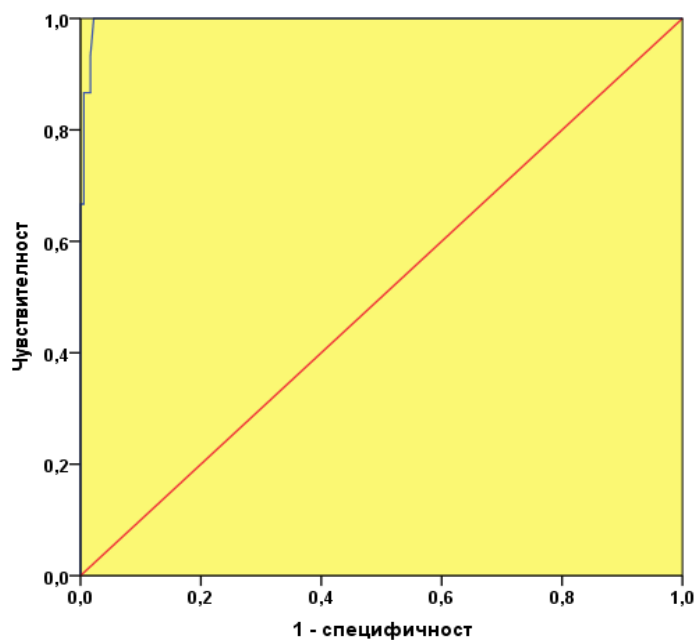
Фигура 75: ROC крива на хепсидина за определяне праговата му стойност при отграничаването на пациентите с ХБЗ стадии II до IV от контролната група (площ под кривата 1,000, $p < 0,001$)

При прагова стойност $\geq 99,35$ групата с **хронично бъбречно заболяване, стадий V, на диализа** може да се отдиференцира от контролната група.



Фигура 76: ROC крива на хепсидина за определяне праговата му стойност при отграничаването на пациентите с ХБЗ стадий V, на диализа 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.



Фигура 77: ROC крива на хепсидина за определяне праговата му стойност при отграничаването на пациентите с ЖДА от контролната група (площ под кривата 0,997, $p < 0,001$)

Таблица 33. Прагови величини на хепсидин и стойности на критериите за валидизация при отграничаването на изследваните групи от контролите

Група	Прагова величина	Чувствителност (%)	Специфичност (%)	Положителна предиктивна стойност (%)	Отрицателна предиктивна стойност (%)	Точност (%)
Таласемия	$\leq 1,385$	100	99	90	100	99
Ревматоиден артрит с						
Нисък хепсидин	$\leq 2,63$	100	98	69	100	98
Нормален хепсидин	-	-	-	-	-	-
Висок хепсидин	$\geq 53,42$	100	100	100	100	100
ХБЗ	$\geq 37,07$	100	100	100	100	100
Диализа	$\geq 99,35$	100	100	100	100	100
ЖДА	$\leq 2,62$	100	98	79	100	98

VII. 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 µg/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 измерване на серумен хепсидин необходимото качество за валидност на получените резултати. Доказана бе област на recovery от 95,28% до 109,92%, средно 102,60%. 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 много ниска отрицателна корелация между стойностите при жени в пременопауза и мъже ($r = -0,187$; $P < 0,001$). Незначителна е и разликата при жени в зависимост от менструалния цикъл ($r = 0,167$, $P < 0,001$). 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 (Kroot JJ и сътр., Clin Chem 2010).

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.

3.1. 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 железен 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 (Park CH и сътр., 2001; Swinkels DW и сътр., 2008; Kulaksiz H и сътр., 2005). В случаите с ограничение на ефективната гломерулна филтрация при ХБН, се установяват повишени нива на серумен хепсидин дори и без наличие на железен дефицит или изразено възпаление. Освен това серумните концентрации на хепсидина строго корелират със стадия на ХБЗ и нивата на серумния креатинин (Kalantar-Zadeh K и сътр., 2003; Macdougall IC и сътр., 2002; Chonchol M и сътр., 2008; Stenvinkel P, 2001). 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 (Peters HPE и сътр., 2010; Ashby DR и сътр., 2009; Tomosugi N и сътр., 2006). 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 С-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 (Malyszko J и сътр., 2007). Намалването на бъбречната функция може да се отрази на нивата на допълнителни възпалителни молекули, като серумен С-реактивен протеин (CRP) или IL-6, които корелират обратно с креатининовия клирънс (Malyszko J и сътр., 2007). 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. (Malyszko J и сътр., 2007). 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, Алън и сътр., 1993 излага 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 (Malyszko J и сътр., 2005; Taes YE и сътр., 2004; Dallalio G и сътр., 2003).

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 (Kalantar-Zadeh K и сътр., 2003; Macdougall IC и сътр., 2002; Chonchol M и сътр., 2008; Stenvinkel P, 2001).

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 $r = -0,359$, $p < 0,001$. Chung M и сътрудници, 2012 предполагат, че хемоглобиновото съдържание в ретикулоцити е по-добър предиктор на отговора на терапия с желязни препарати при пациенти с хронична диализа спрямо класическите маркери понижено ниво на процентно трансфериново насищане ($< 20\%$) и ниско ниво на феритин ($< 100 \text{ ng/ml}$).

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 громерулна

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 (Peters HPE и сътр., 2010), 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 ХБН. 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 (Ashby DR и сътр., 2009; Tomosugi N и сътр., 2006). Доказано е, че серумният феритин е силно свързан с нивата на хепсидин при пациенти с хронична бъбречна недостатъчност и на хемодиализа (Ashby DR и сътр., 2009; Tomosugi N и сътр., 2006; Ganz T и сътр., 2008). Въпреки това, данните изглеждат се различават по отношение на ролята на гломерулната филтрация. В две проучвания е показан независимият ефект на гломерулната филтрация към нивата на хепсидин (Tomosugi N и сътр., 2006; Ganz T и сътр., 2008). Ashby и др. съобщава, че хепсидиновите нива при техните пациенти са корелиращи в значителна степен с eGFR (Ashby DR и сътр., 2009). Тези несъответствия може да се обяснят с използването на различни методи, и по-специално недостатъка на имуноанализа, използван от Ashby да прави разлика между различните изоформи на хепсидина. Противоречивите резултати могат да се дължат на разлики в популацията, включена в проучването. Въпреки това, въз основа на данните, описани по-горе, трябва да заключим, че серумните концентрации на биоактивната изоформа на хепсидина „25” корелира със серумните нива на феритин, но не и с eGFR.

Zaritsky J и сътр., 2009, установяват, 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 (Park CH и сътр., 2001; Swinkels DW и сътр., 2008; Kulaksiz H и сътр., 2005). 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 (Kalantar-Zadeh K и сътр., 2003; Macdougall IC и сътр., 2002; Chonchol M и сътр., 2008; Stenvinkel P, 2001). Етиологията на бъбречно заболяване в стадияте 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.

3.2. Хепсидин при пациенти с ревматоиден артрит

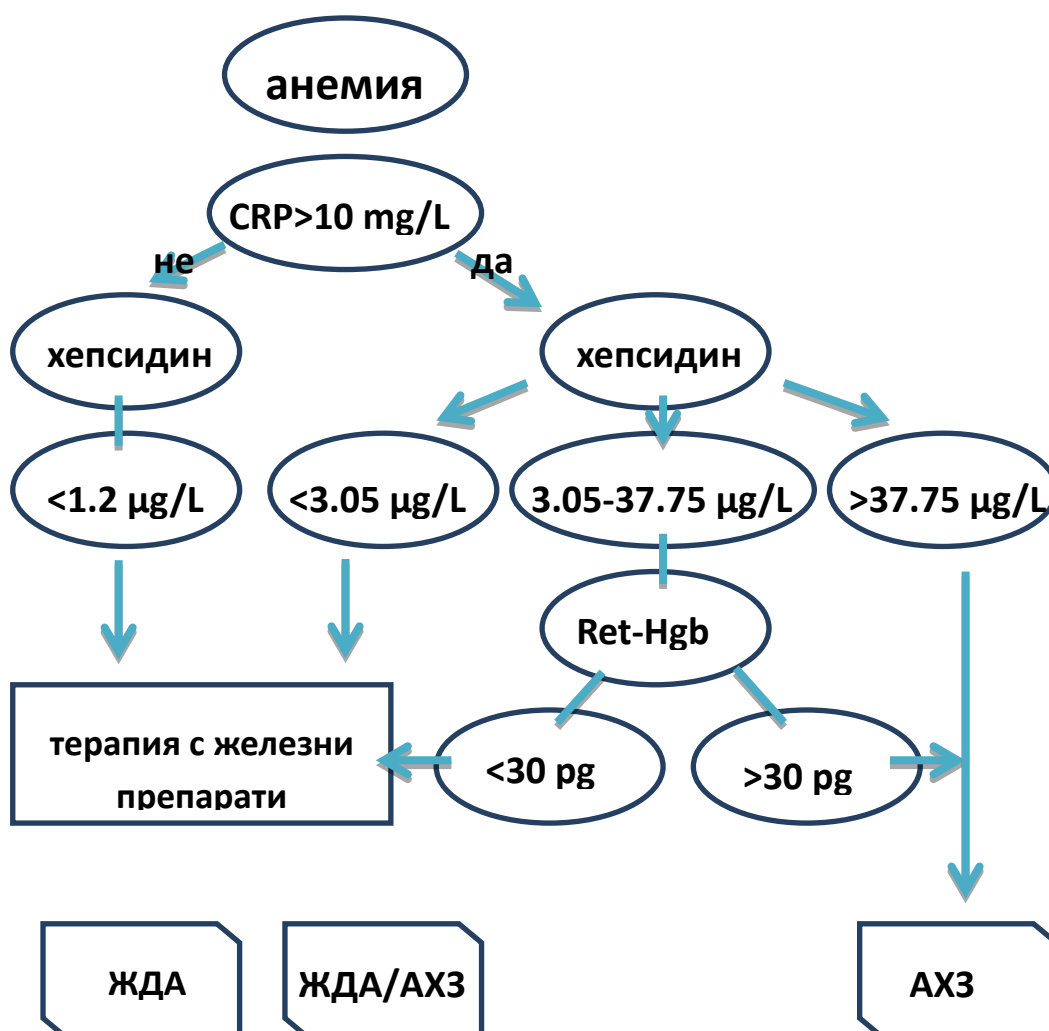
При пациенти с ревматоиден артрит диагностиката на анемията е клинично предизвикателство, тъй като рутинните параметри за желязен статус, като трансферин, желязо, и феритин, са повлияни от отговорите на острата фаза (Cook JD, 2005). Трансферинът оказва влияние върху запасите от желязо линейно на степента на необходимост от желязо на еритроblastите, но възпалителни стимули може да потиснат неговата концентрация чрез инхибиране на еритропоетина (Northrop-Clewes CA, 2008; Beguin Y, 2003). Индексът на разтворими трансферинови рецептори е разработен за преодоляване на този ефект (Punnonen K и сът., 1997) и е натрупал заслуги в диагностичните алгоритми, заедно с хемоглобиновото съдържание в ретикулоцитите (Brugnara C, 2003; Thomas C и сътр., 2002). Въпреки това, всеки един от тези маркери има своите недостатъци при прогнозирането на недостиг на желязо (Northrop-Clewes CA, 2008; Cook JD, 2005; Beguin Y, 2003; Lee EJ и сътр., 2002). При направено проучване (van Santen S и сътр., 2011) 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 железен дефицит и възпаление се среща при пациенти с хронични инфекции, автоимунни заболявания, злокачествени заболявания (Cheng PP и сътр., 2011), при пациенти с ракови заболявания и възпаление, и при пациенти с остро възпаление в интензивните отделения (Lasocki S и сътр., 2010). Обратно, при друга хетерогенна група от пациенти с хронично възпаление и анемия, нивата на хепсидин не могат да послужат за диференцират 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 (WHO, 2007).

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 понижен 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 73. Тъй като анемията при ревматоиден артрит е хетерогенна, може да е необходимо повече от един параметър за да се диагностицира желязен дефицит.



Фигура 78. 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 $< 3.05 \mu\text{g/L}$ ще имат недостиг на желязо, докато нива на хепсидин $> 37.75 \mu\text{g/L}$ са диагностични за анемия на хронично заболяване. Пациентите, при които нивата на хепсидин се понижат между 3.05 и $37.75 \mu\text{g/L}$ се характеризират допълнително с помощта на хемоглобиново съдържание в ретикулоцити, като нива $< 30 \text{ pg}$ са показателни за едновременен недостиг на желязо.

За желязо-дефицитна анемия, ниво на хепсидин $< 1.2 \mu\text{g/L}$ 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.

3.3. 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 (Sabau A и сътр., 2013). 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.

3.4. 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 (Joyce J.C.Kroot и сътр., 2011; De Domenico I и сътр., 2010). 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 (Bachorzewska-Gajewska H и сътр., 2014). 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 Hb-100,9 g/l, на Hct-0,313 l/l) и β -таласемия майор (средни стойности на Hb-98,6 g/l, на Hct-0,300 l/l) спрямо контролната група (съответно Hb-142,6 g/l, Hct-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 еритропоези. 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.

Стойностите на цитометричните показатели – MCV, MCH и MCHC са значително понижени при пациенти с желязо-дефицитна анемия (средни стойности съответно 75,83 fl; 23,11 pg; 304,1 g/l) спрямо контролната група (средни стойности съответно 87,35 fl; 28,83 pg; 330,2 g/l).

Серумните нива на **желязо и феритин**, както и **процентно трансфериново насищане** са значително понижени при пациенти с желязо-дефицитна анемия (средни

стойности Fe - 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 (Kroot JJ и сътр., 2010). 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 еитропоеза със засилена хемолиза на еритроцити (Joyce J.C.Kroot и сътр., 2011). 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 (De Domenico I и сътр., 2010).

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 (Malyszko J и сътр., 2007).

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 (Brugnara C, 2003; Northrop-Clewes CA, 2008). 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 (Cook JD, 2005).

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 (van Santen S и сътр., 2011). 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 (Northrop-Clewes CA, 2008; Cook JD, 2005; Beguin Y, 2003; Lee EJ и сътр., 2002).

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 (Malyszko J и сътр., 2005; Taes YE и сътр., 2004). 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 ($11,66 \%/ \mu\text{g}$), 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 $44,95 \%/ \mu\text{g}$ към $0,18 \%/ \mu\text{g}$.

При проведено проучване (Sabau A и сътр., 2013) 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 (Dallalio G и сътр., 2003; Roe MA и сътр., 2009). Острото възпаление при единична доза терпентин, инжектирана при мишки предизвиква два пъти по-силно намаляване на серумните нива на желязо (Deicher R и сътр., 2004), но този ефект не се наблюдава при модел мишки с дефицит на хепсидин. Тези наблюдения показват, че хепсидинът играе важна роля в хомеостазата на желязо в присъствието на възпаление. При пациентите на Sabau A и сътр., 2013 се установява отрицателна корелационна зависимост между нивата на хепсидин и желязо, които

потвърждават предходни твърдения. При 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 (Cheng PP и сътр., 2010). 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 (Sabau A и сътр., 2013) 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 (van Santen S и сътр., 2011).

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 процесана диагностициране на наущенията на хомеостазата на желязо при различни патологични състояния.

VIII. 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.

IX. 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.

Х. Книгопис

1. Меньшиков ВВ. Теоретические основы клинической лабораторной диагностики. Руководство по клинической лабораторной диагностике. Медицина, Москва; 1981,5-38.
2. Радичева МП. Дисертационен труд на тема „Сравнителна оценка на претоварване с желязо при пациенти с хронични чернодробни заболявания”, УМБАЛ „Св. Иван Рилски”, 2013.
3. Шипковенска Е, Георгиева Л, Генчев Г. Профилактика на заболяванията, в “Приложна епидемиология и медицина базирана на доказателства”. София, Делфи 2002, 121-138.
4. Aeberli I, Hurrell RF, Zimmermann MB. Overweight children have higher circulating hepcidin concentrations and lower iron status but have dietary iron intakes and bioavailability comparable with normal weight children. *Int J Obes (Lond)* 2009;33:1111-7.
5. Aigner E, Theurl I, Theurl M, Lederer D, Haufe H, Dietze O, и сътр.. Pathways underlying iron accumulation in human nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr* 2008;87:1374–83.
6. Allen DA, Breen C, Yaqoob MM, Macdougall IC: Inhibition of CFU-E colon formation in uremic patients with inflammatory disease. Role of IFN- γ and TNF- α . *J Investig Med* 1999; 47: 204–211.
7. Alström T, Gräsbeck R, Hjem R, Skandse S. Recommendations of reference values in clinical chemistry and activity report by the committee of reference values of the Scandinavian Society for clinical chemistry and clinical physiology. *Scand J Clin Lab Invest* 2009,35; suppl. 144.
8. Altamura S, D'Alessio F, Selle B, Muckenthaler MU. A novel TMPRSS6 mutation that prevents protease auto-activation causes IRIDA. *Biochem J* 2010;431:363-71.
9. Amato A, Santoro N, Calabro P, Grandone A, Swinkels DW, Perrone L, Miraglia Del Giudice E. Effect of body mass index reduction on serum hepcidin levels and iron status in obese children. *Int J Obes* 2010;34:1772– 4.
10. Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD, и сътр.. Plasma hepcidin levels are elevated but responsive to erythropoietin therapy in renal

disease. *Kidney Int* 2009;75:976–81.

11. Au-Yeung HY, Chan J, Chantarojsiri T, Chang CJ. Molecular imaging of labile iron(II) pools in living cells with a turn-on fluorescent probe. *J Am Chem Soc* 2013 Oct 9;135(40):15165-73.

12. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA et al. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet* 2006;38:531-9.

13. Babitt JL, Huang FW, Xia Y, Sidis Y, Andrews NC, Lin HY. Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest* 2007;117:1933-9.

14. Bachorzewska-Gajewska H, Kotwa K, Dobrzycki S, Malyszko J. Iron status in relations to pathogenesis of heart failure in patients undergoing elective coronary angiography. *Experimental and Clinical Cardiology* 2014;20(1):210-21.

15. Bansal SS, Abbate V, Bomford A, Halket JM, Macdougall IC, Thein SL, Hider RC. Quantitation of hepcidin in serum using ultra-high-pressure liquid chromatography and a linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2010;24:1251–9.

16. Barisani D, Pelucchi S, Mariani R, Galimberti S, Trombini P, Fumagalli D, и сътр.. Hepcidin and iron-related gene expression in subjects with Dysmetabolic Hepatic Iron Overload. *J Hepatol* 2008;49:123–33.

17. Bayele HK, McArdle H, Srai SK. Cis and trans regulation of hepcidin expression by upstream stimulatory factor. *Blood* 2006;108:4237-45.

18. Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta* 2003;329:9–22.

19. Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, Dahman M, Ramesh B, и сътр.. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* 2006;131:788 –96.

20. Belenkiy D, Galushko E, Novicov AA. Interrelation of level pro-hepcidin with development of an anemia in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Disease* 2013 Jun;71.

21. Bovy C, Gothot A, Delanaye P, Warling X, Krzesinski JM, Beguin Y. Mature erythrocyte parameters as new markers of functional iron deficiency in

haemodialysis: sensitivity and specificity. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:1156–62.

22. Bozzini C, Campostrini N, Trombini P, Nemeth E, Castagna A, Tenuti I et al. Measurement of urinary hepcidin levels by SELDI-TOF-MS in HFE-hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis* 2008;40:347-52.

23. Braliou GG, Verga Falzacappa MV, Chachami G, Casanovas G, Muckenthaler MU, Simos G. 2-Oxoglutarate-dependent oxygenases control hepcidin gene expression. *J Hepatol* 2008;48:801-10.

24. Bregman DB, Goodnough LT. Experience with intravenous ferric carboxymaltose in patients with iron deficiency anemia. *Therapeutic Advances in Hematology* 2014 Apr;5(2):48-60.

25. Brugnara C, Schiller B, Moran J. Reticulocyte hemoglobin equivalent (Ret He) and assessment of iron-deficient states. *Clin Lab Haematol* 2006;28:303–8.

26. Brugnara C. Iron deficiency and erythropoiesis: new diagnostic approaches. *Clin Chem* 2003;49:1573–8.

27. Busbridge M, Griffiths C, Ashby D, Gale D, Jayantha A, Sanwaiya A, Chapman RS. Development of a novel immunoassay for the iron regulatory peptide hepcidin. *Br J Biomed Sci* 2009;66:150 –7.

28. Buttner J, Borth R, Boutwell JH и сътр.. Approved recommendation on quality control in clinical chemistry. Part 1. *Clin Chim Acta* 1998; ½:129-143.

29. Camaschella C. Rare anemias due to disorders of iron metabolism. *International Journal of Laboratory Hematology* 2014; 36:27.

30. Charlotte C.M. Schaap, Jan C.M. Hendriks, Guus A.M. Kortman, Siem M. Klaver, Joyce J.C. Kroot, Coby M.M. Laarakkers,3 Erwin T. Wiegerinck,3 Harold Tjalsma, Mirian C.H. Janssen, and Dorine W. Swinkels. Diurnal Rhythm rather than Dietary Iron Mediates Daily Hepcidin Variations. *Clinical Chemistry* 59:3, 527–535 (2013).

31. Cheng HL, et al. "Iron, hepcidin and inflammatory status of young healthy overweight and obese women in Australia." *PloS one* 8.7 (2013): e68675.

32. Cheng PP, Jiao XY, Wang XH, Lin JH, Cai YM. Hepcidin expression in anemia of chronic disease and concomitant iron deficiency anemia. *Clin Exp Med* 2011;11:33–42.

33. Chonchol M, Lippi G, Montagnana M, Muggeo M, Targher, G: Association of

inflammation with anaemia in patients with chronic kidney disease not requiring chronic dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 23: 584–593, 2008.

34. Chung M, Moorthy D, Hadar N, Salvi P, Iovin RC, Lau J. Biomarkers for Assessing and Managing Iron Deficiency Anemia in Late-Stage Chronic Kidney Disease. Agency for Healthcare Research and Quality; U.S. Department of Health and Human Services; Contract No. 290-2007-10055-I; 2012.

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

36. Cook JD. Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005;18:319–32.

37. Corradini E, Meynard D, Wu Q, Chen S, Ventura P, Pietrangelo A, Babitt JL. Serum and liver iron differently regulate the bone morphogenetic protein 6 (BMP6)-SMAD signaling pathway in mice. *Hepatology* 2011.

38. Corradini E, Schmidt PJ, Meynard D, Garuti C, Montosi G, Chen S et al. BMP6 treatment compensates for the molecular defect and ameliorates hemochromatosis in Hfe knockout mice. *Gastroenterology* 2010;139:1721-9.

39. Costa E, Swinkels DW, Laarakkers CM, Rocha-Pereira P, Rocha S, Reis F. и сътр.. Hepcidin serum levels and resistance to recombinant human erythropoietin therapy in haemodialysis patients. *Acta Haematol* 2009;122:226 –9.

40. Cuijpers ML, Raymakers RA, Mackenzie MA, de Witte TJ, Swinkels DW. Recent advances in the understanding of iron overload in sideroblastic myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2010;149:322-33.

41. Dallalio G, Fleury T, Means T: Serum hepcidin in clinical specimens. *Br J Haematol* 2003; 122: 996–1000.

42. Dao MC, Meydani SN: Iron biology, immunology, aging, and obesity: four fields connected by the small peptide hormone hepcidin. *Adv Nutr* 2013;4:602-617.

43. De Domenico I, Ward DM, Nemeth E, Vaughn MB, Musci G, Ganz T, Kaplan J. The molecular basis of ferroportin-linked hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*

2005;102:8955-60.

44. De Domenico I, Zhang TY, Koenig CL, Branch RW, London N, Lo E, и сътр.. Hecpidin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice. *J Clin Invest* 2010; 120: 2395– 405.

45. Deicher R, HÖrl W H. Hecpidin: a molecular link between inflammation and anemia. *Nephrol Dial Transplant* 2004 Mar; 19 (3):521-4.

46. De Mast Q, Nadjm B, Reyburn H, Kemna EH, Amos B, Laarakkers CM, и сътр.. Assessment of urinary concentrations of hecpidin provides novel insight into disturbances in iron homeostasis during malarial infection. *J Infect Dis* 2009; 199: 253– 62.

47. De Mast Q, Syafruddin D, Keijmel S, Olde RT, Deky O, Asih PB, и сътр.. Increased serum hecpidin and alterations in blood iron parameters associated with asymptomatic *P. falciparum* and *P. vivax* malaria. *Haematologica* 2010; 95: 1068–74.

48. De Mast Q, van Dongen-Lases EC, Swinkels DW, Nieman AE, Roestenberg M, Druilhe P, и сътр.. Mild increases in serum hecpidin and interleukin-6 concentrations impair iron incorporation in haemoglobin during an experimental human malaria infection. *Br J Haematol* 2009; 145: 657– 64.

49. Del Giudice EM, Santoro N, Amato A, Brienza C, Calabro P, Wiegerinck ET, и сътр.. Hecpidin in obese children as a potential mediator of the association between obesity and iron deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:5102–7.

50. Delaby C, Pilard N, Goncalves AS, Beaumont C, Canonne-Hergaux F. The presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and downregulated by hecpidin. *Blood* 2005;106:3979-84.

51. Divakaran V, Mehta S, Yao D, Hassan S, Simpson S, Wiegerinck E, и сътр.. Hecpidin in anemia of chronic heart failure. *Am J Hematol* 2011;86:107–9.

52. Durigova A, Lamy PJ, Thezenas S, Pouderoux S, Montels F, Romieu G, Gutowski M, Jacot W: Anemia and iron biomarkers in patients with early breast cancer. Diagnostic value of hecpidin and soluble transferrin receptor quantification. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1833-1841.

53. Dybkaer K. The theory of reference values. Part 6. *J Clin Chem Clin Biochem*, 1973, 20;11:841-845.

54. Dybkaer K. The theory of reference values. Part 2. *J Clin Chem Clin Biochem*, 1979, 10;9:241-245.
55. Eschbach JW, Cook JD, Scribner BH, Finch CA: Iron balance in hemodialysis patients. *Ann Intern Med* 1977; 87: 710–713.
56. Fang Jiang, Wen-Jun Yu, Xue-Hua Wang, Yue-Ting Tang, Li Guoa, Xiao-Yang Jiao. Regulation of hepcidin through GDF-15 in cancer-related anemia. *Clinica Chimica Acta* 428 (2014) 14–19.
57. Fatih N, Camberlein E, Island ML, Corlu A, Abgueguen E, Detivaud L et al. Natural and synthetic STAT3 inhibitors reduce hepcidin expression in differentiated mouse hepatocytes expressing the active phosphorylated STAT3 form. *J Mol Med* 2010;88:477-86.
58. Fernandez-Rodriguez AM, Guindeo-Casasus MC, Molero-Labarta T, Dominguez-Cabrera C, Hortal-Cascn L, Perez-Borges P, Vega-Diaz N, Saavedra-Santana P, Palop-Cubillo L: Diagnosis of iron deficiency in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 1999; 34: 508–513.
59. Finberg KE, Whittlesey RL, Fleming MD, Andrews NC. Down-regulation of Bmp/Smad signaling by *Tmprss6* is required for maintenance of systemic iron homeostasis. *Blood* 2010;115:3817-26.
60. Ford BA, Eby CS, Scott MG, Coyne DW. Intraindividual variability in serum hepcidin precludes its use as a marker of iron status in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2010;78:769–73.
61. Galesloot TE, Vermeulen SH, Geurts-Moespot AJ, Klaver SM, Kroot JJ, van Tienoven D et al. Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood* 2011.
62. Ganz T, Nemeth E. Iron sequestration and anemia of inflammation. *Semin Hematol* 2009;46:387–393.
63. Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood* 2008; 112:4292–7.
64. Gardenghi S, Casu C, Renaud TM, Meloni A, Cooke KS, Sasu BJ, et al. Investigating the role of cytokines and hepcidin in anemia of inflammation. *American Journal of Hematology* 2013 May;88(5):E124.
65. Gardenghi S, Ramos P, Marongiu MF, Melchiori L, Breda L, Guy E et al.

Hepcidin as a therapeutic tool to limit iron overload and improve anemia in beta-thalassemic mice. *J Clin Invest* 2010;120:4466-77.

66. Goodnough L, Morris D, Koch T, He A, Bregman D. Hepcidin assay and IV iron therapy are superior to ferritin and oral iron therapy in identifying patients with iron deficiency anemia (IDA). *American Journal of Hematology* 2013 May;88(5):E11.

67. Goodnough LT, Nemeth E, Ganz T. Detection, evaluation, and management of iron-restricted erythropoiesis. *Blood* 2010;116: 4754–61.

68. Gräsbeck R, Siest G, Wilding P и сътр.. Provisional recommendations on the theory of reference values. Part I. *J Clin Chem Clin Biochem* 1979,17;5:337-339.

69. Grebenchtchikov N, Geurts-Moespot AJ, Kroot JJ, den HM, Tjalsma H, Swinkels DW, Sweep FG. High-sensitive radioimmunoassay for human serum hepcidin. *Br J Haematol* 2009;146:317-25.

70. Hamza RT, Hamed AI, Kharshoum RR. Iron homeostasis and serum hepcidin-25 levels in obese children and adolescents: relation to body mass index. *Horm Res Paediatr* 2013;80(1):11-7.

71. Hashizume M, Uchiyama Y, Horai N, Tomosugi N, Mihara M. Tocilizumab, a humanized antiinterleukin-6 receptor antibody, improved anemia in monkey arthritis by suppressing IL-6-induced hepcidin production. *Rheumatol Int* 2010;30:917-23.

72. Hazzan AD, Shah HH, Hong S, Sakhiya V, Wanchoo R, Fishbane S. Treatment with erythropoiesis-stimulating agents in chronic kidney disease patients with cancer. *Kidney International* 2014; 86(1):34-39.

73. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 2010; 142: 24 –38.

74. Hohaus S, Massini G, Giachelia M, Vannata B, Bozzoli V, Cuccaro A, и сътр.. Anemia in Hodgkin's lymphoma: the role of interleukin-6 and hepcidin. *J Clin Oncol* 2010;28:2538–43.

75. Huang H, Constante M, Layoun A, Santos MM. Contribution of STAT3 and SMAD4 pathways to the regulation of hepcidin by opposing stimuli. *Blood* 2009;113:3593–9.

76. Janssen MC, Swinkels DW. Hereditary haemochromatosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2009;23:171-83.

77. Jordan JB, Poppe L, Haniu M, Arvedson T, Syed R, Li V et al. Heparin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure. *J Biol Chem* 2009;284:24155-67.
78. Joyce J.C.Kroot, Harold Tjalsma, Robert E.Fleming, Dorine W.Swinkels. Heparin in human iron disorders: diagnostic implications. *Clin Chem* 2011; 57:12, 1650-1669.
79. Kalantar-Zadeh K, McAllister CJ, Lehn RS, Lee GH, Nissenson AR, Kopple JD: Effect of malnutrition-inflammation complex syndrome on EPO hyporesponsiveness in maintenance hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 42:761–773, 2003.
80. Kasprowicz, K., et al. "Running a 100-km ultra-marathon induces an inflammatory response but does not raise the level of the plasma iron-regulatory protein heparin." *J Sports Med.Phys.Fitness* 53.5 (2013): 533-37.
81. Keller H. Einflüsse auf klinisch-chemisch Mess grössen. Validität klinisch-chemischer befunde, Herausg 1974,25-49.
82. Kemna EH, Kartikasari AE, van Tits LJ, Pickkers P, Tjalsma H, Swinkels DW. Regulation of heparin: Insights from biochemical analyses on human serum samples. *Blood Cells Mol Dis* 2008;40:339-46.
83. Kemna EH, Tjalsma H, Podust VN, Swinkels DW. Mass spectro-metry-based heparin measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications. *Clin Chem* 2007;53: 620–8.
84. Kemna EH, Tjalsma H, Willems HL, Swinkels DW. Heparin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica* 2008;93: 90–7.
85. Kim JW, Kang KM, Yoon TK, Shim SH, Lee WS. Study of circulating heparin in association with iron excess, metabolic syndrome, and BMP-6 expression in granulosa cells in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2014; 102(2):548-554.
86. Koc-Zorawska E, Glowinska I, Mysliwiec M, Malyszko J. GDF-15, heparin in relation to anaemia and heparin in prevalent renal allograft recipients. *Transplant International* 2013 Nov;26:261.
87. Koenig MD, Tussing-Humphreys L, Day J, Cadwell B, Nemeth E. Heparin and iron homeostasis during pregnancy. *Nutrients*. 2014 Aug 4;6(8):3062-83. doi: 10.3390/nu6083062.
88. Koliaraki V, Marinou M, Vassilakopoulos TP, Vavourakis E, Tsochatzis E,

Pangalis GA, Papatheodoridis G, Stamoulakatou A, Swinkels DW, Papanikolaou G, Mamalaki A. A Novel Immunological Assay for Heparin Quantification in Human Serum. *Plosone* February 2009; DOI: 10.1371/journal.pone.0004581

89. Kong WN, Lei YH, Chang YZ. The regulation of iron metabolism in the mononuclear phagocyte system. *Expert Rev Hematol* 2013 Aug;6(4):411-8.

90. Kraml PJ, Klein RL, Huang Y, Nareika A, Lopes-Virella MF. Iron loading increases cholesterol accumulation and macrophage scavenger receptor I expression in THP-1 mononuclear phagocytes. *Metabolism* 2005;54:453-9.

91. Kroot JJ, Hendriks JC, Laarakkers CM, Klaver SM, Kemna EH, Tjalsma H, Swinkels DW. (Pre)analytical imprecision, between-subject variability, and daily variations in serum and urine hepcidin: implications for clinical studies. *Anal Biochem* 2009;389:124-9.

92. Kroot JJ, Kemna EH, Bansal SS, Busbridge M, Campostrini N, Girelli D et al. Results of the first international round robin for the quantification of urinary and plasma hepcidin assays: need for standardization. *Haematologica* 2009;94:1748-52.

93. Kroot JJ, Laarakkers CM, Geurts-Moespot AJ, Grebenchtchikov N, Pickkers P, van Ede AE, et al. Immunochemical and mass- spectrometry-based serum hepcidin assays for iron metabolism disorders. *Clin Chem* 2010;56:1570-9.

94. Kulaksiz H, Theilig F, Bachmann S, Gehrke SG, Rost D, Janetzko A, Cetin Y, Stremmel W: The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: Expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J Endocrinol* 184: 361-370, 2005.

95. Kuragano T, Shimonaka Y, Kida A, Furuta M, Nanami M, Otaki Y, и сътр.. Determinants of hepcidin in patients on maintenance hemodialysis: role of inflammation. *Am J Nephrol* 2010;31:534-40.

96. Lakhai S, Schoedel J, Townsend AR, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. Regulation of type II transmembrane serine proteinase TMPRSS6 by hypoxia-inducible factors: new link between hypoxia signalling & iron homeostasis. *J Biol Chem* 2010.

97. Lapenna D, Pierdomenico SD, Ciofani G, Uchino S, Neri M, Giamberardino MA, Cuccurullo F. Association of body iron stores with low molecular weight iron and oxidant damage of human atherosclerotic plaques. *Free Radic Biol Med* 2007;42:492- 8.

98. Lasocki S, Baron G, Driss F, Westerman M, Puy H, Boutron I, et al. Diagnostic

accuracy of serum hepcidin for iron deficiency in critically ill patients with anemia. *Intensive Care Med* 2010;36: 1044–8.

99. Lee EJ, Oh EJ, Park YJ, Lee HK, Kim BK. Soluble transferrin receptor (sTfR), ferritin, and sTfR/log ferritin index in anemic patients with nonhematologic malignancy and chronic inflammation. *Clin Chem* 2002;48:1118–21.

100. Lee PL, Beutler E. Regulation of hepcidin and iron-overload disease. *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 489–515.

101. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Greene T, Coresh J; CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med*. 2009 May 5;150(9):604-12.

102. Li H, Rose MJ, Tran L, Zhang J, Miranda LP, James CA, Sasu BJ. Development of a method for the sensitive and quantitative determination of hepcidin in human serum using LC-MS/MS. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2009;59:171– 80.

103. Macdougall IC, Cooper AC: Erythropoietin resistance: The role of inflammation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant* 17[Suppl 11]: 39–43, 2002.

104. McDonald, I. и др. Rusty Old Stars: A Source of the Missing Interstellar Iron?. // *The Astrophysical Journal Letters* 717, 2010. DOI:10.1088/2041-8205/717/2/L92. с. L92–L97.

105. M C Dao, S Sen, C Iyer, D Klebenov, S N Meydani. Obesity during pregnancy and fetal iron status: is hepcidin the link? *Journal of Perinatology* 33, 177-181 (March 2013) | doi:10.1038/jp.2012.81.

106. Maes K, Nemeth E, Roodman GD, Huston A, Esteve F, Freytes C, и сътр.. In anemia of multiple myeloma, hepcidin is induced by increased bone morphogenetic protein 2. *Blood* 2010;116:3635–44.

107. Malyszko J, Mysliwiec M. hepcidin in Anemia and Inflammation in Chronic Kidney Disease *Kidney Blood Press Res* 2007;30:15–30.

108. Malyszko J, Malyszko JS, Hryszko T, Pawlak K, Mysliwiec M: Is hepcidin a link between anemia, inflammation and liver function in hemodialyzed patients? *Am J Nephrol* 2005; 25: 586–590.

109. Martines AM, Masereeuw R, Tjalsma H, Hoenderop JG, Wetzels JF, Swinkels DW. Iron metabolism in the pathogenesis of iron-induced kidney injury. *Nat Rev Nephrol* 2013 Jul;9(7):385-98.
110. Mastrogiannaki M, Matak P, Keith B, Simon MC, Vaulont S, Peyssonnaud C. HIF-2alpha, but not HIF-1alpha, promotes iron absorption in mice. *J Clin Invest* 2009;119:1159-66.
111. Matsumoto M, Tsujino T, Lee-Kawabata M, Naito Y, Akahori H, Sakoda T, и сътр.. Iron regulatory hormone hepcidin decreases in chronic heart failure patients with anemia. *Circ J* 2010;74:301– 6.
112. Melissa F. Young, Ian Griffin, Eva Pressman, Allison W. McIntyre, Elizabeth Cooper, Thomas McNanley, Z. Leah Harris, Mark Westerman, Kimberly O. O'Brien. Maternal Hepcidin Is Associated with Placental Transfer of Iron Derived from Dietary Heme and Nonheme Sources. *J Nutr.* 2012 Jan;142(1):33-9. doi: 10.3945/jn.111.145961. Epub 2011 Nov 23.
113. Mercadal L, Metzger M, Haymann JP, Thervet E, Boffa JJ, Flamant M, et al. A 3-marker index improves the identification of iron disorders in CKD anaemia. *PloS one* 2014 Feb 19;9(2).
114. Mertz W. Trace-element nutrition in health and disease: contributions and problems of analysis. *Clin Chem* 1995,21; 4:468-475.
115. Morgan, John W. и др. Chemical composition of Earth, Venus, and Mercury. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77, 1980. DOI:10.1073/pnas.77.12.6973. с. 6973–6977.
116. Murphy AT, Witcher DR, Luan P, Wroblewski VJ. Quantitation of hepcidin from human and mouse serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Blood* 2007;110:1048-54.
117. Nairz M, Haschka D, Demetz E, Weiss G. Iron at the interface of immunity and infection. *Frontiers in Pharmacology* 2014; 5.
118. Nancy C.Andrews. Forging a field: the golden age off iron biology. *Blood* 2008, 112(2): 219-230.
119. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its

internalization. *Science* 2004;306:2090-3.

120. Nemeth E. Heparin Biology and Therapeutic Applications. *Expert Rev Hematol* 2010;3:153-5.

121. Nemeth E. Targeting the hepcidin-ferroportin axis in the diagnosis and treatment of anemias. *Adv Hematol* 2010;2010:750643.

122. Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. Heparin, a new iron regulatory peptide. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29:327–35.

123. Northrop-Clewes CA. Interpreting indicators of iron status during an acute phase response: lessons from malaria and human immunodeficiency virus. *Ann Clin Biochem* 2008;45:18–32.

124. Nweneka CV, Doherty CP, Cox S, Prentice A. Iron delocalisation in the pathogenesis of malarial anaemia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010; 104:175– 84.

125. Oliveira SJ, Pinto JP, Picarote G, Costa VM, Carvalho F, Rangel M et al. ER stress-inducible factor CHOP affects the expression of hepcidin by modulating C/EBPalpha activity. *PLoS ONE* 2009;4:e6618.

126. Outi Itkonen, Jaakko Parkkinen, Ulf-Håkan Stenman, Esa Hämäläinen. Preanalytical factors and reference intervals for serum hepcidin LC–MS/MS method. *Clinica Chimica Acta* 413 (2012) 696–701.

127. Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood* 2006;108:3730-5.

128. Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JI, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J, и сътр.. Heparin in iron overload disorders. *Blood* 2005; 105:4103–5.

129. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T: Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276: 7806–7810, 2001.

130. Peeling P, Dawson B, Goodman C, Landers G, Trinder D. Athletic induced iron deficiency: new insights into the role of inflammation, cytokines and hormones. *Eur J Appl Physiol* 2008;103:381–91.

131. Peeling P, Dawson B, Goodman C, Landers G, Wiegerinck ET, Swinkels DW, Trinder D. Cumulative effects of consecutive running sessions on hemolysis, inflammation and hepcidin activity. *Eur J Appl Physiol* 2009;106:51–9.

132. Peeling P, Dawson B, Goodman C, Landers G, Wiegerinck ET, Swinkels DW, Trinder D. Training surface and intensity: inflammation, hemolysis, and hepcidin expression. *Med Sci Sports Exerc* 2009;41:1138–45.

133. Peeling P. Exercise as a mediator of hepcidin activity in athletes. *Eur J Appl Physiol* 2010;110:877–83.

134. Peters HP, Laarakkers CM, Swinkels DW, Wetzels JF. Serum hepcidin-25 levels in patients with chronic kidney disease are independent of glomerular filtration rate. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:848 –53.

135. Petit Clerc C, Wilding P. The theory of reference values. Part 2. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984;22; 203-208.

136. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest* 2007;117:1926-32.

137. Pietrangelo A. Hepcidin in human iron disorders: therapeutic implications. *J Hepatol* 2011;54:173-81.

138. Pinto JP, Ribeiro S, Pontes H, Thowfeequ S, Tosh D, Carvalho F, Porto G. Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBPalpha. *Blood* 2008;111:5727-33.

139. Poli M, Girelli D, Campostrini N, Maccarinelli F, Finazzi D, Lusciati S et al. Heparin: a potent inhibitor of hepcidin expression in vitro and in vivo. *Blood* 2011;117:997-1004.

140. Popova JG, Terzieva D, Panova M. Determining prohepcidin, soluble transferrin receptor and zn protoporphyrin in anemic syndrome cases. *Klin transfuz hematol* 1-2/2007; 43-48

141. Przybylowski P, Malyszko J, Malyszko JS, Mysliwiec M, Sadowski J. Anemia prevalence and a possible role of hepcidin in its pathogenesis in heart and kidney allograft recipients. *Transplantation* 2010; 90:750.

142. Punnonen K, Irjala K, Rajamaki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997;89:1052–7.

143. Ramey G, Deschemin JC, Durel B, Canonne-Hergaux F, Nicolas G, Vaulont S.

Hepcidin targets ferroportin for degradation in hepatocytes. *Haematologica* 2010;95:501-4.

144. Ramos E, Kautz L, Rodriguez R, Hansen M, Gabayan V, Ginzburg Y et al. Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. *Hepatology* 2011;53:1333-41.

145. Rehu M, Punnonen K, Ostland V, Heinonen S, Westerman M, Pulkki K, Sankilampi U. Maternal serum hepcidin is low at term and independent of cord blood iron status. *Eur J Haematol* 2010;85:345-52.

146. Roe MA, Collings R, Dainty JR, Swinkels DW, Fairweather-Tait SJ. Plasma hepcidin concentrations significantly predict interindividual variation in iron absorption in healthy men. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1088-91.

147. Roecker L, Meier-Buttermilch R, Brechtel L, Nemeth E, Ganz T. Iron-regulatory protein hepcidin is increased in female athletes after a marathon. *Eur J Appl Physiol* 2005;95:569 –71.

148. Ruivard M, Laine F, Ganz T, Olbina G, Westerman M, Nemeth E, и сътр.. Iron absorption in dysmetabolic iron overload syndrome is decreased and correlates with increased plasma hepcidin. *J Hepatol* 2009;50:1219 –25.

149. Sabau A, Valeanu M, Bolotiu HD, Craciun AM. Evaluation of serum hepcidin variation in patients with rheumatoid arthritis according to anemia profile and its correlation with disease activity. *Revista Româna de Medicina de Laborator* Vol. 21, Nr. 1/4, Martie 2013, DOI: 10.2478/rrlm-2013-0014.

150. Sasaki Y, Shimonaka Y, Ikuta K, Hosoki T, Sasaki K, Torimoto Y et al. Hepcidin production in response to iron is controlled by monocyte-derived humoral factors. *Int J Hematol* 2014; 99(1):12-20.

151. Sasu BJ, Cooke KS, Arvedson TL, Plewa C, Ellison AR, Sheng J et al. Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and is effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. *Blood* 2010;115:3616-24.

152. Sasu BJ, Li H, Rose MJ, Arvedson TL, Doellgast G, Molineux G. Serum hepcidin but not prohepcidin may be an effective marker for anemia of inflammation (AI). *Blood Cells Mol Dis* 2010;45: 238–45.

153. Schipper LG, van Hulst LTC, Grol R, van Riel PLCM, Hulscher ME, Fransen J. 29 Meta-analysis of tight control strategies in rheumatoid arthritis: protocolized treatment has

additional value with respect to the clinical outcome. *Rheumatology* 2010;49(11):2154-64

154. Semenza GL. Development of novel therapeutic strategies that target HIF-1. *Expert Opin Ther Targets* 2006;10:267-80.

155. Semrin G, Fishman DS, Bousvaros A, Zholudev A, Saunders AC, Correia CE et al. Impaired intestinal iron absorption in Crohn's disease correlates with disease activity and markers of inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:1101-6.

156. Sharma S, Nemeth E, Chen YH, Goodnough J, Huston A, Roodman GD, и сътр.. Involvement of hepcidin in the anemia of multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2008;14:3262-7.

157. Silvestri L, Pagani A, Camaschella C. Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood* 2008;111:924-31.

158. Soken-Nakazawa J Song, Mitsuhiro Iwahashi, Naohisa Tomosugi, Kazuko Uno, Jiro Yamana, Seizou Yamana, Tomoyasu Isobe, Hiroki Ito, Hiroshi Kawabata and Kazuyuki Yoshizaki. Comparative evaluation of the effects of treatment with tocilizumab and TNF- α inhibitors on serum hepcidin, anemia response and disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Research & Therapy* 2013, 15:R141 doi:10.1186/ar4323

159. Solberg HE. Statistical treatments of collected reference values. Determination of reference limits. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988,21; 11:749-760.

160. Song SN, Iwahashi M, Tomosugi N, Uno K, Yamana J, Yamana S et al. Comparative evaluation of the effects of treatment with tocilizumab and TNF-alpha inhibitors on serum hepcidin, anemia response and disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2013; 15(5):R141.

161. Song SN, Tomosugi N, Kawabata H, Ishikawa T, Nishikawa T, Yoshizaki K. Down-regulation of hepcidin resulting from long-term treatment with an anti-IL-6 receptor antibody (tocilizumab) improves anemia of inflammation in multicentric Castleman disease. *Blood* 2010;116:3627-34.

162. Sow FB, Florence WC, Satoskar AR, SchlesingerLS, Zwilling BS, Lafuse WP. Expression and localization of hepcidin in macrophages: a role in host defense against tuberculosis. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 934-45.

163. Steensma DP, Gattermann N. When is iron overload deleterious, and when and how should iron chelation therapy be administered in myelodysplastic syndromes? Best

Pract Res Clin Haematol 2013; 26(4):431-444.

164. Stephens BJ, Mollard A, Meng L, Bearss DJ, Warner SL. TP-0413 is a dual-specific inhibitor against Jak2 and Alk2 with therapeutic potential for treating anemia of chronic disease. *Cancer Research* 2013 Apr 15;73(8 SUPPL. 1).

165. Stenvinkel P: The role of inflammation in the anaemia of end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 16[Suppl 7]: 36–40, 2001.

166. Sukumaran A, James J, Janardhan HP, Amaladas A, Suresh LM, Danda D, et al. Expression of iron-related proteins in the duodenum is up-regulated in patients with chronic inflammatory disorders. *Br J Nutr* 2014 Mar 28;111(6):1059-68.

167. Sullivan JL. Iron in arterial plaque: modifiable risk factor for atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790:718 –23.

168. Sullivan JL. Macrophage iron, hepcidin, and atherosclerotic plaque stability. *Exp Biol Med* 2007;232:1014 –20.

169. Sun CC, Vaja V, Babitt JL, Lin HY. Targeting the hepcidin-ferroportin axis to develop new treatment strategies for anemia of chronic disease and anemia of inflammation. *Am J Hematol*. 2012 Apr;87(4):392-400.

170. Suzuki H, Toba K, Kato K, Ozawa T, Tomosugi N, Higuchi M, и сътр.. Serum hepcidin-20 is elevated during the acute phase of myocardial infarction. *Tohoku J Exp Med* 2009;218:93– 8.

171. Swinkels DW, Drenth JP. Hepcidin in the management of patients with mild nonhemochromatotic iron overload: fact or fiction? *J Hepatol* 2008;49:680 –5.

172. Swinkels DW, Girelli D, Laarakkers C, Kroot J, Campostrini N, Kemna EH, Tjalsma H. Advances in quantitative hepcidin measurements by time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE* 2008;3:e2706.

173. Swinkels DW, Janssen MC, Bergmans J, Marx JJ. Hereditary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches. *Clin Chem* 2006; 52: 950–68.

174. Swinkels DW, Wetzels JF. Hepcidin: a new tool in the management of anaemia in patients with chronic kidney disease? *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:2450 –3.

175. Taes YE, Wuyts B, Boelaert JR, De Vriese AS, Delanghe JR: Prohepcidin

accumulates in renal insufficiency. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 387–389.

176. Tchou I, Diepold M, Pilotto PA, Swinkels D, Neerman-Arbez M, Beris P. Haematologic data, iron parameters and molecular findings in two new cases of iron-refractory iron deficiency anaemia. *Eur J Haematol* 2009;83:595-602.

177. Theurl I, Aigner E, Theurl M, Nairz M, Seifert M, Schroll A, et al. Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications. *Blood* 2009;113:5277–86.

178. Thomas C, Kobold U, Balan S, Roeddiger R, Thomas L. Serum hepcidin-25 may replace the ferritin index in the Thomas plot in assessing iron status in anemic patients. *Int J Lab Hematol* 2011;33:187–93.

179. Thomas C, Thomas L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem* 2002;48:1066–76.

180. Tjalsma H, Laarakkers CM, van Swelm RP, Theurl M, Theurl I, Kemna EH et al. Mass spectrometry analysis of hepcidin peptides in experimental mouse models. *PLoS ONE* 2011;6:e16762.

181. Tomosugi N, Kawabata H, Wakatabe R, Higuchi M, Yamaya H, Umehara H, Ishikawa I. Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. *Blood* 2006;108:1381–7.

182. Trabulo D, Teixeira C, Mangualde J, Cremers I, Oliveira AP. Iron deficiency anemia in inflammatory bowel disease: Are we treating our patients efficiently? *Journal of Crohn's and Colitis* 2014 Feb;8:S246-S247.

183. Troadec MB, Laine F, Daniel V, Rochcongar P, Ropert M, Cabillic F, и сътр.. Daily regulation of serum and urinary hepcidin is not influenced by submaximal cycling exercise in humans with normal iron metabolism. *Eur J Appl Physiol* 2009;106:435– 43.

184. Tussing-Humphreys LM, Nemeth E, Fantuzzi G, Freels S, Holterman AX, Galvani C, и сътр.. Decreased serum hepcidin and improved functional iron status 6 months after restrictive bariatric surgery. *Obesity* 2010;18:2010–6.

185. Ukarma L, Johannes H, Beyer U, Zaug M, Osterwalder B, Scherhag A. Hepcidin as a predictor of response to epoetin therapy in anemic cancer patients. *Clin Chem* 2009;55:1354–60.

186. Ullrich C, Wu A, Armsby C, Rieber S, Wingerter S, Brugnara C, et al. Screening healthy infants for iron deficiency using reticulo- cyte hemoglobin content. *JAMA* 2005;294:924–30.

187. Valenti L, Girelli D, Valenti GF, Castagna A, Como G, Campostrini N, и сътр.. HFE mutations modulate the effect of iron on serum hepcidin-25 in chronic hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:1331–7.

188. van der Putten K, Jie KE, van den Broek D, Kraaijenhagen RJ, Laarakkers C, Swinkels DW, и сътр.. Hepcidin-25 is a marker of the response rather than resistance to exogenous erythropoietin in chronic kidney disease/chronic heart failure patients. *Eur J Heart Fail* 2010;12:943–50.

189. Van Santen S, de Mast Q, Luty AJ, Wiegerinck ET, van der Ven A, Swinkels DW. Iron homeostasis in mother and child during placental malaria infection. *Am J Trop Med Hyg* 2011;84:148-51.

190. van Santen S, Kroot JJ, Zijderveld G, Wiegerinck ET, Spaanderman ME, Swinkels DW. The iron regulatory hormone hepcidin is decreased in pregnancy: a prospective longitudinal study. *Clin Chem Lab Med.* 2013 Jul;51(7):1395-401. doi: 10.1515/cclm-2012-0576.

191. van Santen S, van Dongen-Lases EC, de Vegt F, Laarakkers CM, van Riel PL, van Ede AE, Swinkels DW Hepcidin and hemoglobin content parameters in the diagnosis of iron deficiency in rheumatoid arthritis patients with anemia. *Arthritis Rheum.* 2011 Dec; 63(12):3672-80. doi: 10.1002/art.30623.

192. Vecchi C, Montosi G, Zhang K, Lamberti I, Duncan SA, Kaufman RJ, Pietrangelo A. ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin. *Science* 2009;325:877-80.

193. Verga Falzacappa MV, Vujic SM, Kessler R, Stolte J, Hentze MW, Muckenthaler MU. STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood* 2007;109:353-8.

194. Viatte L, Vaulont S. Hepcidin, the iron watcher. *Biochimie* 2009;91:1223– 8.

195. Viethen T, Gerhardt F, Dumitrescu D, Knoop-Busch S, Ten FH, Rudolph TK et al. Ferric carboxymaltose improves exercise capacity and quality of life in patients with pulmonary arterial hypertension and iron deficiency: A pilot study. *International Journal of*

Cardiology 2014; 175(2):233-239.

196. Vokurka M, Krijt J, Sulc K, Necas E. Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res* 2006;55:667-74.

197. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med* 2005;352:1011–23.

198. Weiss G, Theurl I, Eder S, Koppelstaetter C, Kurz K, Sonnweber T, и сътр.. Serum hepcidin concentration in chronic haemodialysis patients: associations and effects of dialysis, iron and erythropoietin therapy. *Eur J Clin Invest* 2009;39:83–90.

199. World Health Organization. Conclusions and recommendations of the WHO Consultation on prevention and control of iron deficiency in infants and young children in malaria-endemic areas. *Food Nutr Bull* 2007;28:S621–7.

200. Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* 2006;108:3204-9.

201. Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, Babitt JL, Deng DY, Hoyng SA et al. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol* 2008;4:33-41.

202. Zaritsky J, Young B, Gales B, Wang HJ, Rastogi A, Westerman M, и сътр.. Reduction of serum hepcidin by hemodialysis in pediatric and adult patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:1010–4.

203. Zaritsky J, Young B, Wang HJ, Westerman M, Olbina G, Nemeth E, и сътр.. Hepcidin—a potential novel biomarker for iron status in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:1051– 6.

204. Zaritsky JJ, Young BY. The utility of multivariate analysis in the study of hepcidin. *Kidney Int* 2009;76:912–3.

205. Zhang X, Jin M, Wu H, Nadasdy T, Nadasdy G, Harris N et al. Biomarkers of lupus nephritis determined by serial urine proteomics. *Kidney Int* 2008;74:799-807.

206. Zucker SD. The swinging pendulum of the anemia of cancer: erythropoietin trumps hepcidin. *J Clin Oncol* 2011;29:e42.

ХІ. Приложения

Приложение 1. Списък на изследваните референтни лица

№	иници- али	пол	въз- раст	№	иници- али	пол	въз- раст	№	иници- али	пол	въз- раст
Z1	СЗД	Ж	42	Z14	ВКИ	Ж	33	Z25	АСП	М	27
Z2	МСР	Ж	43	Z15	МЛИ	Ж	28	Z26	ЙПГ	М	25
Z3	БДТ	Ж	39	Z16	КИК	Ж	42	Z27	РПГ	М	30
Z4	МЦД	Ж	46	Z17	НЙК	Ж	45	Z28	ИББ	М	25
Z5	МДС	Ж	24	Z18	МТ	М	65	Z29	ДЙХ	М	40
Z6	ИИЗ	М	28	Z19	АДД	М	40	Z30	ГБМ	М	29
Z8	ЕОП	Ж	28	Z20	ТПТ	Ж	31	Z31	ИИМ	Ж	49
Z9	ЕГК	Ж	24	Z21	СВ	Ж	32	Z32	ПИМ	Ж	60
Z10	МТИ	Ж	44	Z22	АД	Ж	29	Z34	МП	Ж	44
Z12	ВЦБ	Ж	45	Z24	СС	Ж	31	Z35	КИК	М	42
Z13	РЦЦГ	Ж	46	Z23	ДНК	М	29	Z36	ТА	М	23
Z33	ВГВ	М	47	Z47	КИИ	Ж	23	Z58	ФПХ	М	23
Z37	ССС	М	23	Z48	ДРК	Ж	25	Z59	МАМ	М	23
Z38	ХБП	М	23	Z49	ДИП	Ж	23	Z60	КТ	М	24
Z39	ВАА	М	23	Z50	СХШ	М	23	Z61	ДРК	Ж	23
Z40	ВОП	М	22	Z51	КС	М	24	Z62	ММП	М	23
Z41	АБН	Ж	23	Z52	ДГТ	М	23	Z66	АРТ	М	23
Z42	ИЖТ	М	23	Z53	ИТФ	Ж	24	Z64	НСБ	Ж	44
Z43	МАТ	Ж	23	Z54	КГА	М	23	Z65	ЛКГ	Ж	41

Продължение на Приложение 1. Списък на изследваните референтни лица

№	иници- али	пол	въз- раст	№	иници- али	пол	въз- раст	№	иници- али	пол	въз- раст
Z44	ЮКК	Ж	29	Z55	ЛСР	М	24	Z66	НПТ	Ж	23
Z45	ААЧ	Ж	24	Z56	ИАП	Ж	23	Z67	ВАТ	Ж	27
Z46	МБТ	М	23	Z57	МГИ	Ж	23	Z68	АХХТ	Ж	23
Z69	МХТ	М	24	Z85	ВНМ	Ж	23	Z101	ВГМ	Ж	21
Z70	ЛЯ	Ж	23	Z86	АА	Ж	24	Z102	МРГ	М	32
Z71	ХВИ	М	23	Z87	АЙ	Ж	22	Z103	КБИ	М	21
Z72	ВМГ	Ж	24	Z88	СВГ	М	23	Z104	ДЗП	Ж	21
Z73	АПД	М	54	Z89	КСК	М	23	Z105	АСП	Ж	22
Z74	АЕХ	Ж	23	Z90	ЛВК	Ж	24	Z106	ППП	Ж	21
Z75	ББР	Ж	23	Z91	ТК	М	26	Z107	АСБ	М	25
Z76	ДКБ	Ж	36	Z92	МЗБ	Ж	22	Z108	ТГТ	Ж	20
Z77	ЖБЖ	Ж	28	Z93	ПМН	М	23	Z109	ВАТ	Ж	22
Z78	ИД	Ж	23	Z94	ЛВС	Ж	25	Z110	БЗД	М	21
Z79	ИЦТ	Ж	28	Z95	МАО	Ж	22	Z111	ТКН	М	24
Z80	ЕКП	Ж	23	Z96	СЖД	М	24	Z112	ВГБ	М	64
Z81	ГГН	М	23	Z97	ДМАМ	Ж	23	Z113	ТСВ	Ж	22
Z82	ЛДС	М	24	Z98	СВЗ	М	21	Z114	ЕДС	Ж	21
Z83	МГК	Ж	26	Z99	ККТ	М	22	Z115	СДМ	Ж	21
Z84	АИП	М	23	Z100	БДА	Ж	53	Z116	МИМ	Ж	22
Z117	ТПТ	Ж	32	Z133	ВПБ	Ж	51	Z147	СВА	М	32

Продължение на Приложение 1. Списък на изследваните референтни лица

№	иници- али	пол	въз- раст	№	иници- али	пол	въз- раст	№	иници- али	пол	въз- раст
Z118	РМАМ	М	25	Z134	ССЦ	Ж	23	Z148	СА	Ж	53
Z119	АПГ	М	21	Z135	ВПЦ	Ж	18	Z149	ЕПБ	Ж	23
Z120	КНК	Ж	21	Z136	МТТ	Ж	21	Z150	ЕЧМ	Ж	41
Z121	ДДД	М	21	Z137	ЛИИ	Ж	21	Z151	МИИШ	Ж	40
Z122	СРК	Ж	22	Z138	МПМ	М	22	Z152	НТГ	Ж	36
Z123	КМГМ	М	21	Z139	БПП	М	50	Z153	СМ	Ж	39
Z124	БНУ	Ж	21	Z140	КСХ	Ж	44	Z154	ДИМ	Ж	48
Z125	ТЖИ	М	21	Z141	ММТ	Ж	24	Z155	ИМТ	Ж	44
Z126	ШШХ	М	21	Z142	ВХ	Ж	70	Z156	ЕН	Ж	61
Z127	МХК	Ж	21	Z143	ИТ	Ж	70	Z157	ССЛ	Ж	37
Z128	ВЕМ	М	40	Z144	ЛК	Ж	50	Z158	ВКА	Ж	42
Z129	ЕСД	М	21	Z145	ГБП	Ж	29	Z159	РКХ	Ж	49
Z130	РЕГ	Ж	21	Z146	НЕН	М	31	Z160	АИ	М	63
Z131	ИКГ	Ж	22	Z161	НИД	Ж	60	Z163	МВ	Ж	41
Z132	ТИБ	Ж	26	Z162	РКГ	Ж	56	Z164	ТЯ	Ж	45
Z165	СПС	Ж	44	Z170	ССИ	Ж	56	Z175	ТСВ	Ж	74
Z166	ВСК	Ж	48	Z171	МГ	Ж	55	Z176	ГВМ	М	76
Z167	ВИС	Ж	49	Z172	ЕМС	Ж	45	Z177	ЮЯ	М	57
Z168	МК	Ж	64	Z173	ЯКХ	Ж	57	Z178	ЕМШ	Ж	61
Z169	НИК	Ж	43	Z174	НХК	Ж	44	Z179	ЙДК	М	41

Продължение на Приложение 1. Списък на изследваните референтни лица

№	иници- али	пол	въз- раст	№	иници- али	пол	въз- раст	№	иници- али	пол	въз- раст
-	-	-	-	-	-	-	-	Z180	РТП	Ж	71

Приложение 2. Списък на изследваните лица с хронично бъбречно заболяване стадий V, на хемодиализа

№	иници- али	пол	въз- раст	№	иници- али	пол	въз- раст	№	иници- али	пол	въз- раст
D1	ТМХ	Ж	44	D4	ВАА	Ж	39	D7	ИАН	Ж	37
D2	ДИС	М	82	D5	ДЛА	М	82	D8	ИГИ	М	64
D3	ПКТ	М	58	D6	ИГШ	М	65	D9	МИВ	Ж	70
D10	ЕЛП	М	63	D16	ИТА	М	58	D13	ЛАМ	Ж	47
D11	АИО	Ж	54	D17	ИИШ	М	62	D21	ВКН	М	67
D12	ИБМ	Ж	23	D18	МДН	М	55	D22	СИР	Ж	52
D14	ЕХМ	М	61	D19	ПХБ	М	28	D23	ЛЙП	Ж	60
D15	БГС	Ж	53	D20	СНН	Ж	64	D24	ЙНЙ	М	62
D25	ЕТГ	Ж	76	D30	МСД	Ж	53	D35	ДРМ	М	64
D26	ИНМ	М	55	D31	ПМП	Ж	65	-	-	-	-
D27	ИДД	М	66	D32	ДБС	Ж	58	-	-	-	-
D28	ВЛЛ	М	80	D33	ВТД	Ж	74	-	-	-	-
D29	ДБП	М	73	D34	ДИЗ	Ж	78	-	-	-	-

Приложение 3. Списък на изследваните лица с хронично бъбречно заболяване, стадии II до IV, без диализа

№	иници- али	пол	въз- раст	№	иници- али	пол	въз- раст	№	иници- али	пол	въз- раст
СКD1	БДЛ	Ж	35	СКD17	ПИР	Ж	81	СКD33	СЛ	Ж	52
СКD2	АТС	М	73	СКD18	ВАГ	Ж	67	СКD34	РП	М	49
СКD3	СГС	М	62	СКD19	ПС	Ж	65	СКD35	АГЯ	М	64
СКD4	СЦП	Ж	48	СКD20	КСС	М	76	-	-	-	-
СКD5	РС	Ж	62	СКD21	ЕИ	М	67	-	-	-	-
СКD6	ЦИ	Ж	54	СКD22	МГ	Ж	63	-	-	-	-
СКD7	ПА	Ж	46	СКD23	ЛА	Ж	46	-	-	-	-
СКD8	РКИ	Ж	65	СКD24	РВ	М	66	-	-	-	-
СКD9	ДДГ	М	65	СКD25	ПМ	М	71	-	-	-	-
СКD10	ДР	М	61	СКD26	ЛП	М	55	-	-	-	-
СКD11	ГС	М	78	СКD27	ДА	М	65	-	-	-	-
СКD12	СТ	Ж	28	СКD28	ИТ	Ж	48	-	-	-	-
СКD13	АБС	Ж	73	СКD29	ТСГ	М	77	-	-	-	-
СКD14	ДИ	М	52	СКD30	ЖЯ	Ж	59	-	-	-	-
СКD15	ЛКП	М	88	СКD31	СИП	М	75	-	-	-	-
СКD16	БЛ	Ж	51	СКD32	АА	Ж	62	-	-	-	-

Приложение 5. Списък на изследваните лица с желязо-дефицитна анемия

№	иници- али	пол	въз- раст	№	иници- али	пол	въз- раст	№	иници- али	пол	въз- раст
IDA1	СКР	Ж	49	IDA4	БКК	М	21	IDA7	МЯ	Ж	42
IDA2	АИП	Ж	24	IDA5	ЕГС	Ж	63	IDA8	МЕМ	Ж	36
IDA3	СГП	М	19	IDA6	ФПВ	Ж	35	IDA9	ГСБ	Ж	43
IDA11	НСБ	Ж	45	IDA13	МК	Ж	33	IDA10	СМ	М	52
IDA12	МЕМ	Ж	36	IDA14	СКГ	Ж	46	IDA15	БКК	М	21

Приложение 6. Списък на изследваните лица с β -таласемия майор

№	иници- али	пол	въз- раст	№	иници- али	пол	въз- раст	№	иници- али	пол	въз- раст
СМР1	МН	Ж	40	СМР4	АЧ	М	29	СМР7	ЕУ	М	28
СМР2	СР	М	23	СМР5	ИИ	Ж	36	СМР8	РЕ	Ж	29
СМР3	ДС	М	35	СМР6	ВВ	М	27	СМР9	АВ	М	25
-	-	-	-	-	-	-	-	СМР10	СО	Ж	33