

Съвременна Медицина

Modern
medicine

LXI 1/2017



Съюз на българските медицински специалисти

1/2017

LXI



Съвременна медицина

Орган на Съюза на българските медицински специалисти

РЕДАКЦИОННА КОЛЕГИЯ

Главен редактор:

Проф. Б. Богов

E-mail: bbogob@gmail.com

Зам.-гл. редактор:

Проф. Зл. Коларов

E-mail: zkolarov@abv.bg

Научен секретар:

Доц. Р. Кръстева

E-mail: krasteva_r@yahoo.com

Членове:

Доц. К. Ангелов

Доц. М. Георгиев

Проф. О. Георгиев

Проф. А. Гудев

Проф. В. Димитрова

Проф. В. Златков

Проф. З. Каменов

Проф. Д. Костадинов

Проф. Г. Куртева

Проф. Ц. Кътова

Проф. М. Маринов

Проф. Л. Матева

Проф. В. Миланова

Проф. П. Минчев

Акад. проф. В. Митев

Проф. Л. Митева

Проф. Е. Наумова

Проф. Г. Начев

Проф. А. Николов

Проф. Е. Паскалев

Проф. П. Переновска

Проф. И. Петкова

Чл.-кор. проф. Н. Петров

Проф. Т. Попов

Доц. К. Рамшев

Проф. Р. Рашков

Проф. И. Салтиров

Проф. Д. Свиначков

Проф. Л. Спасов

Проф. Р. Стоилов

Проф. А. Темелков

Чл.-кор. проф. Л. Трайков

Проф. В. Хаджидеков

Доц. Е. Хаджиев

СЪДЪРЖАНИЕ

От редактора

Зл. Коларов 3

Оригинални статии

В. Манолов, Д. Йонова, Б. Богов, Ю. Петрова, В. Василев, Е. Възлов, И. Георгиева,
И. Трендафилов, В. Папазов, К. Цачев

Нива на цинк, хепсидин и глутатион пероксидаза при пациенти на хемодиализа 4

В. Манолов, Б. Богов, В. Василев, Д. Йонова, Е. Възлов, В. Паскалева-Пейчева,

Е. Хаджиев, С. Хаджидекова, М. П. Генова, К. Цачев

Изследване на серумен хепсидин при анемия на хронично заболяване 12

Ю. Петрова, В. Манолов, В. Паскалева-Пейчева, С. Хаджидекова, Б. Богов,

В. Василев, Л. Трайков, И. Богов, К. Цачев

Серумни нива на ревматоиден фактор при риск от дълбока венозна тромбоза 18

Ю. Петрова, В. Манолов, С. Хаджидекова, Д. Йонова, Б. Богов, В. Василев, К. Цачев,

Л. Трайков, И. Петрова, Г. Ангел, Е. Възлов, И. Георгиева, И. Трендафилов,

В. Папазов, Б. Маринов, И. Богов

Серумни нива на хепсидин, интерлевкин-6, селен и супероксид дисмутаза

при пациенти с хронично бъбречно заболяване и исхемичен инсулт 22

Б. Богов, Х. Богова

Комуникативни особености при общуването лекар-пациент 27

Клинични случаи

М. Христова, М. Любомирова, Е. Хаджиев, Б. Богов

Агресивно протичащ системен лупус еритематозус с прояви на микроангиопатия –

диференциалнодиагностични трудности 31

Обзори

Р. Шумналиева, Цв. Великова, Д. Качакова, Е. Иванова-Тодорова, К. Тумангелова-Юзеир,

Д. Кюркчиев, С. Монов

Имунологични биомаркери при ревматоиден артрит 39

Б. Русев, Б. Ц. Галунска

Какво не знаем за ролята на витамин D и андрогените в простатната канцерогенеза? 48

На Вашето внимание

Изисквания към авторите 59

In memoriam – Д-р Емил Андреев Таков 60

Адрес на редакцията:

СБМС, София, 1431, ПК-63, ул. "Св. Георги Софийски" № 1

Включено е в международния регистър на периодичните издания – ISSN 0562-7192

и в БД Българска медицинска литература при ЦМБ, МУ – София

EDITORIAL BOARD

Editor in chief:

Prof. B. Bogov

E-mail: bbogov@gmail.com

Deputy editor:

Prof. H. Kolarov

E-mail: zkolarov@abv.bg

Scientific secretary:

Assoc. prof. R. Krasteva

E-mail: krasteva_r@yahoo.com

Editorial staff:

Assoc. Prof. K. Angelov

Assoc. Prof. M. Georgiev

Prof. O. Georgiev

Prof. A. Gudev

Prof. V. Dimitrova

Prof. V. Zlatkov

Prof. Z. Kamenov

Prof. D. Kostadinov

Prof. D. Kurteva

Prof. Ts. Katova

Prof. M. Marinov

Prof. L. Mateva

Prof. V. Milanova

Prof. P. Minchev

Acad. Prof. V. Mitev

Prof. L. Miteva

Prof. E. Naumova

Prof. G. Nachev

Prof. A. Nikolov

Prof. E. Paskalev

Prof. P. Perenovska

Prof. I. Petkova

Corr. memb. prof. N. Petrov

Prof. T. Popov

Assoc. Prof. K. Ramshev

Prof. R. Rashkov

Prof. I. Saltirov

Prof. D. Svinarov

Prof. L. Spasov

Prof. R. Stoilov

Prof. A. Temelkov

Corr. memb. prof. L. Traykov

Prof. V. Hadjidekov

Assoc. Prof. E. Hadzhiev

Editorial

Zl. Kolarov 3

Original articlesV. Manolov, D. Yonova, B. Bogov, J. Petrova, V. Vasilev, E. Vazlov, I. Georgieva,
I. Trendafilov, V. Papazov, K. Tzatchev
Zinc, hepcidin and glutathione peroxidase levels in dialysis patients 4V. Manolov, B. Bogov, V. Vasilev, D. Yonova, E. Vazlov, V. Paskaleva-Peycheva,
E. Hadjiev, S. Hadjidekova, M. P. Genova, K. Tzatchev
Quantification of serum hepcidin in anemia in chronic diseases 12J. Petrova, V. Manolov, V. Paskaleva-Peycheva, S. Hadjidekova, B. Bogov, V. Vasilev,
L. Traykov, I. Bogov, K. Tzachev
Serum rheumatoid factor levels in risk of deep venous thrombosis 18J. Petrova, V. Manolov, S. Hadjidekova, D. Yonova, B. Bogov, V. Vasilev, K. Tzatchev,
L. Traykov, I. Petrova, G. Angov, E. Vazlov, I. Georgieva, I. Trendafilov, V. Papazov,
B. Marinov, I. Bogov
*Serum hepcidin, interleukin-6, selenium and superoxide dismutase in chronic kidney
disease patients with ischemic stroke* 22B. Bogov, H. Bogova
Communicative specifics of the physician-patient communication 27**Clinical case**M. Hristova, M. Lubomirova, E. Hadzhiev, B. Bogov
*Aggressive manifestation of systemic lupus erythematosus presented with microangiopathy –
differential diagnostic difficulties* 31**Surveys**R. Shumnalieva, Ts. Velikova, D. Kachakova, E. Ivanova-Todorova, K. Toumangelova-Yuzeir,
D. Kyurkchiev, S. Monov
Immunological biomarkers in rheumatoid arthritis 39B. Roussev, B. Ts. Galunska
What we don't know about the role of vitamin D and androgens in prostate carcinogenesis? 48**To your attention***Requirements to authors* 59*In memoriam* 59**Editorial address:**

UNION OF MEDICAL SPECIALISTS IN BULGARIA

1, Sv. G. Sofiysky, Sofia 1431 Bulgaria

СЪВРЕМЕННА МЕДИЦИНА 1/2017

Централна медицинска библиотека, МУ – София

Езикова редакция: И. Митева, В. Цъклева, Цв. Спасов (англ.)

Страниране: Д. Александрова

Печат: j-point plus



Проф. Златимир Коларов
зам. гл. редактор

Уважаеми колеги,

Бидейки лекари, всичко, което вършим в съзнателния си живот, пряко или косвено е посветено на Човека – от шестте години в Университета, през изнурителните дежурства и бдение над болните ежечасно, вземането на специалности, творенето на наука и защитата на докторати до обучението на ученици, които един ден да ни заместят, за да върви Животът нагоре и напред безспир. Често казвам на студентите, че „болен в семейството означава болест за цялото семейство, че лекувайки болния, ние помагаме и на неговите близки“. Това е нашата орисия – служба както на болните, така и на здравите с преглед, с лечение, със съвет, с подадена ръка. Приемането на тази орисия като мисия осмисля живота ни, изпълва го с усещане за стойност. Досега през тридесет и седем годишната ми лекарска практика, преди това шест години в Медицинска академия, още по преди – юношество и детство покрай моите родители-медици, т.е. – цял живот не съм срещал дори един лекар, който да съжалява за професионалния си избор. Уморени лекари – да, изнервени – да, разочаровани – да, но съжаляващи – никога. Това е силата, която държи лекаря изправен пред болестта, пред болния, пред неговите близки и изобщо в живота. Както всяка дейност е лишена от смисъл, ако не служи на Човека, и науката е безсмислена, ако не е в помощ на болния. Тя е стълбата, която ни отвежда от неизвестността до болния с неговите страдания, болки и погубени надежди, за да бъдем максимално пълноценни в облекчаването на болките и възвръщането на мечтите. Това е мисията и на сп. „Съвременна медицина“ – фундамент за наука и мост към практиката с крайна цел благоденствието на болните. Желая ви житейско и творческо дълголетие, скъпи колеги!

НИВА НА ЦИНК, ХЕПСИДИН И ГЛУТАТИОН ПЕРОКСИДАЗА ПРИ ПАЦИЕНТИ НА ХЕМОДИАЛИЗА

В. Манолов¹, Д. Йонова², Б. Богов³, Ю. Петрова⁴, В. Василев¹, Е. Възелов²,
И. Георгиева², И. Трендафилов², В. Папазов², К. Цачев¹

¹Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, МУ – София

²Клиничен център по диализа, МУ – София; Клиника по диализно лечение, УМБАЛ „Александровска“

³Клиника по нефрология, УМБАЛ „Александровска“

⁴Клиника по неврология, УМБАЛ „Александровска“

Резюме. Оксидативният стрес (ОС) при пациенти с хронични бъбречни заболявания (ХБЗ) се характеризира с комплекс от изменения в клетъчния метаболизъм, предизвикани от повишената продукция на свободни кислородни радикали. Няколко микроелемента – цинк (Zn), мед (Cu) и селен (Se), играят основна роля в антиоксидантната защитна система на организма като съставна част от антиоксидантните ензими – супероксид дисмутази (SOD), каталази (CAT) и глутатион пероксидази (GSH-Px). Проследихме серумните нива на хепсидин и цинк, както и активността на глутатион пероксидаза при 63 пациенти с ХБЗ на хронична хемодиализа в УМБАЛ „Александровска“, клиника по диализно лечение и нефрология. Получените резултати бяха сравнени със съответстваща по пол и възраст контролна група. Серумен хепсидин и активност на GSH-Px бяха определени с помощта на ELISA метод. Серумна концентрация на цинк, желязо и ТЖСК бяха изследвани с помощта на FAAS (Perkin-Elmer). На всички участници бяха определяни ПКК (на хематологичен анализатор ADVIA 2120, Siemens Healthcare) и биохимични показатели (на автоматичен анализатор Dimension RxL MAX, Siemens Healthcare). Използвахме Student's paired t-test и Pearson's correlation за статистическа обработка на получените резултати. Установихме статистически значимо по-високи серумни нива на хепсидин при пациенти с ХБЗ на хронична диализа ($363.8 \mu\text{g/L} \pm 45.1 \mu\text{g/L}$) спрямо контролната група ($21.1 \mu\text{g/L} \pm 2.9 \mu\text{g/L}$; $P < 0.001$). Серумните нива на цинк и активността на GSH-Px бяха понижени при пациентите с ХБЗ на хронична диализа ($10.1 \mu\text{mol/L} \pm 0.9 \text{ nmol/L}$; $7.8 \text{ pg/mL} \pm 0.4 \text{ pg/mL}$) спрямо контролната група ($16.7 \mu\text{mol/L} \pm 1.1 \mu\text{mol/L}$; $35.6 \text{ pg/mL} \pm 1.3 \text{ pg/mL}$; $P < 0.005$). При хроничните бъбречни заболявания съпътстващи патологични състояния са анемичен синдром и оксидативен стрес. При болните с ХБЗ на хронична диализа се установяват патологични нива на някои есенциални микроелементи – Zn, Se, Cu, както и на регулатора на хомеостазата на желязо, хепсидина, като между настъпилите изменения съществуват взаимни връзки и влияния.

Ключови думи: цинк, анемия, хепсидин, хемодиализа, оксидативен стрес

ZINC, HEPICIDIN AND GLUTATHIONE PEROXIDASE LEVELS IN DIALYSIS PATIENTS

V. Manolov¹, D. Yonova², B. Bogov³, J. Petrova⁴, V. Vasilev¹, E. Vazelov², I. Georgieva²,
I. Trendafilov², V. Papazov², K. Tzatchev¹

¹Department of Clinical Laboratory and Clinical Immunology, MU – Sofia

²Clinical Center of Dialysis, MU – Sofia; Clinic of Dialysis, University Hospital „Aleksandrovskia“

³Clinic of Nephrology, University Hospital „Aleksandrovskia“

⁴Clinic of Neurology, University Hospital „Aleksandrovskia“

Abstract. Oxidative stress (OS) in patients with chronic kidney disease (CKD) is characterized by complex changes in cellular metabolism, caused by production of free oxygen radicals. Few trace elements, such as zinc (Zn), copper (Cu) and selenium (Se) play a major role in the antioxidant organism defense system as part of antioxidant enzymes – superoxide dismutase (SOD), catalases (CAT) and glutathione peroxidases (GSH-Px). We evaluated serum hepcidin and zinc concentrations and glutathione peroxidase activity in 63 CKD patients

on chronic dialysis in University Hospital "Aleksandrovska" Clinics of Dialysis Treatment and Nephrology. The results were compared with a matched by sex and age control group. Serum hepcidin and GSH-Px activity were determined by ELISA method. Serum zinc, iron and RIBC concentration were established by FAAS (Perkin-Elmer). All participants had determined CBC (using hematology analyzer ADVIA 2120, Siemens Healthcare) and biochemical parameters (on automatic analyzer Dimension RxL MAX, Siemens Healthcare). We used Student's paired t-test and Pearson's correlation for statistical analysis of the results. We found a statistically significant higher serum hepcidin levels in CKD patients, on chronic dialysis ($363.8 \mu\text{g/L} \pm 45.1 \mu\text{g/L}$) compared to the control group ($21.1 \mu\text{g/L} \pm 2.9 \mu\text{g/L}$; $P < 0.001$). Serum zinc levels and GSH-Px activity were decreased in patients with CKD, on chronic dialysis ($10.1 \mu\text{mol/L} \pm 0.9 \mu\text{mol/L}$; $7.8 \text{ pg/mL} \pm 0.4 \text{ pg/mL}$) compared to the control group ($16.7 \mu\text{mol/L} \pm 1.1 \mu\text{mol/L}$; $35.6 \text{ pg/mL} \pm 1.3 \text{ pg/mL}$; $P < 0.005$). In chronic kidney diseases concomitant pathologies are anemic syndrome and oxidative stress. In CKD patients, some essential elements are with abnormal levels – Zn, Se, Cu, combined with iron homeostasis regulatory peptide, hepcidin, and these conditions are tight connected.

Key words: zinc, anemia, hepcidin, hemodialysis, oxidative stress

ВЪВЕДЕНИЕ

Многобройни проучвания показват, че микроелементите селен (Se), мед (Cu) и цинк (Zn) играят основна роля в антиоксидантната защитна система. Те изпълняват антиоксидативни функции чрез протеините, в които са включени (1). Se е компонент на около 25 ензима, включително и на глутатион пероксидаза (GPx) семейството, тиоредоксин редуктазите и селенопротеин Р, който осигурява антиоксидантна активност срещу предизвиканото от ОР отключване и развитие на канцерогенеза, както и някои други ензими (2). Два други елемента, Zn и Cu са включени в супероксид дисмутаза (SOD). Cu е също и компонент на няколко други ензима, като церулоплазмин и цитохром оксидаза (3). Дефицитът на Cu води до повишена продукция на свободни радикали и може да подпомогне липидната пероксидация (4). Zn е свързан с много протеини, от които няколкостотин са ензими (5). Всичките тези ензими участват в метаболизма на нуклеинови киселини, протеини, въглехидрати и други.

Хепсидинът е ключов регулаторен протеин, който контролира чревната абсорбция на желязо и разпределението му в организма (6). Той е пептиден хормон, който се синтезира в черния дроб в отговор на редица сигнали, включително и нивата на желязо в организма. Хепсидинът функционира чрез свързва-

не и инициализиране деградация на молекулата на феропортина, единствения известен експортер на желязо. Феропортинът е разположен трансмембранно в дуоденалните ентероцити, макрофаги и хепатоцити. Той регулира трансфера на клетъчното желязо в плазмата от тези клетки (7).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проследихме серумните нива на хепсидин и цинк, както и активността на глутатион пероксидаза при 63 пациенти с ХБЗ, на хронична хемодиализа в УМБАЛ "Александровска", клиники по диализно лечение и нефрология. Получените резултати бяха сравнени със съответстваща по пол и възраст контролна група. Серумен хепсидин и активност на GSH-Px бяха определени с помощта на ELISA метод. Серумна концентрация на цинк, желязо и ТЖСК бяха изследвани с помощта на FAAS (Perkin-Elmer). На всички участници бяха определяни ПКК (на хематологичен анализатор ADVIA 2120, Siemens Healthcare) и биохимични показатели (на автоматичен анализатор Dimension RxL MAX, Siemens Healthcare). Разтворимите трансферинови рецептори са определени с помощта на нефелометър BN ProSpec (Siemens Healthcare). Използвахме Student's paired t-test и Pearson's correlation за статистическа обработка на получените резултати.

Формулярът за събиране на данни за пациент с патологично състояние в обмяната на желязо е изработен от В. Манолов, М. Велизарова и В. Василев, въз основа на препоръките на Скандинавския комитет по референтни стойности (Alström Т и сътр., 2009) и собствени съображения. Пациентите с ХБЗ, включени в проучването, подписаха информирано съгласие, съгласно Декларацията от Хелзинки (Директива 2001/20/ЕО).

РЕЗУЛТАТИ

В таблица 1 са показани демографските показатели на включените пациенти с ХБЗ.

Таблица 1. Разпределение на изследваните болни с ХБЗ на диализа и нарушения в обмяната на желязото по пол и възраст

Възраст	Пациенти с ХБЗ на диализа	
	Мъже	Жени
Брой	31	32
Минимална възраст (в год.)	34.4	38.1
Максимална възраст (в год.)	51.7	54.1
Средна възраст (в год.)	47.9	43.1

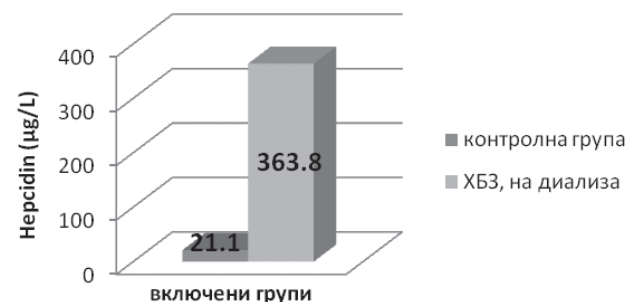
Установихме статистически значимо по-високи серумни нива на хепсидин при пациенти с ХБЗ на хронична диализа ($363.8 \mu\text{g/L} \pm 45.1 \mu\text{g/L}$) спрямо контролната група ($21.1 \mu\text{g/L} \pm 2.9 \mu\text{g/L}$; $P < 0.001$).

Таблица 2 представя сравнителна оценка на серумната концентрация на хепсидин при здрави лица и пациенти с ХБЗ на диализа.

Таблица 2. Сравнителна оценка на серумната концентрация на хепсидин при здрави доброволци и пациенти с ХБЗ на диализа

Група	Здрави	ХБЗ
n	63	63
$\bar{X}$	$21.1 \mu\text{g/L}$	$363.8 \mu\text{g/L}$
min	$5.6 \mu\text{g/L}$	$125.1 \mu\text{g/L}$
max	$24.9 \mu\text{g/L}$	$422.4 \mu\text{g/L}$

Серумното ниво на хепсидин е статистически значимо повишено при пациенти с ХБЗ на диализа; $P < 0.001$ (фиг. 1).



Фиг. 1. Схематично представяне на средните серумни хепсидинови концентрации при здрави доброволци и пациенти с ХБЗ на диализа

Серумните нива на цинк и активността на GSH-Px бяха понижени при пациентите с ХБЗ на хронична диализа ($10.1 \mu\text{mol/L} \pm 0.9 \mu\text{mol/L}$; $7.8 \text{ pg/mL} \pm 0.4 \text{ pg/mL}$) спрямо контролната група ($16.7 \mu\text{mol/L} \pm 1.1 \mu\text{mol/L}$; $35.6 \text{ pg/mL} \pm 1.3 \text{ pg/mL}$; $P < 0.005$).

Таблица 3 представя сравнителна оценка на концентрацията на цинк (Zn) при здрави лица и пациенти с ХБЗ.

Таблица 3. Сравнителна оценка на концентрацията на цинк (Zn) при здрави доброволци и пациенти с ХБЗ на диализа

Група	Здрави	ХБЗ
n	63	63
$\bar{X}$	$16.7 \mu\text{mol/L}$	$10.1 \mu\text{mol/L}$
min	$14.4 \mu\text{mol/L}$	$7.7 \mu\text{mol/L}$
max	$23.1 \mu\text{mol/L}$	$18.0 \mu\text{mol/L}$

Нивото на селен е статистически значимо понижено при пациенти с ХБЗ на диализа, $P < 0.005$ (фиг. 2).

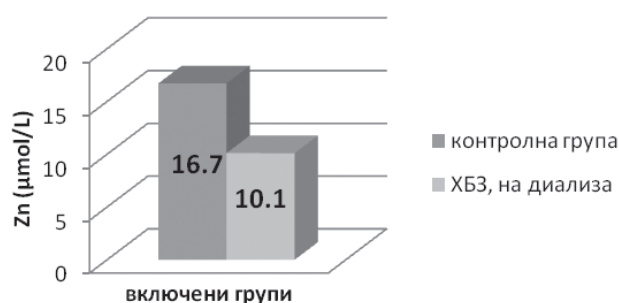
Таблица 4 представя сравнителна оценка на концентрацията на глутатион пероксидаза (GSH-Px) при здрави лица и пациенти с ХБЗ.

Нивото на глутатион пероксидаза е статистически значимо понижено при пациенти с ХБЗ на диализа, $P < 0.001$ (фиг. 3).

В табл. 5 са представени резултатите от определените хематологични показатели при изследване на здрави доброволци и пациенти с ХБЗ на диализа.

В табл. 6 са представени резултатите от определените биохимични и имунологични показатели, определящи метаболизма на желязо при изследване на здрави доброволци и пациенти с ХБЗ на диализа.

В таблица 7 са представени резултати от други биохимични и имунологични показатели, определени при здрави доброволци и пациенти с ХБЗ на диализа.



Фиг. 2. Схематично представяне на средните Zn концентрации при здрави доброволци и пациенти с ХБЗ на диализа

Таблица 4. Сравнителна оценка на концентрацията на глутатион пероксидаза (GSH-Px) при здрави доброволци и пациенти с ХБЗ на диализа

Група	Здрави	ХБЗ
n	63	63
$\bar{X}$	35.6 pg/mL	7.8 pg/mL
min	21.8 pg/mL	4.6 pg/mL
max	42.6 pg/mL	10.9 pg/mL



Фиг. 3. Схематично представяне на средните GSH-Px концентрации при здрави доброволци и пациенти с ХБЗ на диализа

Таблица 5. Средни стойности и стандартно отклонение на определените хематологични показатели при контролна група и пациенти с ХБЗ на диализа

Група		Здрави	ХБЗ
показател	статистика		
RBC ($\times 10^{12}/l$)	$\bar{X} \pm SD$	4.88 ± 0.5	3.34 ± 0.5
Hgb (g/l)	$\bar{X} \pm SD$	143.4 ± 10.4	100.9 ± 12.6
Hct (l/l)	$\bar{X} \pm SD$	0.429 ± 0.04	0.313 ± 0.04
Retic (%)	$\bar{X} \pm SD$	1.54 ± 0.5	1.37 ± 0.5
CHr (pg)	$\bar{X} \pm SD$	32.6 ± 2.4	35.9 ± 3.1

Таблица 6. Средни стойности и стандартно отклонение на определените биохимични и имунологични показатели, свързани с обмяната на желязо при контролна група и пациенти с ХБЗ

Група		Здрави	ХБЗ
показател	статистика		
Fe ($\mu\text{mol/l}$)	$\bar{X} \pm SD$	18.98 ± 7.1	12.2 ± 5.96
ТЖСК ($\mu\text{mol/l}$)	$\bar{X} \pm SD$	64.0 ± 8.2	45.0 ± 6.5
TRSF (g/l)	$\bar{X} \pm SD$	2.91 ± 0.5	1.87 ± 0.4
solTRfR (mg/l)	$\bar{X} \pm SD$	2.05 ± 0.9	2.11 ± 0.3
Феритин (ng/ml)	$\bar{X} \pm SD$	191.6 ± 24.4	536.3 ± 96.1
TSAT (%)	$\bar{X} \pm SD$	26.2 ± 4.9	27.3 ± 14.1

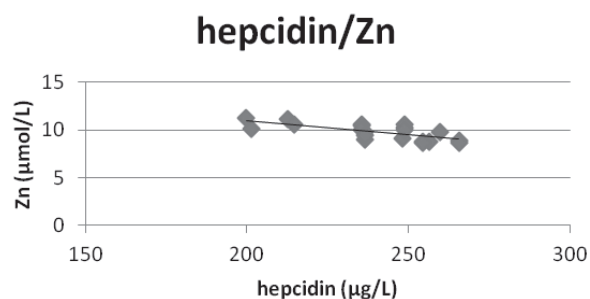
Таблица 7. Средни стойности и стандартно отклонение на други биохимични и имунологични показатели при контролна група и пациенти с ХБЗ на диализа

Група		Здрави	ХБЗ
показател	статистика		
ASAT (U/l)	$\bar{X} \pm SD$	3.1 ± 0.5	48.9 ± 9.9
ALAT (U/l)	$\bar{X} \pm SD$	20.1 ± 3.2	257.8 ± 31.7
CRP (mg/l)	$\bar{X} \pm SD$	1.12 ± 0.2	11.6 ± 7.2
Creatinine ($\mu\text{mol/l}$)	$\bar{X} \pm SD$	61.1 ± 1.9	716.03 ± 182.2
eGFR (ml/min)*	$\bar{X} \pm SD$	104.1 ± 12.4	6.46 ± 3.7
Glucose (mmol/L)	$\bar{X} \pm SD$	4.81 ± 0.6	5.12 ± 0.5

* – според CKD-EPI creatinine equation (2009)

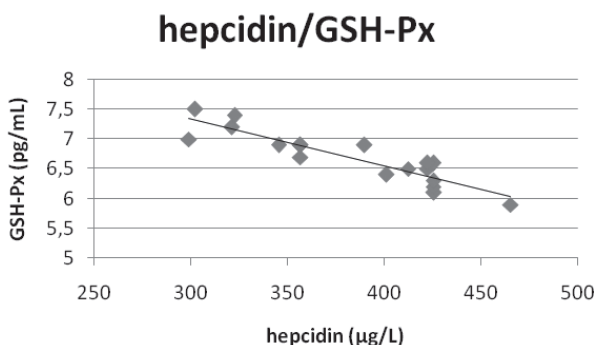
Определяне на корелационни зависимости между хепсидин и различни клиничкохимични показатели при пациенти с ХБЗ на диализа.

1) Корелация между серумен хепсидин и цинк – ниво на корелация $r = -0.679$; степен на значимост $P < 0.005$ (фиг. 4).



Фиг. 4. Корелация между серумните нива на хепсидин и селен при ХБЗ, пациенти на диализа

2) Корелация между серумен хепсидин и глутатион пероксидаза – ниво на корелация $r = -0.811$; степен на значимост $P < 0.005$ (фиг. 5).



Фиг. 5. Корелация между серумните нива на хепсидин и глутатион пероксидаза при ХБЗ пациенти на диализа

ОБСЪЖДАНЕ

ХБЗ се характеризират с комплекс от изменения в клетъчния метаболизъм, водещи до ОС, т.е. повишена продукция на оксидативни радикали (ОР), които могат да играят ключова роля за редица клинични усложнения при тази патология.

При пациенти на диализа активността на ензима глутатион пероксидаза (GPx) е подобна на тази при терминален стадий на ХБЗ (8). При пациенти с ХБЗ плазмената GPx, изглежда, е много по-важна от еритроцитния ензим. Следователно си заслужава да се съсредоточим основно върху плазмения GPx при пациенти с ХБЗ. Проучвания на този ензим показват, че въпреки че синтезът му е в различни тъкани, епителните клетки на проксималните тубули в бъбрека са основният източник, от който той се секретира в плазмата (9). Много доклади сочат, че пациенти с ХБЗ имат по-ниска плазмена GPx активност (10), включително тези на хемодиализа (11). Прогресивното понижение на активността на този ензим е свързано с факта, че GPx3 основно се синтезира в бъбрека и прогресивното увреждане на този орган рефлектира в понижена активност на ензима. Ниската GPx3 активност, открита при терминален стадий на ХБЗ, може да зависи от синтеза му в остатъчните, неувредени клетки на бъбрека и в другите тъкани/органи, които синтезират малки количества от този ензим. Доказано е, че при хора тази пероксидаза също се синтезира и

в черен дроб, сърце, бял дроб и гърди, но в значително по-малки количества (12).

Цинкът е есенциален микроелемент за функционирането на над 300 каталитично активни цинкови металопротеини и на повече от 2000 цинк-зависими транскрипционни фактори (13). Той участва във всички основни биохимични процеси в организма. Установен е във всички тъкани и във всички телесни течности (13). Цинкът се съдържа предимно в мускулите, костите, кожата и косата, черния дроб, стомашно-чревния тракт, панкреаса и бъбреците. Като основни депа на цинк в човешкия организъм се считат черният дроб и бъбреците. Цинкът е представен също и в плазма, еритроцити и левкоцити. В плазмата се определя главно свързан с албумин (60-80%) и в по-малка степен – с 2-макроглобулин, трансферин и свободни аминокиселини (13). Zn участва в структурата на много НАД и НАДФ-зависими дехидрогенази, в карбоанхидрази, протеолитични карбоксипептидази, алкалната фосфатаза (14). На клетъчно ниво ролята на Zn се разглежда в три аспекта: 1. каталитична (функционална) – функционален компонент в каталитичния център (активно място) на цинк-съдържащите металоензими; 2. структурна – участие в протеиновата структура; и 3. регулаторна – регулация на генната експресия на различни протеини, участие в транскрипцията, клетъчното сигнализиране, секрецията на хормони и апоптозата (13). Zn е специфичен компонент на ДНК-свързващи домени на транскрипционни фактори. Наличието на микроелемента в тези нуклеопротеини е абсолютно необходимо за специфичното свързване с ДНК и генната експресия (15). Като кофактор и структурен компонент на ДНК и РНК полимерази и тимидинкиназата Zn участва в процесите на клетъчното делене. Той се счита за незаменим микроелемент за растежа на организма и тъканното възстановяване (16).

Като малък пептид, който не изглежда да е свързан в голяма степен с плазмените

протеини, хепсидинът се елиминира от плазмата чрез бъбреците чрез феропортин-медиран ендцитоза и протеолиза. Съответно, концентрации на плазмените нива на хепсидина могат да се увеличават при болестни процеси, които намаляват клирънса на хепсидина от бъбреците (17). Високите нива на желязо в циркулацията стимулират синтеза на хепсидин в черния дроб. Повишеният хепсидин намалява чревната абсорбция на желязо и блокира износа му от тъканните депа – така се избягва свръхнатрупване на желязо в организма. От друга страна, понижените нива на желязо потискат синтеза на хепсидин, а това стимулира усвояването на желязото през дуоденалните ентероцити и освобождаването му от тъканните депа. Възпалителните цитокини са мощни стимулатори на синтеза на хепсидин, които играят основна патогенна роля във функционалния недостиг на желязо при анемия на хроничните заболявания (АХЗ). АХЗ е добре позната клинична единица, която често се наблюдава при пациенти с различни заболявания: анемия от инфекция, анемия при злокачествено заболяване, анемия при ревматоиден артрит и анемия при хронично бъбречно заболяване. Хематологичните характеристики на АХЗ се различават от типичната желязо-дефицитна анемия (ЖДА) без възпаление. Важно е да се отбележи, че ключова характеристика на АХЗ е натрупването на желязо в клетките на ретикуло-макрофагеалната система въпреки намалените серумни нива на желязо. По този начин не съществува необходимото ниво на циркулиращо желязо за синтез на хемоглобин, дори и при адекватни или високи нива на желязо в депата на организма. Вероятно това е защитен механизъм за изолиране на желязо като превенция срещу определени патогенни нашествия, много от които изискват желязо за своето развитие (18). Въпреки това отклоняването на желязо от кръвообращението в макрофагите ефективно причинява

функционален недостиг на желязо и ограничение на еритропоезата, което в крайна сметка, ако не бъде коригирано, води до анемия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Измерването на хепсидин при ХБЗ, при пациенти на диализа, е необходимо, за да се определи доколко прилагането на еритропоетин или еритропоетин-стимулиращи препарати е ефективно по отношение на неефективната еритропоеза.

Количественото определяне на GSH-Px и цинк при ХБЗ, пациенти на диализа, е необходимо за установяване наличието и тежестта на съпровождащия оксидативен стрес, допълнително влошаващ състоянието на пациентите. Нивата на хепсидин определят преразпределянето на желязото между макрофагите и паренхимните клетки и следователно могат да имат значение за степента и скоростта на прогресия на органните увреждания. Концентрацията на хепсидин е важна за индивидуа-

лизиране на ЕПО лечението. Хепсидиновите нива определят ефективността на ЕПО лечението. Определянето на SOD, селен, при ХБЗ пациенти на диализа насочва към подходи за компенсиране на увредената антиоксидантна защита на организма.

Анемичният синдром и оксидативният стрес са безспорни патологични състояния, съпътстващи хроничните бъбречни заболявания, особено в терминалните им фази и пациентите на диализно лечение. При значителна част от болните на диализа се установяват абнормни нива на някои важни микроелементи – Zn, Se, Cu, както и на магнезий и един наскоро открит регулатор на желязния метаболизъм – хепсидин, и между всички изброени състояния са намерени или подозирани взаимни връзки и влияния. Това дава основание за реализиране на предложения от нас проект за изясняване на неизяснените до момента съотношения между нарушените баланси и възможността за терапевтично-

Библиография

1. El-Bayoumy K. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutat. Res.* 2001;475:123-129.
2. Zachara BA, Gromadzinska J, Wasowicz W et Zbrog Z. Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: A review *Acta Biochim Polon* 2006;53:663-677.
3. L'Abbe MR et Friel JK Copper status of very low birth weight infants during the first 12 months of infancy. *Pediatr. Res.* 1992;32:183-188.
4. Lai C -C, Huang WH, Klevay LM, et al. Antioxidant enzyme gene transcription in copper-deficient rat liver. *Free Radic. Biol. Med.* 1996;21:233-240.
5. Valee BL. Thionein/metallothionein - a metabolic link. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 2001;14:368-369.
6. Ganz T. Hepsidin and iron regulation, 10 years later. *Blood* 2011;117:4425-4433.
7. Ramey G, Deschemin JC, Durel B, et al. Hepsidin targets ferroportin for degradation in hepatocytes. *Haematologica* 2010;95:501-4.
8. Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, et al. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Rad. Biol. Med.* 1996;21:845-853.
9. Whittin JC, Tham DM, Bhamre S, et al. Plasma glutathione peroxidase and its relationship to renal proximal tubule function. *Mol. Genet. Metab.* 1998;65:238-245.
10. Zachara BA, Salak A, Kotarska D, et al. Selenium and glutathione peroxidases in blood of patients with different stages of chronic renal failure. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2004;17:291-299.
11. Zachara BA., Adamowicz A, Trafikowska U, et al. Selenium and glutathione levels, and glutathione peroxidase activities in blood components of uremic patients on hemodialysis supplemented with selenium and treated with erythropoietin. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2001;15:201-208.
12. Chu FF, Esworthy R S, Doroshov J H, et al. Expression of plasma glutathione peroxidase in human liver in addition to kidney, heart, lung, and breast in humans and rodents. *Blood.* 1992;79:3233-2238.
13. Zaritsky J, Young B, Wang HJ, et al. Hepsidin – a potential novel biomarker for iron status in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009; 4:1051-1056.

14. 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.

Благодарности

Настоящият проект е осъществен с финансовата подкрепа на Медицински университет – София, „Стимулиране на научни изследвания в области с постигнати високи научни постижения“, Договор № 1 – С/2016 г. Авторският екип благодари и на фирма „Марвена Диагностика“ ООД (представител на Siemens Healthcare Diagnostics за Р България), особено на г-жа Силвия Кирова и г-н Велизар Драгоев.

Адрес за кореспонденция:

Д-р В. Манолов, дм
Катедра по клинична лаборатория и клинична
имунология, МУ
ул. „Св. Г. Софийски“ № 1
1431 София
тел. +359 2 9230 928
e-mail: victhedoc2@yahoo.com

Address for correspondence:

V. Manolov, MD PhD
Department of Clinical Laboratory and Clinical
Immunology, MU
1 “Sv. Georgi Sofiyski” St.
Bg – 1431 Sofia
Phone +359 2 9230 928
e-mail: victhedoc2@yahoo.com

ИЗСЛЕДВАНЕ НА СЕРУМЕН ХЕПСИДИН ПРИ АНЕМИЯ НА ХРОНИЧНО ЗАБОЛЯВАНЕ

В. Манолов¹, Б. Богов², В. Василев³, Д. Йонова⁴, Е. Възелов⁴, В. Паскалева-Пейчева⁵,
Е. Хаджиев⁶, С. Хаджидекова⁷, М. П. Генова¹, К. Цачев¹

¹Клинична лаборатория и клинична фармакология, УМБАЛ „Александровска”

²Клиника по нефрология, УМБАЛ „Александровска”

³Клинична лаборатория и клинична фармакология, УМБАЛ „Александровска”

⁴Клиника по диализа, УМБАЛ „Александровска”

⁵Клиника по ревматология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски”

⁶Клиника по клинична хематология, УМБАЛ „Александровска”

⁷Катедра по медицинска генетика
Медицински университет – София

Резюме. Хепсидинът е ключов регулатор на системната хомеостаза на желязото. Патогенезата на анемията на хронично заболяване (АХЗ) се свързва със стимулиран хепсидинов синтез поради възпалението. Високите хепсидинов нива са причина за намалена чревна абсорбция на желязото и затруднено освобождаване от макрофагите, които водят до последваща хипоферемия и потисната еритропоеза. **Целта на проучването** е да се изследва серумният хепсидин при пациенти с АХЗ: хронично бъбречно заболяване (ХБЗ, без диализа и на диализа) и при ревматоиден артрит (РА). **Модел на проучването:** за периода 2012-2014 г. е изследван серумен хепсидин с верифициран ELISA метод при 40 здрави доброволци, 30 пациенти с ХБЗ стадий II-V без диализа, 20 пациенти с ХБЗ стадий V на диализа и 30 пациенти с РА. Установено е статистически значимо повишение на серумния хепсидин ($0.3 < r < 0.7$; $P < 0.001$) за всички клинични групи с АХЗ – ХБЗ (стадии II-V, без диализа) $81.52 \pm 10.7 \mu\text{g/L}$; ХБЗ (стадий V, на диализа) $219.14 \pm 30.6 \mu\text{g/L}$ и РА $103.83 \pm 18.4 \mu\text{g/L}$ спрямо контролната група $13.67 \pm 4.9 \mu\text{g/L}$. Най-подчертано е повишението на серумния хепсидин при пациенти с ХБЗ на диализа ($P < 0.001$). Не е наблюдавана значима разлика в серумния хепсидин при изследване на пациенти с ХБЗ без диализа и с РА ($P > 0.05$). Надеждното изследване на серумния хепсидин има важно значение за правилния терапевтичен подход при пациенти с АХЗ. Степента на повишение може да диференцира пациентите с функционален дефицит на желязо от тези с ретикулоендотелна блокада. Мониторирането на серумните концентрации на хепсидин при парентерална терапия с желязни препарати намалява риска от токсично свръхнатрупване на желязо в организма. Хепсидинът е потенциален индикатор за дефицит на желязо при пациенти с РА с анемия и активен възпалителен процес.

Ключови думи: анемия, ревматоиден артрит, хронично бъбречно заболяване, диализа, хепсидин, хронично възпаление

QUANTIFICATION OF SERUM HEPcidIN IN ANEMIA IN CHRONIC DISEASES

V. Manolov¹, B. Bogov², V. Vasilev³, D. Yonova⁴, E. Vazelov⁴, V. Paskaleva-Peycheva⁵,
E. Hadjiev⁶, S. Hadjidekova⁷, M. P. Genova¹, K. Tzatchev¹

¹Department of Clinical Laboratory and Clinical Immunology

²Clinic of Nephrology, University Hospital “Aleksandrovska”

³Clinical Laboratory and Clinical Pharmacology, University Hospital “Aleksandrovska”

⁴Clinic of Dialysis Treatment, University Hospital “Aleksandrovska”

⁵Clinic of Rheumatology, University Hospital “Sv. I. Rilski”

⁶Clinic of Hematology, University Hospital “Aleksandrovska”

⁷Department of Medical Genetics
Medical University, Sofia

Abstract. Hcpidin is a key regulatory peptide of iron homeostasis. Pathogenesis of anemia in chronic diseases (ACD) is connected to stimulated hcpidin synthesis caused by inflammation. Increased hcpidin

concentrations suppress iron absorption and macrophages release, which leads to hypoferremia and insufficient erythropoiesis. **The aim** of our study is to evaluate hepcidin levels in patients with ACD: chronic kidney disease (CKD, without and on dialysis) and patients with rheumatoid arthritis (RA). **Study design:** for a period 2012 – 2014 years we quantified serum hepcidin concentration by verified ELISA method in 40 healthy volunteers, in 30 CKD patients stages II-V without dialysis, 20 patients with CKD, stage V, on dialysis, and 30 RA patients. We found statistically increased serum hepcidin levels ($0.3 < r < 0.7$; $P < 0.001$) in all ACD groups – CKD (stages II-V, without dialysis) $81.52 \pm 10.7 \mu\text{g/L}$; CKD (stage V, on dialysis) $219.14 \pm 30.6 \mu\text{g/L}$ and RA patients $103.83 \pm 18.4 \mu\text{g/L}$, compared to control group $13.67 \pm 4.9 \mu\text{g/L}$. Most elevated hepcidin was found in CKD cases, stage V, on dialysis; $P < 0.001$. There were no statistically significant differences between hepcidin quantification in CKD patients, stages II-V, without dialysis and RA cases; $P > 0.05$. Measurement of hepcidin is important for correct therapeutic approach in ACD patients. Increased hepcidin might differentiate functional iron deficiency from reticulo-endothelial blockade. Monitoring of serum hepcidin concentrations in parenteral iron supplementation decreases risk of toxic iron overload. Hepcidin plays role as indicator for iron deficiency in patients with anemia during RA and acute inflammation.

Key words: anemia, rheumatoid arthritis, chronic kidney disease, dialysis, hepcidin, chronic inflammation

УВОД

Поддържането на баланса на желязото в човешкия организъм е критично за състоянието на здраве. Идентифицирането на хепсидина като ключов регулатор на желязото драматично подобрява познаването на молекулярните механизми за контрол на хомеостазата и позволява по-детайлно разбиране на патофизиологията при клиничните нарушения. Съвременни проучвания очертават ролята на хепсидина като полезно диагностично средство и терапевтичен прицел при различни заболявания с нарушена обмяна на елемента. Хепсидинът регулира системната хомеостазата на желязото – абсорбция в дуоденума, рециклиране от разрушаваните еритроцити, контролирано освобождаване от депата в хепатоцитите. Той е пептид, който се синтезира в черния дроб в отговор на редица сигнали в зависимост от нуждите на организма от желязо. Биологичното действие на хепсидина се медира от свързването му с рецептора феропортин, който е и единственият известен експортер на желязо, представен в дуоденума, макрофагите, хепатоцитите, плацентата. Хепсидинът се свързва с рецептора в общ комплекс, който се интернализира и се отключва лизозомно разграждане на феропортиновата структура (1-4).

Анемията на хроничното заболяване (АХЗ), известна също като анемия на възпаление,

е най-разпространената при хоспитализирани пациенти в целия свят. Наблюдава се при остри или хронични възпалителни заболявания: инфекции, рак, ревматоиден артрит, хронични бъбречни заболявания, органна недостатъчност, травма (1). Анемията обикновено е слабо или умерено изразена, често без ясни промени в морфологичните характеристики на еритроцитите. Патогенезата се свързва с индуциран хепсидинов синтез поради стимулиращото действие на инфламаторни цитокини, от които най-важен е интерлевкин-6 (IL-6). Високите хепсидинови нива са причина за намалена чревна абсорбция на желязото и затруднено освобождаване от макрофагите, които водят до последваща хипоферемия и потисната еритропоеза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Модел на проучването

Клиничното проучване е проведено през периода 2012-2014 г. Изследваните пациенти са разделени в следните групи:

- **Група 1 (Контролна група):** 40 здрави доброволци без лабораторни данни за нарушена обмяна на желязото.
- **Група 2 (ХБЗ без диализа):** 30 пациенти с ХБЗ стадий II-V без диализа (хоспитализирани в IV нефрологична клиника, УМБАЛ „Александровска“)

- **Група 3 (ХБЗ с диализа):** 20 с ХБЗ – V стадий на диализа (Клиника по диализа и Диализен център, УМБАЛ „Александровска“). Стадирането на ХБЗ е извършено на базата на eGFR според препоръките на CKD-EPI Creatinine Equation (2009).
- **Група 4 (РА):** 30 пациенти с РА, диагностицирани в Клиниката по ревматология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“. Активността на РА е определена чрез Disease Activity Score – калкулатор за РА.

Всички включени лица са подписали информирано съгласие съобразно Декларацията от Хелзинки (Директива 2001/20/ЕО).

2. Методи

2.1. Верифициране на ELISA метод за количествено определяне на серумен хепсидин
Серумните концентрации на хепсидин са определени чрез сандвичев ензимен имунохимичен метод ELISA с рекомбинантен хепсидин като калибратор и поликлонално антитяло (USCN, Life Science Inc).

Количественото изследване на серумния хепсидин в настоящото проучване е направено чрез верифициран ELISA метод с характеризирана аналитична надеждност. Получена

аналитична граница на откриване (LoD), установена като средна стойност + 3 SD на десетократно определен нулев стандарт – 0.022 µg/L. Обхват на измерване – 0.0625 µg/L-8 µg/L. При оценка на възпроизводимостта са определени ниско и високо ниво на количествено определяне (LLOQ, ULOQ) (6).

2.2. Биохимични и хематологични методи
Статусът на желязо на индивидите от отделните групи е определен чрез изследване на биохимични (автоматичен биохимичен анализатор Cobas Integra 400 и автоматичен имунологичен анализатор Elecsys 2010, Roche Diagnostics) и хематологични параметри (автоматичен хематологичен анализатор Advia 2120, Siemens Healthcare Diagnostics).

2.3. Статистически методи
Статистическата оценка на данните е направена чрез Student t-тест (unpaired, two-tailed) със статистически значими разлики при $P < 0.05$ и Pearson correlation.

РЕЗУЛТАТИ

Разпределението по възраст в отделните групи е показано в табл. 1.

Получените лабораторни показатели за оценка на желязен статус са отразени в табл. 2.

Таблица 1. Възрастово разпределение на изследваните групи лица

Група	Контролна	ХБЗ (стадии II-V, без диализа)	ХБЗ (стадий V, на диализа)	РА
Брой включени индивиди	40	30	20	30
Средна възраст (години)	33.1	51.1	54.5	49.7
SD	5.6	7.9	10.1	9.4

Таблица 2. Лабораторни показатели за обмяната на желязо при отделните групи изследвани лица: контролна група, ХБЗ без диализа, ХБЗ с диализа и РА

Показател*	Контролна	ХБЗ (стадий II-V, без диализа)	ХБЗ (стадий V, на диализа)	РА
Hgb (g/L)	142.7 ± 13.3	118.2 ± 11.7	100.9 ± 8.1	115.5 ± 2.6
Серумно желязо (µmol/L)	18.85 ± 7.59	13.8 ± 4.1	12.2 ± 3.8	11.0 ± 2.3
sTfr(i) (mg/ng)	0.06 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.008 ± 0.012	0.03 ± 0.01
TSAT (%)	29.8 ± 12.1	23.6 ± 13.1	27.5 ± 12.5	16.8 ± 10.3

Hgb – хемоглобин; sTfr(i) – индекс на разтворими трансферинови рецептори; TSAT% – процентно трансфериново насищане; ХБЗ – хронично бъбречно заболяване; РА – ревматоиден артрит

*Данните са изразени като средна стойност ± SD

Установиха се най-ниски нива на хемоглобин и индекс на разтворими трансферинови рецептори при пациенти с ХБЗ стадий V на диализа. При пациенти с ревматоиден артрит се наблюдават най-ниски нива на процентно насищане на трансферина.

Сравнени са концентрациите на серумния хепсидин от отделните клинични групи с АХЗ с тези за контролната група. Наблюдавано е статистически значимо повишение на серумния хепсидин за всички клинични групи с АХЗ – Група 2 ХБЗ (стадии II-V, без диализа) $81.52 \pm 10.7 \mu\text{g/L}$; Група 3 – ХБЗ (стадий V, на диализа) $219.14 \pm 30.6 \mu\text{g/L}$ и Група 4 – РА $103.83 \pm 18.4 \mu\text{g/L}$, спрямо Група 1 Контролна 13.67

$\pm 4.9 \mu\text{g/L}$ ($0.3 < r < 0.7$; $P < 0.001$). Резултатите са представени в табл. 3.

Установиха се най-високи серумни нива на хепсидин при пациенти с ХБЗ стадий V на диализа. Таблица 4 съдържа корелационните зависимости и степента на значимост между отделните групи.

Най-подчертано е повишението на серумния хепсидин при пациенти с ХБЗ на диализа – за двете групи с ХБЗ и за РА и ХБЗ с диализа ($P < 0.001$). Не е наблюдавана значима разлика в серумния хепсидин между Група 2 (ХБЗ без диализа) и Група 4 (РА) ($P < 0.01$).

Получените резултати от серумните нива на хепсидин при изследваните групи лица са показани на фиг. 1.

Таблица 3. Резултати за серумен хепсидин при изследваните групи

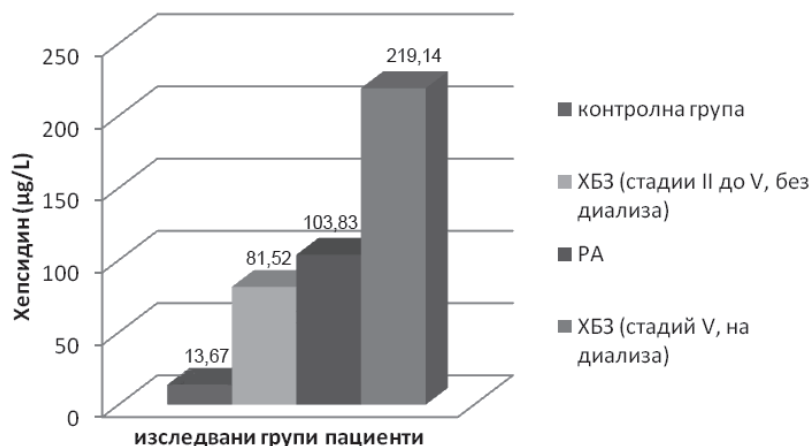
Група	Контролна	ХБЗ (стадий II-V, без диализа)	ХБЗ (стадий V, на диализа)	РА
Хепсидин ($\mu\text{g/L}$)*	13.67 ± 4.9	81.52 ± 10.7	219.14 ± 30.6	103.83 ± 18.4

*Данните са изразени като средна стойност $\pm$ SD

Таблица 4. Корелационни зависимости и степен на значимост между отделните групи

Групи	2	3	4	2	3	4
	Корелация (r)			t-test на Стьюдент (P)		
1	0.32	0.44	-0.55	< 0.001	< 0.001	< 0.001
2	–	0.56	0.45	–	< 0.001	< 0.01
3	–	–	-0.29	–	–	< 0.001

Група 1 – контролна; група 2 – ХБЗ (стадий от II до V, без диализа); група 3 – ХБЗ (стадий V, на диализа); група 4 – РА



ХБЗ – хронично бъбречно заболяване; РА – ревматоиден артрит

Фиг. 1. Серумни нива на хепсидин при отделните групи: контролна група, ХБЗ без диализа, ХБЗ с диализа и РА

ОБСЪЖДАНЕ

Клиничнолабораторните методи за количествено изследване на хепсидин могат да се обобщят в два основни класа: ензимни имуносорбентни методи (ELISA) и мас-спектрометрични аналитични платформи (MS). Основното предимство на ELISA техниките е, че те са приемлива възможност за рутинен анализ: по-лесни за изпълнение, по-достъпни и по-евтини. Основният им недостатък се отнася до антителата, които показват кръстосана реактивност и с двете малки биологично неактивни изоформи на хепсидина (хепсидин 20 и 22). При пациенти с АХЗ в серума се повишава концентрацията както на биологично активната 25-изоформа, така и на двете малки неактивни изоформи – 20 и 22. В тези случаи лабораторният резултат отразява концентрацията на тоталния хепсидин, а не само на изоформата с регулаторни функции към желязото. Методологичната особеност не би имала подчертано значение, ако с един и същи ELISA метод се проследяват промените в серумния хепсидин в динамика (5).

Получените резултати показват очаквано значимо повишение на серумния хепсидин при пациенти с ХБЗ в сравнение с контролната група. Особено подчертано е повишението при пациенти с ХБЗ стадий V на диализа. То би могло да отразява спецификите на диализата като процедура (чистота на диализата, биосъвместимост на диализните мембрани, интеркурентни инфекции), които се свързват с микровъзпаление и допълнително стимулират хепсидиновия синтез. Установените от нас промени в серумния хепсидин при ХБЗ (без диализа и с диализа) са подобни на тези от други автори (7).

Степента на повишение на хепсидина при ХБЗ би могла да диференцира пациенти с функционален дефицит на желязо (по-ниски хепсидинови нива в серума поради намалено бионалично желязо за еритропоезата) от тези с ретикулоендотелна блокада (много високи хепсидинови нива поради възпаление). Тъй като хепсидиновите нива се повишават

при въвеждане на парентерално желязо, мониторирането на това повишение при лечение на анемията би могло да покаже кога е постигнато ефективно запълване на депата и да алармира за риск от възможни токсични ефекти поради свръхнатрупване. От друга страна, високите хепсидинови нива водят до намалена ефективност и резистентност към стимулиращи еритропоезата средства (ESAs). Необходими са по-широки проучвания, които да изяснят връзката между хепсидиновите концентрации, очаквания терапевтичен отговор и мониторинга на терапията с ESAs (8).

Ревматоидният артрит, също като ХБЗ, е мултифакторно състояние, което се свързва с АХЗ. То може да включва и желязен дефицит (ЖД) поради кървене в гастроинтестиналния тракт, дължащо се на прилаганата терапия; разпределение в синовиалната тъкан. Установяването на ЖД при популации с АХЗ е от клинично значение, защото: 1) желязодефицитната анемия (ЖДА) е лечима, 2) диагнозата може да предшества по-нататъшно изследване на причината за анемия и 3) може да предотврати ненужното суплементиране с желязо. Данните от проучването показват значимо повишение на серумния хепсидин при РА в сравнение с контролната група. Серумният хепсидин е надежден маркер за разграничаване на ЖДА, смесено състояние ЖДА/АХЗ и АХЗ. Той може да е част от алгоритъм за селектиране на пациенти с РА, при което е подходящо прилагането на терапия с желязо за коригиране на анемичния синдром (9).

Бъдещето на хепсидина е свързано и с възможността хепсидинови антагонисти да се използват като терапевтично средство при третиране на анемията при възпаление. Намаляването на хепсидиновите нива или противодействието на биологичните ефекти на хепсидина могат да доведат до намаляване на възпалението върху еритропоезата чрез мобилизиране на складираното желязо и повишение на чревната абсорбция на елемента. Тези нови терапевтични подходи биха могли да намалят или изобщо да отстранят токсичните ефекти от лечението с паренте-

рално желязо с едновременно намаление и на нуждите от ESAs. В тези случаи серумният хепсидин е изключително подходящ терапевтичен прицел при управление на терапията при ХБЗ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определянето на серумния хепсидин е все още новост в българската медицинска практика. Въвеждането на надежден рутинен метод за изследване на хепсидин в биологични течности е крачка напред в лечението на заболявания с нарушена хомеостаза на желя-

зото. Настоящото проучване в различни клинични групи с АХЗ потвърждава способността на верифицирания имунохимичен метод да диференцира повишението в серумния хепсидин при ХБЗ и РА. То осигурява база за правилен избор на терапевтичен подход при лечението на анемията.

Благодарности

Това проучване е осъществено с помощта на Медицински университет, София (Грант 2/2012, 10/2013 и 67/2014).

Библиография

1. 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; 87(4):392-400.
2. Ganz T, Nemeth E. Iron sequestration and anemia of inflammation. *Semin Hematol*, 2009; 46:387-393.
3. Ganz T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood*, 2011; 11:4425-4433.
4. Ramey G, Deschemin JC, Durel B. Hepcidin targets ferroportin for degradation in hepatocytes. *Haematologica*, 2010; 95:501-504.
5. Mackdougall, IC, Malyszko, J, Hider, RC & Bansal, SS. Current status of the measurement of blood hepcidin levels in chronic kidney disease. *Clin J A Soc Nephrol*, 2010; 5, 1681-89.
6. Manolov V, Atanasova B, Velizarova M, et al. Serum hepcidin levels in Bulgarian population. *Clin Lab*, 2014, 60, In press.
7. Tsuchiya K, Nitta K. Hepcidin is a potential regulator of iron status in chronic kidney disease *Ther Apher Dial*. 2013; 17(1):1-8).
8. Young B, Zaritsky J. Hepcidin for Clinicians. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009; 4:1384-87.
9. Van Santen S, van Dongen-Lases E, de Vegt, F, et al. Hepcidin and Hemoglobin Content Parameters in the Diagnosis of Iron Deficiency in Rheumatoid Arthritis Patients with Anemia. *Arthritis and Rheumatism*, 2011; 63(12):3672-80.

Адрес за кореспонденция:

Д-р В. Манолов, дм
Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, МУ
ул. „Св. Г. Софийски“ № 1
1431 София
тел. +359 2 9230 928
e-mail: victhedoc2@yahoo.com

Address for correspondence:

V. Manolov, MD PhD
Department of Clinical Laboratory and Clinical Immunology, MU
1 "Sv. Georgi Sofiyski" St.
Bg – 1431 Sofia
Phone +359 2 9230 928
e-mail: victhedoc2@yahoo.com

СЕРУМНИ НИВА НА РЕВМАТОИДЕН ФАКТОР ПРИ РИСК ОТ ДЪЛБОКА ВЕНОЗНА ТРОМБОЗА

Ю. Петрова¹, В. Манолов², В. Паскалева-Пейчева³, С. Хаджидекова⁴, Б. Богов⁵,
В. Василев², Л. Трайков¹, И. Богов⁵, К. Цачев²

¹Клиника по неврология, УМБАЛ „Александровска“, Катедра по неврология

²Клинична лаборатория и клинична фармакология, УМБАЛ „Александровска“, Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология

³Клиника по ревматология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, Катедра по вътрешни болести

⁴Катедра по медицинска генетика

⁵Клиника по нефрология, УМБАЛ „Александровска“, Катедра по вътрешни болести

⁶Национална кардиологична болница
МУ – София

Резюме. Рискът от дълбока венозна тромбоза (ДВТ) е увеличен при пациенти с ревматоиден артрит. Проверихме хипотезата за връзката между повишените серумни концентрации на ревматоиден фактор (RF) с честотата на развитие на ДВТ. Включихме 72 пациенти, на които определихме серумните нива на RF. Изключващи критерии бяха наличие на автоимунно ревматоидно заболяване и венозна тромбоемболия. Пациентите бяха проследени в рамките на четири години за развитие на ДВТ. В продължение на четири години от 154 изследвани пациенти 19 развиха дълбока венозна тромбоза. Включените участници бяха разделени на три групи според концентрациите на RF IgM в серум. Серумни нива на RF IgM ≥ 90 IU/mL показаха най-висока степен на риск от развитие на ДВТ ($r = 0.854$, $P < 0.01$). При серумна концентрация на RF IgM в интервала 15-90 IU/mL се установи по-нисък риск от развитие на ДВТ ($r = 0.625$, $P < 0.005$). Групата със серумни нива на RF IgM < 15 IU/mL показва незначителен риск от развитие на ДВТ ($r = 0.125$, $P < 0.005$). Повишените серумни нива на RF водят до увеличаване на риска от развитие на ДВТ.

Ключови думи: ревматоиден артрит, ревматоиден фактор, дълбока венозна тромбоза, възпаление

SERUM RHEUMATOID FACTOR LEVELS IN RISK OF DEEP VENOUS THROMBOSIS

J. Petrova¹, V. Manolov², V. Paskaleva-Peycheva³, S. Hadjidekova⁴, B. Bogov⁵, V. Vasilev²,
L. Traykov¹, I. Bogov⁵, K. Tzachev²

¹Clinic of Neurology, University Hospital „Aleksandrovska“, Department of Neurology

²Clinical Laboratory and Clinical Pharmacology, University Hospital „Aleksandrovska“, Department of Clinical Laboratory and Clinical Immunology

³Clinic of Rheumatology, University Hospital „Sv. I. Rilski“, Department of Internal Diseases

⁴Department of Medical Genetics

⁵Clinic of Nephrology, University Hospital „Aleksandrovska“, Department of Internal Diseases

⁶National Cardiology Hospital
Medical University, Sofia

Abstract. Risk of deep venous thrombosis (DVT) is increased in rheumatoid arthritis patients. We hypothesized a correlation between increased rheumatoid factor (RF) serum levels and risk of DVT. We included 72 patients, which were quantified for serum RF concentrations. Excluding criteria were presence of autoimmune rheumatoid arthritis and venous thrombembolism. We found that for the next four years 19 developed DVT. Enrolled patients were divided into three groups, according to RF IgM serum levels.

We found that serum RF IgM concentrations ≥ 90 IU/mL were most significant correlated to DVT risk ($r = 0.854$, $P < 0.01$). In patients with RF IgM serum levels between 15 IU/mL and 90 IU/mL, we established lower DVT risk ($r = 0.625$, $P < 0.005$). Group with serum RF IgM concentrations < 15 IU/mL showed minor risk of DVT development ($r = 0.125$, $P < 0.005$). Elevated serum RF levels increases risk of deep venous thrombosis.

Key words: rheumatoid arthritis, rheumatoid factor, deep venous thrombosis, inflammation

ВЪВЕДЕНИЕ

Дълбоката венозна тромбоза (ДВТ) води до значителна заболяемост и развитие на белодробен емболизъм (БЕ) (1). Двете заболявания (ДВТ и БЕ) са част от венозния тромбоемболизъм, рискът от който е значително увеличен при пациенти с ревматоиден артрит (РА) или други автоимунни заболявания (2-4). Възможно е участие на възпалението на съдовете, но точната етиологията е все още неуточнена (5).

Ревматоидният фактор е антитяло, което е насочено срещу Fc-региона на имуноглобулин G. Той се използва най-често в рутинната практика за диагностика на РА (6, 7). При пациенти с ревматоиден артрит високите нива на RF се свързват с маркерите за възпаление и активност на заболяването (8).

Проверихме хипотезата, че високите серумни концентрации на RF са свързани с повишен риск от развитие на ДВТ при пациенти без автоимунни заболявания. За тази цел определихме количествено серумните нива на RF IgM при 154 пациенти и проследихме честотата на развитие на ДВТ в рамките на четири години.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Определихме количествено серумните нива на ревматоиден фактор (RF) при 72 пациенти, консултирани в Университетската болница „Св. Иван Рилски“, Клиниката по ревматология, УМБАЛ „Александровска“, Клиниката по неврология. Пациентите бяха проследени в продължение на четири години за развитие на дълбока венозна тромбоза (ДВТ).

Проведено е доплер-сонографско изследване на крайници с ехограф от висок клас

(Philips- Epique 5) с 5-13 Mz трансдюсер, като са проследени v. tibialis posterior, v. poplitea и v. femoralis. 94.4% (68 болни) бяха с тромбоза на tibialis posterior, 4.2% (3 болни) с тромбоза на v. poplitea и 1.4% на v. femoralis (1 болен). Пациентите, при които се установи дълбока хронична венозна тромбоза, независимо на коя от изследваните дълбоки вени, се включиха в изследването. Приеманата терапия беше несистемна употреба на венотоници, антиагреганти и съдоразширяващи.

Всички пациенти подписваха информирано съгласие според декларацията от Хелзинки (Директива 2001/20/ЕО).

Количественото определяне на серумните нива на RF IgM бе извършено с помощта на турбидиметричен метод на анализатор Dimension RXL Max (Siemens Healthcare). На всички пациенти бе определено нивото на CRP в серум чрез нефелометричен метод на анализатор BN ProSpec (на Siemens Healthcare). Статистическата оценка на данните е направена чрез Student t-тест (unpaired, two-tailed) със статистически значими разлики при $P < 0.05$ и Pearson correlation.

РЕЗУЛТАТИ

След количествено определяне на серумните нива на RF IgM разделихме пациентите на три групи:

- а) първа група – с нива на RF IgM в серум < 15 IU/mL;
- б) втора група – с концентрации на RF IgM между 15 и 90 IU/mL;
- в) трета група – със серумни нива на RF IgM ≥ 90 IU/mL.

Демографските показатели на включените пациенти са показани в табл. 1.

Таблица 1. Демографски показатели

	Група 1	Група 2	Група 3
Брой	25	23	24
Възраст	57.5 ± 5.5	59.4 ± 4.4	61.1 ± 4.8
Пол (м)	23 (45.1%)	22 (41.5%)	21 (42%)
Пол (ж)	28 (54.9%)	31 (58.5%)	29 (58%)
BMI (kg/m ²)	24 ± 1.2	25 ± 1.6	25 ± 1.3

BMI – body-mass index

Установихме значително нарастване на развитието на дълбока венозна тромбоза (ДВТ) с увеличаване на серумните нива на RF IgM в серум (табл. 2, фиг. 1)

Таблица 2. Брой случаи с ДВТ при включените пациенти

	Група 1	Група 2	Група 3
Брой	25	23	24
RF (IU/mL)	≤ 15	15-90	≥ 90
	7.5 ± 2.7	51.4 ± 10.8	111.5 ± 8.8
ДВТ (бр.)	2	6	11
ДВТ (%)	3.9	11.3	22.0

RF – ревматоиден фактор; ДВТ – дълбока венозна тромбоза

**Фиг. 1.** Серумни нива на RF IgM при включените групи пациенти

Серумните нива на RF IgM ≥ 90 IU/mL показваха най-висока степен на риск от развитие на ДВТ ($r = 0.854$, $P < 0.01$). При серумна концентрация на RF IgM в интервала 15 IU/mL-90 IU/mL се установи по-нисък риск от развитие на ДВТ ($r = 0.625$, $P < 0.005$). Групата със серумни нива на RF IgM < 15 IU/mL показва незначителен риск от развитие на ДВТ ($r = 0.125$, $P < 0.005$).

В табл. 3 са представени количествено определените CRP и показателите на липидната обмяна.

Таблица 3. Други клиниколабораторни показатели (представени като средна стойност ± SD)

	Група 1	Група 2	Група 3
CRP (mg/L)	1.5 ± 0.4	2.2 ± 0.8	3.5 ± 1.0
Общ холестерол (mmol/L)	4.98 ± 1.1	5.15 ± 1.2	5.45 ± 1.3
HDL холестерол (mmol/L)	2.52 ± 0.8	2.31 ± 0.8	1.99 ± 0.9
LDL холестерол (mmol/L)	0.98 ± 0.4	1.11 ± 0.5	1.54 ± 0.6
Триглицериди (mmol/L)	0.59 ± 0.3	0.98 ± 0.3	1.26 ± 0.4

CRP – C-реактивен протеин

Установихме постепенно нарастване на серумните нива на CRP и показателите на липидната обмяна с нарастване на концентрациите на RF, което не показва статистическа значимост при сравнително разглеждане между трите групи ($P > 0.1$).

ОБСЪЖДАНЕ

Получените от нас резултати показват повишаване на риска от развитие на дълбока венозна тромбоза с нарастване на серумните концентрации на ревматоиден фактор (RF IgM). Определянето на RF има диагностично значение за доказване на възпаление при пациенти с ревматоиден артрит, както и за изчисляване активността на заболяването. RF се свързва с повишена концентрация на острофазови белтъци (8), прогресия на заболяването (9) и развитие на сърдечно-съдови заболявания (10, 11). От друга страна, системното възпаление е свързано с развитие на венозен тромбоемболизъм (12, 13).

Нашите резултати показват нарастване на риска от развитие на ДВТ въпреки нормалните нива на CRP в серум. Това би могло да се обясни с евентуалното действие на RF като маркер за възпаление, независимо от нивото на C-реактивния протеин. Така също би могло да се предположи и директно участие на

RF в системното възпаление чрез увреждане на ендотела на съдовете, водейки по този начин до развитие на ДВТ (14).

Като лимитиращ фактор на проучването виждаме общия брой пациенти, включени в него. При по-голям брой ще могат да се прецизират и изключат и допълнителни рискови фактори за развитие на ДВТ, като възраст, давност на тютюнопушенето и брой цигари, изпушени за ден, високо систолно налягане, високи концентрации на CRP в серум.

В заключение установихме, че повишените серумни нива на RF водят до увеличаване на

риска от развитие на дълбока венозна тромбоза (ДВТ).

Благодарности

Това проучване бе извършено с подкрепата на Медицински университет – София, Грант № 67/2014.

Авторският колектив благодари на фирма „Марвена“ (представител на Siemens Healthcare Diagnostics за Р. България) и по-специално на г-жа Силвия Кирова и г-н Велизар Драгоев.

Библиография

1. Naess IA, Christiansen SC, Romundstad P, et al. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *J Thromb Haemost*, 2007; 5:692-9.
2. Choi HK, Rho YH, Zhu Y, et al. The risk of pulmonary embolism and deep vein thrombosis in rheumatoid arthritis: a UK population-based outpatient cohort study. *Ann Rheum Dis*, 2013; 72:1182-7.
3. Chung WS, Peng CL, Lin CL, et al. Rheumatoid arthritis increases the risk of deep vein thrombosis and pulmonary thromboembolism: a nationwide cohort study. *Ann Rheum Dis*, 2014; 73:1774-80.
4. Holmqvist ME, Neovius M, Eriksson J, et al. Risk of venous thromboembolism in patients with rheumatoid arthritis and association with disease duration and hospitalization. *JAMA*, 2012; 308:350-6.
5. Zoller B, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Autoimmune diseases and venous thromboembolism: a review of the literature. *Am J Cardiovasc Dis*, 2012; 2:171-83.
6. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*, 2010; 62:2569-81.
7. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med*, 2007; 146:797-808.
8. Knijff-Dutmer E, Drossaers-Bakker W, Verhoeven A, et al. Rheumatoid factor measured by fluoroimmunoassay: a responsive measure of rheumatoid arthritis disease activity that is associated with joint damage. *Ann Rheum Dis*, 2002; 61:603-7.
9. Aletaha D, Alasti F, Smolen JS. Rheumatoid factor determines structural progression of rheumatoid arthritis dependent and independent of disease activity. *Ann Rheum Dis*, 2013; 72:875-80.
10. Crowson CS, Matteson EL, Roger VL, et al. Usefulness of risk scores to estimate the risk of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Am J Cardiol*, 2012; 110:420-4.
11. Gonzalez A, Icen M, Kremers HM, et al. Mortality trends in rheumatoid arthritis: the role of rheumatoid factor. *J Rheumatol*, 2008; 35:1009-14.
12. Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol*, 2005; 131:417-30.
13. Folsom AR, Lutsey PL, Astor BC, Cushman M. C-reactive protein and venous thromboembolism: a prospective investigation in the ARIC cohort. *Thromb Haemost*, 2009; 102:615-9.
14. Hjeltnes G, Hollan I, Forre O, et al. Anti-CCP and RF IgM: predictors of impaired endothelial function in rheumatoid arthritis patients. *Scand J Rheumatol*, 2011; 40:422-7.

Адрес за кореспонденция:

Д-р В. Манолов, дм
Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, МУ
ул. „Св. Г. Софийски“ № 1
1431 София
тел. +359 2 9230 928
e-mail: victhedoc2@yahoo.com

Address for correspondence:

V. Manolov, MD PhD
Department of Clinical Laboratory and Clinical Immunology, MU
1 "Sv. Georgi Sofiyski" St.
Bg – 1431 Sofia
Phone +359 2 9230 928
e-mail: victhedoc2@yahoo.com

СЕРУМНИ НИВА НА ХЕПСИДИН, ИНТЕРЛЕВКИН-6, СЕЛЕН И СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗА ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХРОНИЧНО БЪБРЕЧНО ЗАБОЛЯВАНЕ И ИСХЕМИЧЕН ИНСУЛТ

Ю. Петрова¹, В. Манолов², С. Хаджидекова², Д. Йонова³, Б. Богов⁴, В. Василев⁵,
К. Цачев², Л. Трайков¹, И. Петрова¹, Г. Ангов¹, Е. Възелов³, И. Георгиева³,
И. Трендафилов³, В. Папазов³, Б. Маринов⁶, И. Богов⁷

¹Катедра по неврология, МУ – София

²Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, МУ – София

³Клиника по диализно лечение, УМБАЛ „Александровска”,

Клиничен център по диализа, МУ – София, ⁴Клиника по нефрология, УМБАЛ „Александровска”

⁵Клинична лаборатория и клинична фармакология, УМБАЛ „Александровска”

⁶Клиника по обща патологична бременност, УАГБ “Майчин дом”, МУ – София

⁷МБАЛ НКБ – София

Резюме. Оксидативният стрес заема важно място в етиологията на хроничното бъбречно заболяване и церебралната исхемия. Селенът и супероксид дисмутаза са важна част от антиоксидантната защита на организма. При оксидативен стрес се увеличава нивото на свободното желязо в организма. От друга страна, пептидът хепсидин регулира хомеостазата на желязо. Потърсихме корелация между серумните нива на хепсидин, интерлевкин-6, селен и супероксид дисмутаза при пациенти с хронично бъбречно заболяване и исхемичен инсулт. Изследвахме 11 пациенти с хронична бъбречна болест и исхемичен инсулт в каротидната система. Анализирахме статуса на серумното желязо, както и концентрациите на хепсидин, интерлевкин-6, селен и супероксид дисмутаза. Получените резултати сравнихме с контролна група, съответстваща по пол и възраст. Установихме статистически значимо повишени серумни нива на хепсидин и интерлевкин-6 при пациенти с хронично бъбречно заболяване и исхемичен инсулт ($121.7 \pm 11.5 \mu\text{g/L}$ и $13.9 \pm 1.8 \text{ ng/L}$) спрямо контролната група ($21.7 \pm 1.4 \mu\text{g/L}$ и $1.9 \pm 1.0 \text{ ng/L}$); $P < 0.001$. Серумните нива на селен и супероксид дисмутаза са значително по-ниски при пациенти с хронично бъбречно заболяване и исхемичен инсулт ($322.6 \pm 39.4 \text{ nmol/l}$ и $37.6 \pm 5.9 \mu\text{g/mL}$) спрямо контролната група ($899.4 \pm 35.9 \text{ nmol/l}$ и $104.8 \pm 9.4 \mu\text{g/mL}$); $P < 0.001$. Нашите резултати показаха съществена корелационна връзка между нивата на хепсидин, интерлевкин-6, селен и супероксид дисмутаза при пациенти с хронично бъбречно заболяване и исхемичен инсулт.

Ключови думи: хепсидин, селен, исхемичен инсулт, интерлевкин-6, супероксид дисмутаза, хронично бъбречно заболяване

SERUM HEPICIDIN, INTERLEUKIN-6, SELENIUM AND SUPEROXIDE DISMUTASE IN CHRONIC KIDNEY DISEASE PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE

J. Petrova¹, V. Manolov², S. Hadjidekova³, D. Yonova⁴, B. Bogov⁵, V. Vasilev⁶, K. Tzatchev²,
L. Traykov¹, I. Petrova¹, G. Angov¹, E. Vazelov⁴, I. Georgieva⁴, I. Trendafilov⁴, V. Papazov⁴,
B. Marinov⁷, I. Bogov⁸

¹Department of Neurology, Medical University,

²Department of Clinical Laboratory and clinical Immunology, Medical University,

³Department of Medical Genetics, Medical University, ⁴Clinical Center of Dialysis, Medical University

⁵Clinic of Nephrology, University “Aleksandrovska” Hospital

⁶Clinical Laboratory and Clinical Pharmacology, University “Aleksandrovska” Hospital

⁷Department of Obstetrics and Gynecology, Medical University,

⁸Clinic of Intensive Cardiology, National Cardiology Hospital

Abstract. Objectives. Oxidative stress takes important place in ethiology of chronic kidney diseases and cerebral ischemia. Selenium and superoxide dismutase are part of antioxidant defense system. Free iron level is increased in oxidative stress. On the other hand, peptide named hepcidin regulates iron homeostasis.

We searched for correlation between serum hepcidin, IL-6, selenium and SOD concentrations in patients with chronic kidney diseases and cerebral ischemia. Methods. 11 patients with CKD and ischemic stroke in carotid system were enrolled. We quantified iron homeostasis parameters, hepcidin, IL-6, Se, and SOD. The results were compared to age and gender matched healthy controls. Results. We found statistically significant increased serum hepcidin and IL-6 levels in CKD patients with ischemic stroke ($121.7 \pm 11.5 \mu\text{g/L}$ and $13.9 \pm 1.8 \text{ ng/L}$) compared to healthy controls ($21.7 \pm 1.4 \mu\text{g/L}$ и $1.9 \pm 1.0 \text{ ng/L}$); $P < 0.001$. Selenium and SOD concentrations were decreased in CKD patients with ischemic stroke ($322.6 \pm 39.4 \text{ nmol/l}$ и $37.6 \pm 5.9 \mu\text{g/mL}$) compared to healthy controls ($899.4 \pm 35.9 \text{ nmol/l}$ and $104.8 \pm 9.4 \mu\text{g/mL}$); $P < 0.001$. Conclusions. Our results shows correlation between hepcidin, IL-6m Se and SOD levels in CKD patients with ischemic stroke, which was connected to iron dishomeostatsis in oxidative stress.

Key words: hepcidin, selenium, ischemic stroke, interleukin-6, superoxide dismutase, chronic kidney disease

ВЪВЕДЕНИЕ

Хроничната бъбречна болест (ХББ) се характеризира с комплекс от изменения в клетъчния метаболизъм, водещи до оксидативен стрес. В последните години са събрани значително количество доказателства за ключовата роля на свободните радикали в много клетъчни реакции. Оксидативният стрес играе важна роля в патофизиологията на генерализирани заболявания, включващи атеросклероза, ХББ, захарен диабет, малигнени заболявания (1).

Микроелементът селен играе част от основната роля в антиоксидантната защитна система на организма. Той изпълнява антиоксидантна функция чрез протеините, в които е включен (2). Антиоксидантен ензим е супероксид дисмутаза (SOD). Редица автори показват, че формирането на микроелемент-съдържащите съединения са критични за биологичните активности.

Недостигът на селен се свързва със засягане на артериите и предполага висок риск от съдови събития (3). Предложени са няколко механизма за медиране на биологичните ефекти на селена и те включват антиоксидантни системи за защита, синтез и стабилност на метаболити. Установено е, че селенът може да предотвратява исхемичните увреждания на невроните, като по този начин се ограничава исхемичната клетъчна смърт (4).

Хепсидинът е обсъждан като рисков фактор за развитието на атеросклероза (5, 6). Пато-

физиологично настъпва извличане на желязото от ретикуло-ендотелните депа, увеличаване на свободната му концентрация и отлагане в тъкани и клетки. Хепсидинът регулира трансфера на клетъчното желязо в плазмата от тези клетки (7). Възпалителни цитокини се явяват мощни стимулатори на синтеза на хепсидин, които играят основна патогенна роля във функционалния недостиг на желязо при анемия на хроничните заболявания (АХЗ). Оксидативният стрес играе важна роля за увреждането на невронните структури и води до мозъчна исхемия. Свободното желязо се увеличава значително по време на исхемия и има водеща роля при оксидативното увреждане на мозъка.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследвахме 11 пациенти с хронична бъбречна болест и исхемичен инсулт в каротидната система на средна възраст 59.1 ± 5.1 години. Пациентите бяха диагностицирани в УМБАЛ „Александровска“, Клиниките по неврология, по нефрология и по диализно лечение. Получените резултати бяха сравнени с контролна група, съответстваща по брой, пол и възраст. На всички пациенти бяха определени биохимични изследвания, вкл. хепсидин, супероксид дисмутаза, интерлевкин-6 и селен. Определянето на показателите бе извършено с помощта на биохимичен анализатор Dimension RxL MAX (Siemens Healthcare). Серумните нива на хепсидин и интерлевкин-6 бяха определени

чрез ELISA метод. Получените резултати бяха анализирани статистически чрез SPSS 13.0 (IBM). Измерените стойности са представени като средна стойност $\pm$ SD. Корелационната зависимост бе определена с теста на Pearson. За доказване на статистическа значимост използвахме чифтния тест на Student.

РЕЗУЛТАТИ

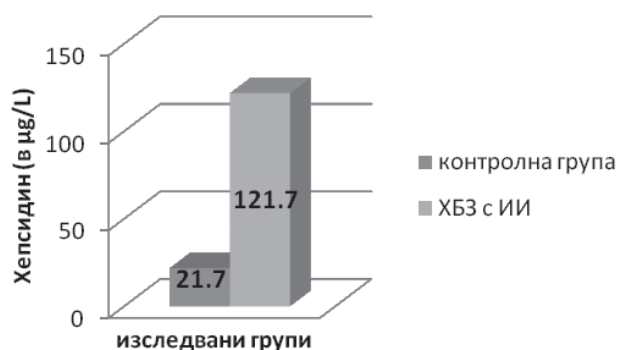
Установихме статистически значимо по-високи серумни нива на хепсидин при пациентите с хронично бъбречно заболяване и исхемичен инсулт ($121.7 \pm 11.5 \mu\text{g/L}$) спрямо контролната група ($21.7 \pm 1.4 \mu\text{g/L}$); $P < 0.001$. Серумните нива на интерлевкин-6 бяха статистически значимо повишени при пациенти

с хронично бъбречно заболяване и исхемичен инсулт ($13.9 \pm 1.8 \text{ ng/L}$) спрямо контролната група ($1.9 \pm 1.0 \text{ ng/L}$); $P < 0.001$.

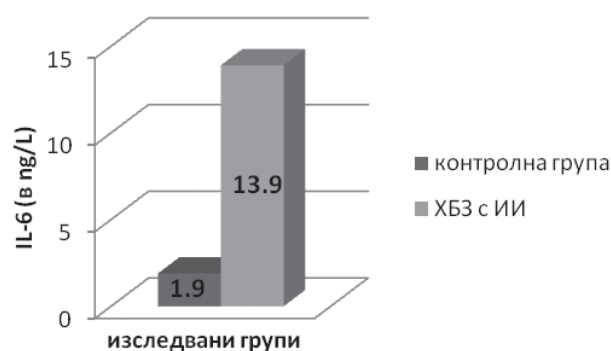
Установи се дефицит на селен при пациентите с хронично бъбречно заболяване и исхемичен инсулт ($322.6 \pm 39.4 \text{ nmol/l}$) спрямо контролната група ($899.4 \pm 35.9 \text{ nmol/l}$); $P < 0.001$.

Плазмените концентрации на супероксид дисмутаза бяха статистически значимо пониски при пациентите с хронично бъбречно заболяване и исхемичен инсулт ($37.6 \pm 5.9 \mu\text{g/mL}$) в сравнение с контролната група ($104.8 \pm 9.4 \mu\text{g/mL}$); $P < 0.001$.

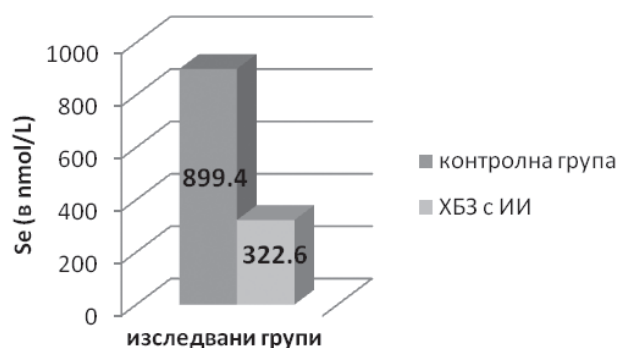
На фиг. 1-4 са представени получените резултати.



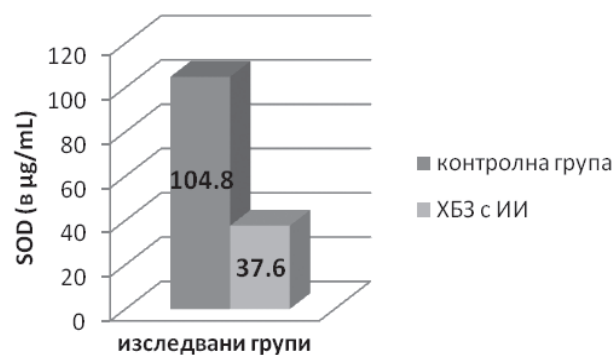
Фиг. 1. Серумни нива на хепсидин в $\mu\text{g/L}$



Фиг. 2. Серумни нива на интерлевкин-6 в ng/L



Фиг. 3. Серумни нива на селен в nmol/L



Фиг. 4. Серумни нива на супероксид дисмутаза в $\mu\text{g/mL}$

ОБСЪЖДАНЕ

Хроничната бъбречна болест (ХББ) се характеризира с комплекс от изменения в клетъчния метаболизъм, водещи до оксидативен стрес, т.е. повишена продукция на оксидативни радикали, които могат да играят ключова роля за редица клинични усложнения при тази патология.

Свободните радикали увреждат различни тъкани или органи, следователно микроелементите и токсичните елементи постъпват в различни органи. Наличната информация показва, че при пациенти с ХББ в терминален стадий нивата на кадмий, хром, мед, олово и ванадий са по-високи, а нивата на селен, цинк и магнезий са по-ниски от нивата на същите елементи при здрави хора. Въпреки че някои автори не откриват разлика в селеновата концентрация в кръвните компоненти на пациенти с ХББ и контроли (8), много други намират значително по-ниски стойности (9). Няколко автори показват постепенно понижаване на селеновото ниво заедно с прогресирането на заболяването (10). Заедно с прогресирането на бъбречното увреждане, селеновата концентрация намалява в кръвта и плазмата. Това е особено изразено в крайния стадий на заболяването, когато концентрацията на селен в кръв и плазма е по-ниска, респективно с 47 и 50% ($P < 0.0001$), в сравнение с контролната група (11).

Като малък пептид, който не изглежда да е свързан в голяма степен с плазмените протеини, хепсидинът се елиминира от плазмата чрез бъбреците чрез феропортин-медирирани ендоцитоза и протеолиза. Съответно концентрации на плазмените нива на хепсидина могат да се увеличават при болестни процеси, които намаляват клирънса на хепсидина от бъбреците (12). Високите нива на желязо в циркулацията стимулират синтеза на хепсидин в черния дроб. Повишеният хепсидин намалява чревната абсорбция на желязо и блокира износа му от тъканните депа – така се избягва свръхнатрупване на желязо в организма. От друга страна, понижените нива на желязо потискат синтеза на хепсидин, а това

стимулира усвояването на желязото през дуденалните ентероцити и освобождаването му от тъканните депа.

За нормалното функциониране на човешкия организъм е от важно значение поддържането на желязото в рамките на референтните стойности. С клинично значение са както понижените, така и повишените нива на желязо. Хепсидинът, регулатор на обмяната на желязо, има диагностично значение за диференциране на състоянията, свързани както с ниско, така и с повишено ниво на желязо. Известно е, че един от механизмите за регулиране на хепсидиновата секреция е възпалението чрез възпалителните цитокини (13). Някои проучвания показват, че хелаторите на желязо могат да доведат до намаляване на токсичните увреждания, причинени от сърдечната исхемия и реперфузия (14), както и мозъчната исхемия (15).

От друга страна, ниските серумни нива на селен водят до развитие на оксидативен стрес, което допълнително задълбочава невроналното мозъчно увреждане.

Нашите резултати показаха съществена корелационна връзка между нивата на хепсидин, интерлекин-6, селен и супероксид дисмутаза при пациенти с хронична бъбречна болест и исхемичен инсулт.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Количественото определяне на супероксид дисмутаза, селен и хепсидин при болни с ХББ, при пациенти на диализа с исхемичен инсулт, е необходимо за установяване наличието и тежестта на съпровождащия оксидативен стрес, допълнително влошаващ състоянието на пациентите.

Получените резултати предполагат важната роля на серумния хепсидин при натрупване на желязо при пациенти с хронично бъбречно заболяване и церебрална исхемия.

Благодарности

Този проект е осъществен с подкрепата на Медицински университет, София, Грант „Стимулиране на научни изследвания в об-

ласти с постигнати високи научни постижения", Договор № 1-С/2015 г. и Грант договор № 4-С/2016 г. Авторският колектив изказва своите благодарности от подкре-

пата на фирма "Марвена" (официален представител на "Siemens Healthcare" за Р. България) и по-специално на г-н Велизар Драгоев и г-жа Силвия Кирова.

Библиография

1. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 2001; 54:176-186.
2. El-Bayoumy K. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutat Res*, 2001; 475:123-129.
3. Chan YH, Siu CW, Yiu KH, et al. Adverse systemic arterial function in patients with selenium deficiency. *J Nutr Health Aging*, 2012; 16(1):85-8.
4. Yousuf S, Atif F, Ahmad M, et al. Selenium plays a modulatory role against cerebral ischemia-induced neuronal damage in rat hippocampus. *Brain Res*. 2007; 1147:218-25.
5. Sullivan J. Macrophage iron, hepcidin, and atherosclerotic plaque stability. *Exp Biol Med*, 2007; 232:1014-1020.
6. Valenti L, Swinkels DW, Burdick L, et al. Serum ferritin and hepcidin levels predict vascular damage in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Hematol*, 2009; 84:E236-E375.
7. 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; 87(4): 392-400.
8. Milly K, Wit L, Diskin C, Tulley R. Selenium in renal failure patients. *Nephron*, 1992; 61:139-144.
9. Zachara BA, Gromadzinska J, Wasowicz W, Zbrog Z. Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: A review. *Acta Biochim Polon*, 2006; 53:663-677.
10. Zachara BA, Salak A, Kotarska D, et al. Selenium and glutathione peroxidases in blood of patients with different stages of chronic renal failure. *J. Trace Elem Med Biol*, 2004; 17:291-299.
11. Zachara BA, Adamowicz A, Trafikowska U, et al. Selenium and glutathione levels, and glutathione peroxidase activities in blood components of uremic patients on hemodialysis supplemented with selenium and treated with erythropoietin. *J. Trace Elem Med Biol*, 2001; 15:201-208.
12. Zaritsky J, Young B, Wang HJ, et al. Hepcidin-a potential novel biomarker for iron status in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009; 4:1051-1056.
13. Majeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, et al. 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell*, 2003; 3:13.
14. Tang WH, Wu S, Wong TM, et al. Polyol pathway mediates iron-induced oxidative injury in ischemic-reperfused rat heart. *Free Radic Biol Med*, 2008; 45:9.
15. Hamrick SE, McQuillen PS, Jiang X, et al. A role for hypoxia-inducible factor-1alpha in desferoxamine neuroprotection. *Neurosci Lett*, 2005; 379:96-100.

Адрес за кореспонденция:

Д-р В. Манолов, дм
Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, МУ
ул. „Св. Г. Софийски“ № 1
1431 София
тел. +359 2 9230 928
e-mail: victhedoc2@yahoo.com

Address for correspondence:

V. Manolov, MD PhD
Department of Clinical Laboratory and Clinical Immunology, MU
1 "Sv. Georgi Sofiyski" St.
Bg – 1431 Sofia
Phone +359 2 9230 928
e-mail: victhedoc2@yahoo.com

КОМУНИКАТИВНИ ОСОБЕНОСТИ ПРИ ОБЩУВАНЕТО ЛЕКАР–ПАЦИЕНТ

Б. Богов¹, Х. Богова²

¹УМБАЛ “Александровска”, МУ – София

²УНИБИТ – София

Резюме. Комуникацията се основава върху взаимното предаване на информация между поне двама души. Комуникацията е процес на обмяна на информация между хората, който е присъщ на всички живи организми и информационни системи. Пилотното проучване е реализирано със 137 респонденти, на възраст от 20 до 90 години. Разпределени по пол – 60% от анкетираните са жени и 40% – мъже. Комуникацията между лекар и пациент може да се дефинира като взаимен вербален и невербален обмен на информация между двамата основни социални партньори в лечебния процес: лекарят и пациентът. Добрите отношения между тях се основават на взаимно доверие.

Ключови думи: комуникация, лекар, пациент, вербален и невербален обмен

COMMUNICATIVE SPECIFICS OF THE PHYSICIAN-PATIENT COMMUNICATION

B. Bogov¹, H. Bogova²

¹UMHAT “Aleksandrovska”, MU – Sofia

²ULSIT – Sofia

Abstract. Communication is based on the mutual transfer of information between at least two people. Communication is the process of exchange of information between people that is inherent to all living things and information systems. The pilot study was conducted with 137 respondents aged 20 to 90. Distributed by gender – 60% of respondents were women, and 40% were men. The physician-patient communication can be defined as a mutual verbal and non-verbal exchange of information between the two main social partners in the healing process: the doctor and the patient. The good physician-patient relationships are based on mutual trust.

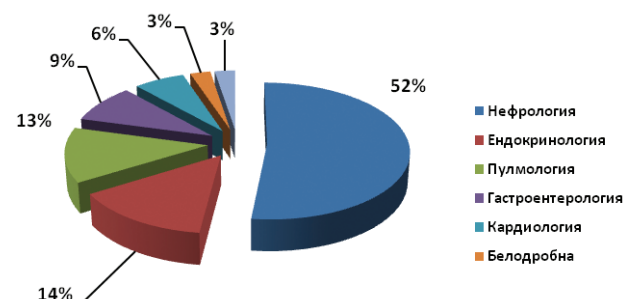
Key words: communication, physician, patient, verbal and non-verbal exchange

Комуникацията се основава върху взаимното предаване на информация между поне двама души. Комуникацията е процес на обмяна на информация между хората, който е присъщ на всички живи организми и информационни системи. Различават се два основни типа комуникация: невербална и вербална.

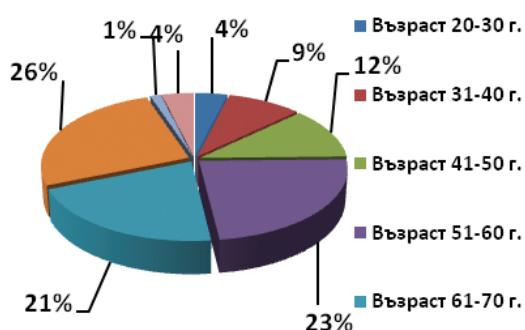
За периода от 03.05. до 23.05.2017 г. е проведено пилотно проучване в 6 клиники на УМБАЛ “Александровска” (фиг. 1).

Пилотното проучване е реализирано със 137 респонденти, на възраст от 20 до 90 години.

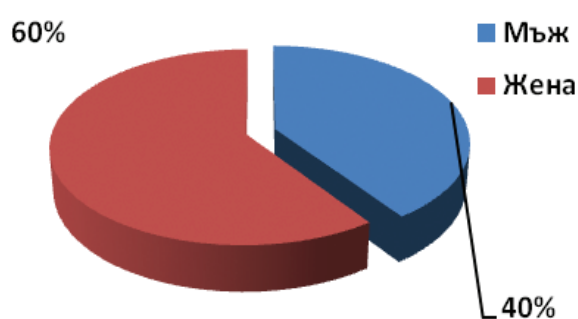
Разпределени по пол – 60% от анкетираните са жени и 40% – мъже (фиг. 2, 3).



Фиг. 1. Отделения, в които е проведено пилотното проучване



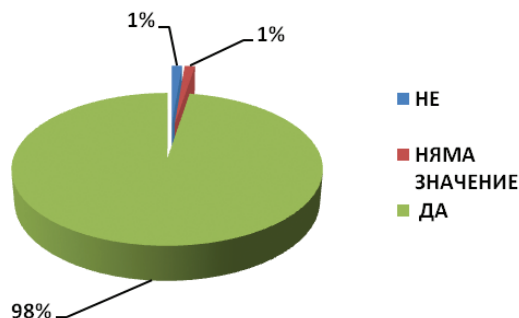
Фиг. 2. Възраст на респондерите



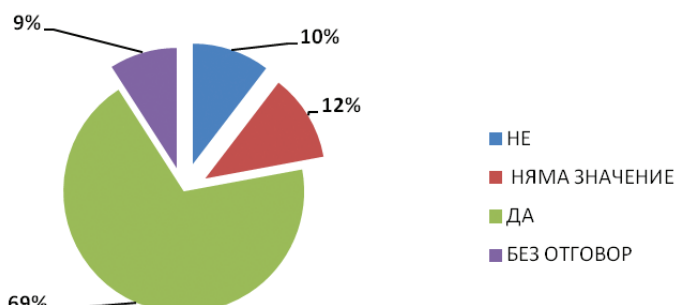
Фиг. 3. Пол на респондерите

Комуникацията между лекар и пациент може да се дефинира като взаимен вербален и невербален обмен на информация между двамата основни социални партньори в лечебния процес: лекаря и пациента. За успеха на това общуване допринася параезикът на лекаря, чрез който той може да вдъхне доверие на пациента към себе си и да му помогне да преодолее психологическите си проблеми и др. При въпрос, необходимо ли е лекарите да бъдат вежливи и общителни с пациентите си,

резултатите сочат категоричен отговор (фиг. 4). Добрите отношения между лекар и пациент се основават на взаимно доверие. За да установи и съхрани това доверие, лекарят трябва да бъде учтив, деликатен и честен. Да зачита правото на тайна и достойнството на пациента, да зачита правото на пациентите да откажат участие в процеса на преподаване или научно проучване и да се увери, че този отказ не повлиява негативно отношенията му с пациента.



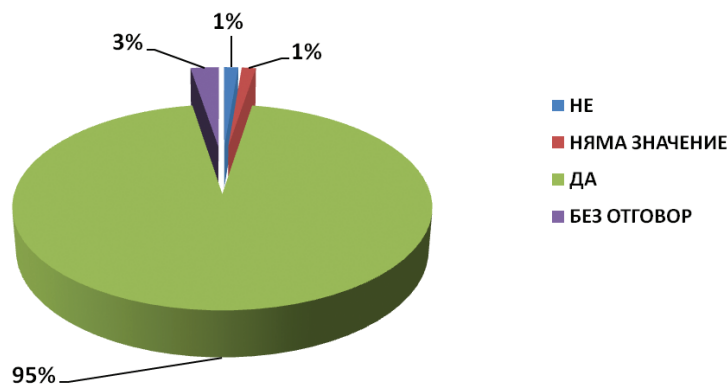
Фиг. 4. Необходимо ли е лекарите да бъдат вежливи и общителни?



Фиг. 5. Предпочитате ли лекарите в отделението да не са толкова вежливи, но компетентни?

Предоставянето на изискваната от пациентите или необходимата им информация за тяхното състояние, лечение и прогноза на разбираем език е предпочитано от пациентите. Това се отнася и за всеки лекарствен продукт, който лекарят предписва – дали е подходящ, необходимата доза, по-сериозни странични ефекти.

Днес се смята, че пациентът, ако е пълнолетно лице, трябва да знае



Фиг. 6. Подробна осведоменост за здравословното състояние

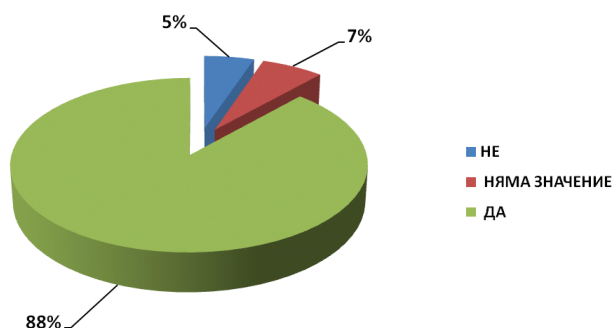
всичко за своето здравословно състояние, защото именно той взема решение за собственото си лечение (фиг. 6). Семейството на пациента получава информация само със съгласието на самия пациент.

При общуването с лекаря правата на пациента му осигуряват правото на информация, правото да се съгласи или да отхвърли даден вид терапия, правото на уважение и зачитане на неговата анонимност и др. В българското законодателство тези права са регламентирани в Закона за здравето (чл.чл. 86-96) и в Закона за здравното осигуряване (чл. чл. 35-36). На въпроса „Важно ли е за Вас да знаете начина, по който ще бъдете лекувани“, близо 90% от пациентите са посочили отговор „ДА“ (фиг. 7). Относно желанието на пациентите да узнаят резултатите от текущи изследвания, резултатът от отговорите им е съпоставим – 92% (фиг. 8). При възникнали ситуации, при които пациентът има нужда от консултация с друг специалист, лекуващият лекар би следвало да се съобрази с желанието на пациента. Лекарят не бива да прекъсва отношенията си с паци-

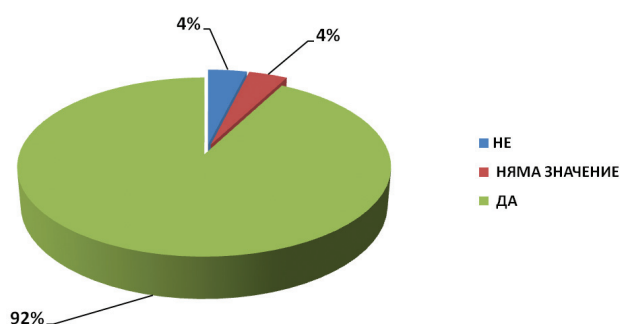
ента до поемане на грижата за него от друг лекар.

За успеха на общуването огромна роля има параезикът на лекаря, чрез който той може да вдъхне доверие у пациента към себе си, да му помогне да преодолее психологическите си проблеми. Същевременно параезикът на лекаря може много бързо да унищожи доверието на пациента и да породии съпротива у него срещу предлаганата му терапия. Това се случва, когато параезикът на лекаря изразява досада и нетърпение спрямо пациента, безразличие към неговите притеснения и страдания – проблем, с който хората с различни заболявания нерядко се сблъскват (фиг. 9).

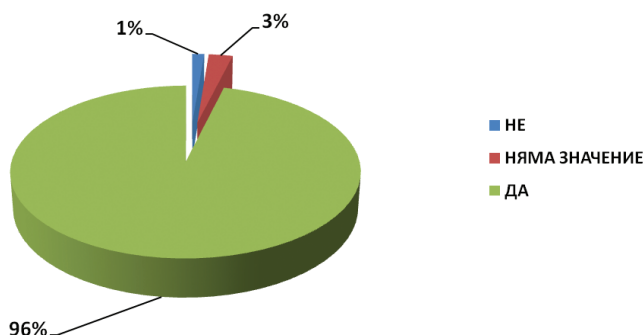
Повечето пациенти считат, че известността на дадения лекар се формира въз основа на професионални качества, натрупан опит, голям брой пациенти, научна и преподавателска дейност, придобито научно звание, заемана академична длъжност. От проведената анкета 65% са дали категоричен отговор – ДА, но при приблизително 1/3 от тях, или



Фиг. 7. Важно ли е за Вас да знаете начина, по който ще бъдете лекувани?



Фиг. 8. Желаете ли да знаете резултатите от текущите изследвания?

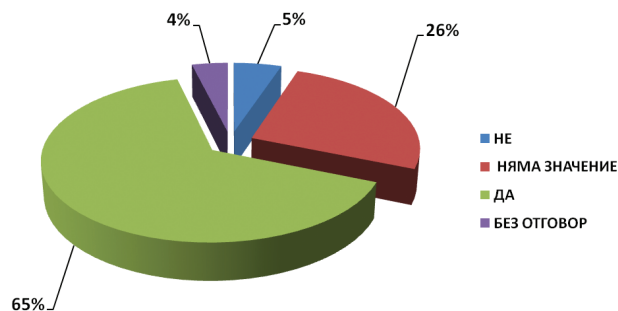


Фиг. 9. Необходимо ли е лекуващият Ви лекар да се изразява на достъпен език?

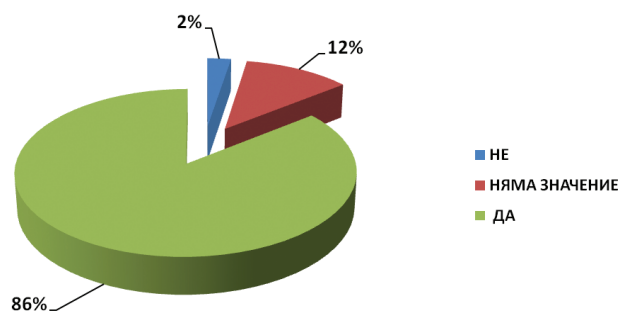
26%, известността на лекаря не е от значение (фиг. 10).

Често влияние върху пациентите оказват и редица други фактори, като: облекло, прическа, социалната и/или архитектурната среда, в която протича комуникацията, социалния и икономически статус на общуващите. Що се касае до общуването, голяма част от пациентите са категорични, че ежедневно общуване и обсъждане на тяхното здравословно състояние, както и последващо лечение е изключително важно за тях и за тяхното психологическо състояние. По този начин пациентите се чувстват информирани, спокойни и с доверие към лекуващия ги лекар (фиг. 11). В обобщение на резултатите от проведената анкета, може да се направи изводът, че:

- Добрите отношения между лекар и пациент се основават на взаимно доверие. За да установи и съхрани това доверие, лекарят трябва да бъде учтив, деликатен и честен. Да зачита правото на тайна и достойнството на пациента, да зачита правото на пациентите да откажат участие в процеса на преподаване или научно проучване и да се увери, че този отказ не повлиява негативно на отношенията му с пациента. Трябва да се зачита правото на пациента на "второ мнение", както и да бъде лесно достъпен за пациентите и колегите си в съответствие с реда в лечебното или здравното заведение.



Фиг. 10. Важно ли е за Вас лекуващият Ви лекар да е известен в своята област?



Фиг. 11. Предпочитате ли общуването с лекарите да е ежедневно?

Адрес за кореспонденция:

Проф. Б. Богов
Клиника по нефрология
УМБАЛ "Александровска"
ул. „Св. Г. Софийски“ № 1
1431 София

Address for correspondence:

Prof. B. Bogov
Clinic of Nephrology
University Hospital „Aleksandrovskia”
1 "Sv. Georgi Sofiyski" St.
Bg – 1431 Sofia

АГРЕСИВНО ПРОТИЧАЩ СИСТЕМЕН ЛУПУС ЕРИТЕМАТОЗУС С ПРОЯВИ НА МИКРОАНГИОПАТИЯ – ДИФЕРЕНЦИАЛНО-ДИАГНОСТИЧНИ ТРУДНОСТИ

М. Христова¹, М. Любомирова¹, Е. Хаджиев², Б. Богов¹

¹Клиника по нефрология, УМБАЛ „Александровска“, Катедра по вътрешни болести, Медицински университет – София

²Клиника по хематология, УМБАЛ „Александровска“, Катедра по вътрешни болести, Медицински университет – София

Резюме. Наличието на вторичен антифосфолипиден синдром (АФС) при системен лупус еритематозус (СЛЕ) води до по-тежката му клинична изява и се свързва с по-лоша прогноза. Една от редките форми на АФС е катастрофалният антифосфолипиден синдром (КАФС), свързан с висока смъртност. Представяме 38-годишна жена от бялата раса с клинична картина на разгърнат нефротичен синдром, като вероятна проява на системен лупус еритематозус. Развитието на тромбоза, въпреки провежданата антикоагулантна терапия, повишените титри на антикардиолипинови антитела от клас IgГ и агресивно протичащата панцитопения, на фона на патогенетична терапия, поставят въпроси за подлежащите причини, довели до фаталния изход. В статията се обсъждат диференциалнодиагностичните и терапевтични трудности, които възникват в клиничната практика при различни състояния на микроангиопатия и дисеминирана интравасална коагулопатия. Въпреки напредъка в технологичен и терапевтичен аспект КАФС продължава да бъде предизвикателство пред съвременната медицинска практика.

Ключови думи: системен лупус еритематозус, микроангиопатии, катастрофален антифосфолипиден синдром

AGGRESSIVE MANIFESTATION OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS PRESENTED WITH MICROANGIOPATHY – DIFFERENTIAL DIAGNOSTIC DIFFICULTIES

M. Hristova¹, M. Lubomirova¹, E. Hadzhiev², B. Bogov¹

¹Clinic of Nephrology, University Hospital “Aleksandrovska”, Department of Internal Medicine, Medical University – Sofia

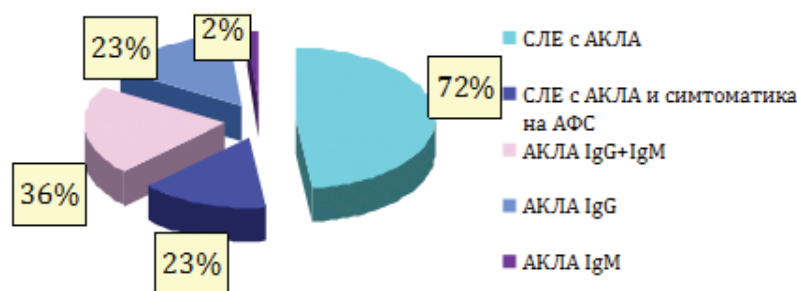
²Clinic of Haematology, University Hospital “Aleksandrovska”, Department of Internal Medicine, Medical University – Sofia

Abstract. The presence of secondary antiphospholipid syndrome (APS) in the course of systemic lupus erythematosus leads to more severe clinical manifestation and worse prognosis. A rare form of APS is the catastrophic antiphospholipid syndrome (CAPS) associated with high mortality rate. We present a 38-year-old Caucasian woman with clinically manifested nephrotic syndrome more likely due to systemic lupus erythematosus. The appearance of thrombosis in the course of anticoagulant therapy, the increased titers of anticardiolipin antibodies class IgG and the aggressive pancytopenia despite the ongoing pathogenic therapy raised the question about the underlying cause of death. Some difficulties observed in the routine clinical practice concerning the differential diagnosis of microangiopathies and disseminated intravascular coagulation were discussed. Although there is a significant technical and therapeutical progress in medicine, CAPS continues to be a challenge in medical practice.

Key words: systemic lupus erythematosus, microangiopathy, catastrophic antiphospholipid syndrome

УВОД

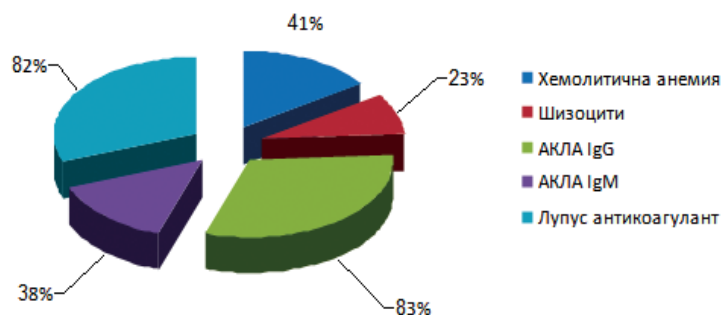
При около 23% от пациентите със системен лупус еритематозус (СЛЕ) е налице симптоматичен вторичен АФС с антифосфолипидни антитела (АФА). Най-често се наблюдават антикардиолипинови антитела (АКЛА) в до 72% от случаите на заболяването (6). I. Rodríguez-Pintó и сътр. (9) показват, че в 36% от случаите се откриват АКЛА от клас IgG и клас IgM, следвани от клас IgG в 23% и клас IgM в 2% (фиг. 1). Въпреки че не са включени в критериите от Сапоро (7), някои автори съобщават за наличие на АКЛА от клас IgA. Сред неселектирани пациенти със СЛЕ според М. Самаркос и сътр. (10) честотата на IgA АКЛА варира между 1 и 44%. Наличието на антифосфолипиден синдром (АФС) при СЛЕ не е свързано с изявата на определен клас лупусен нефрит, но при тези случаи има по-чести епизоди на артрит, ливедо ретикуларис, тромбоцитопения, левкопения, наблюдават се по-изразена азотемия, интерстициална фиброза и като цяло се свързва с по-лоша прогноза (6).



Фиг. 1. Честота на антикардиолипинови антитела при СЛЕ

Една от най-тежките форми на протичане на АФС е катастрофалният антифосфолипиден синдром (КАФС), който се свързва с висок леталитет (4). Анализът на Asherson и сътр. (2) от проекта Europhospholipid по-

казва, че тромбоцитопения се наблюдава при до 100% от изследваните. Честотата на останалите лабораторни прояви при този вид АФС е представена на фиг. 2 (2).



Фиг. 2. Честота на лабораторни отклонения при КАФС

КАФС може да протича със или без дисеминирана интравазална коагулация (ДИК). С подобна тежка клинична картина протичат тромботичните микроангиопатии – хемолитико-уремичният синдром (ХУС) с неговите форми и тромботичната тромбоцитопенична пурпура (фиг. 3). Характерно за класическия ХУС е наличието на кървава диария, хемолитична анемия, при която често се установяват шизоцити, тромбоцитопения, уремия, олигурия, хипертензия. Атипичният ХУС (аХУС) протича с подобна клинична картина, но обичайно липсва диаричен синдром. При него е налице активация на системата на комплемента по алтернативния път, при което нивата на C4 са запазени (8). Характерно е наличието на антифактор Н антитела.

При тромботичната тромбоцитопенична пурпура освен хемолитична анемия, се наблюдават и по-изразена неврологична симптоматика, придобит или наследствен дефицит на ADAMTS13 (8).



Фиг. 3. Схема на хемолитико-уремичен синдром и тромботична тромбоцитопенична пурпура (оригинална) **STX** – Shiga toxin, или **STEC** – Shiga toxin, E. коли; **CFH** – комплементен фактор H, **CFI** – комплементен фактор I, **CFB** – комплементен фактор B, **MCP** – мембранно-свързан протеин

КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ

Касае се за 38-годишна жена от бялата раса. При първичния прием е с оплаквания от масивни отоци по долните крайници, отпадналост, загуба на апетит, изразен задух, лош контрол на артериалното налягане (АН) със стойности до 200/100 mm Hg с давност 1 месец, субфебрилитет до 37,3° C. Съобщава за болки в интерфалангеалните стави на ръцете. Установява се хиперпигментация на лявата подбедрица, резултат от тромбоза, за която не представя медицинска документация. Има едно нормално раждане, без спонтанни аборти.

От статуса се установяват субфебрилитет, бледа кожа и видими лигавици, BMI 36 kg/m², ритмична сърдечна дейност с глухи сърдечни тонове, АН 180/90 mm Hg. Крайниците са с масивни отоци, обхващащи подбедрици и бедра. Хиперпигментация и дистрофични промени на лявата подбедрица, долавят се отслабени, но симетрични периферни артериални пулсации.

От лабораторните изследвания при първичния прием (табл. 1) се вижда, че пациентката е с данни за разгърнат нефротичен синдром, влошена бъбречна функция и анемичен синдром.

Таблица 1. Лабораторни показатели при първичен и вторичен прием

Показател	Прием 1	Прием 2	Референтни стойности
СУЕ	98	30	22 mm/h
Еритроцити	3,61	3,52	4,4-5,9 g/l
Хемоглобин	106	102	135-180 x10 ¹² /L
Левкоцити	8,8	2,01	4,5-10,5 x10 ⁹ /L
Тромбоцити	223	99	120-360 x10 ⁹ /L
Урея	20,5	17,7	3,2-9,5 mmol/l
Креатинин	187	167	74-110 mcml/l
Общ белтък	50	48,2	60-83 g/l
Албумин	23	26,4	35-53 g/l
Общ холестерол	5,76	4,29	3,4 -5,2 mmol/l
Триглицериди	2,32	2,95	< 1,70 mmol/l
ASAT, ALAT, gGT, AP	Без отклонения	Повишени	
Уринен седимент	масово Ер*, 8-10 Левко**	10-15 Ер, 1-2 Левко	
Количество белтък в 24 ч урина	11,1 g/24 h Д = 2000 ml	0,9 g/24 h Д = 2000 ml	< 0,20 g/24h
D-Dimer	–	0,51; 0,38; 2,57	0-0,55 mg/l
		ПВ 12,8 s; INR 1,14; LDH 1728	

*Ер – еритроцити, **Левко – левкоцити

От първоначалните имунологични изследвания (таблица 2) се установяват високи титри за антинуклеарни антитела (АНА),

антидвойноверижна ДНК, антикардиолипинови антитела (АКЛА) от клас IgG, ниски нива на С4.

Таблица 2. Имунологични показатели при първичен и вторичен прием

Тест (метод)	Резултат		Референтни граници		
	Прием 1	Прием 2	Негативен	Граничен	Позитивен
Антинуклеарни антитела (IFA – Нер-2 клетки):	> 1:1280	1:160	< 1:80		
Анти-дв ДНК антитела (ELISA)	> 200	5,4	< 20 U/ml		> 20 U/ml
Анти-RNP антитела (ELISA)	–	1,7	< 15 U/ml	15-25 U/ml	> 25 U/ml
Анти-Sm протеин (ELISA)	–	1,7	< 15 U/ml	15-25 U/ml	> 25 U/ml
Антинеутрофилни цитоплазмени антитела MPO/PR3 (screen)	–	0,1	< 1,0		≥ 1 U/ml
АКЛА IgG (ELISA)	22,7	6,0	< 10 U/ml		> 10 U/ml
АКЛА IgM (ELISA)	1.5	0,7	< 7 U/ml		> 7 U/ml
Комплемент g/l (нефелометрия)					
С3	1,232	0,347		0,75-1,65	
С4	< 0,173	0,098		0,20-0,65	

IFA – индиректна имуофлуоресценция; ELISA – ензимосвързан имуносорбентен анализ; MPO – миелопероксидаза; PR3 – протеиназа 3; RNP – рибонуклеопротеин; Sm – Смит антиген

Диагностичнотерапевтичният план включваше извършването на пункционна бъбречна биопсия (ПББ). Нейното осъществяване обаче беше невъзможно, тъй като на фона на провежданата профилактична терапия с нискомолекулен хепарин пациентката разви тромбоза на а. poplitea dextra и се наложи включване на антикоагулант в терапевтични дози.

Съгласно критериите на Американската асоциация по ревматология (ARA) от 1994 година пациентката изпълняваше 6 от 11 критерия – три клинични, един лабораторен и два имунологични (табл. 3), което беше прието като напълно достатъчно за поставяне на диагностичната системен лупус еритематозус с белези на вторичен антифосфолипиден синдром. При болната се започна активно патогенетично лечение поради клинично-лабораторни данни за активност на системното заболяване, независимо от липсата на хистологично верифициран клас на лупусния нефрит. Проведе се пулсово лечение с Метилпреднизолон 500 mg и.в. за 3 дни, последвано от конвенционални дози Метилпреднизолон 1 mg/kg/дневно, както и пулс с Циклофосфамид 600 mg и.в., Фраксипарин 2 x 0,6 ml с. к. дневно и симптоматична терапия.

Таблица 3. Диагностични критерии по ARA

- Малариен обрив – еритем с форма на пеперуда
- Дискоиден обрив
- Фоточувствителност
- Орална афтоза
- Недеформиращ полиартрит
- Серозит (плеврит, перикардит)
- Бъбречно засягане – протеинурия > 0,5 g/ден и/или цилиндрурия
- Неврологични нарушения – засягане на ЦНС – психоза
- Нарушение в кръвните редове – анемия, левкопения, лимфопения или тромбоцитопения
- Антинуклеарни антитела (ANA = FANA)
- Имуни феномени: анти-дв-ДНК, анти-SM, позитивиране на LE-клетъчния феномен, антифосфолипидни антитела

Подчертани са критериите, които се откриват при първия прием в описания клиничен случай

Месец по-късно, при повторен прием за провеждане на ПББ, персистират болките в десния долен крайник при движение и прогресираща адинамия. Налице са афтозен стоматит, неболезнени диарични изхождания, без примеси на кръв, с фебрилитет до 39° C. Статусът е без значима динамика в сравнение с предходната хоспитализация. Измереното артериално налягане е 140/80 mm Hg.

Разликата в лабораторните показатели при първата и втората хоспитализация са представени в табл. 1. Установява се редукция на протеинурията до 0,9 g/24 h и стабилизиране на бъбречна функция. За първи път се регистрира панцитопения с агранулоцитоза. Проведена беше консултация с хематолог за диагностициране на състоянието. От направеното диференциално броене на периферна кръв (J – 3%; St – 14%, Sg – 55%, Mo – 5%, Eo – 2%; Ly – 12%) не се установиха атипични клетки. Стерналната пункция доказва нормоцелуларен костен мозък с компенсаторно разрастване на еритробластната редица. Съпоставени с данните за повишени стойности на лактатдехидрогеназа (табл. 1) се прие заключението, че се касае за тласък на автоимунния процес. Проведено беше изследване за антиеритроцитни антитела, което беше негативно. Останалите имунологични изследвания (табл. 2) показаха спад в титрите на изследваните антитела, но беше отчетена по-изразена хипокомplementемия с едновременно засягане на C3 и C4 фракциите. Хемокултурите останаха без растеж. Културалното изследване на фецес не доказа шига токсин (STX) продуциращи микроорганизми.

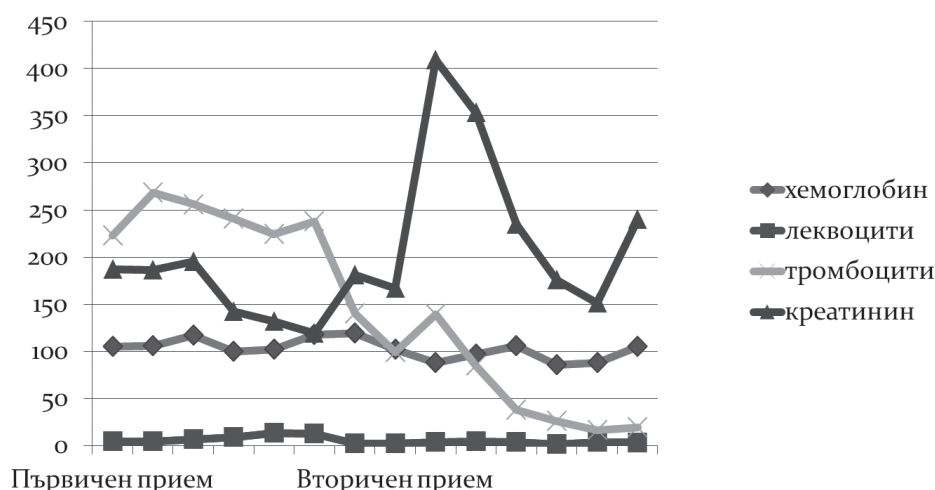
Лечението обхващаше четири етапа. Първоначално до изясняване на причините за фебрилитета и панцитопенията се провеждаха три пулса с Метилпреднизолон 1000 mg и конвенционални дози. Включени бяха Ванкомицин, Хинолон и противогъбна терапия. По-късно хинолонът беше заменен с Тиенам. На втори етап беше обсъдено провеждането на плазмафереза, която не беше извършена поради септичното състояние

на пациентката и изразената панцитопения. Приложен бе и интравенозен имуноглобулин (Имуновенин-интакт 5%) – три пулса по 20 ампули. Динамиката на хематологичните показатели и на креатинина е представена на фиг. 4. Пикът на креатинина (фиг. 4) е свързан по всяка вероятност с приложението на хинолона, по типа на остра тубулна увреда, като след спиране на антибиотика серумните нива на този показател се редуцираха до изходните. Въпреки преливането на тромбоцитна маса се наблюдаваше прогресивен спад на тромбоцитния брой, трайно нисък левкоцитен брой и персистиращ тежък анемичен синдром, налагащ няколкократно хемотрансфузии. След проведената консултация с хематолог бяха препоръчани и приложени 5 пулса с Циклофосфамид 200 mg и.в. през ден. На този фон хематологичните показатели останаха без промяна. Появиха се екхимози въпреки трансфузиите на прясно замразена плазма. Разгърна се картина на прогресираща дихателна недостатъчност, налагаща включване на СРАР с високо налягане. С клинична картина на остър респираторен дистрес-синдром бе регистриран exitus letalis. Аутопсия не беше проведена по религиозни причини.

ОБСЪЖДАНЕ

В диференциалнодиагностичен план се обсъдиха сепсис, дисеминирана интравазална коагулопатия, тромботична тромбоцитопенична пурпура, класически и атипичен хемолитико-уремичен синдром, КАСП. Пациентката проявяваше припокриващи се клинични признаци на всички изброени състояния (табл. 4).

Поради неколkokратните негативни хемокултури, липсата на специфични грануляции в костния мозък и неповлияването от антибиотично лечение, наличието на бактериален или гъбичен сепсис се прие за малко вероятна причина за остро настъпилото влошаване на състоянието. Липсата на шига токсин (STX) продуциращи *E. coli* в културално изследване, въпреки че не изключва напълно вероятността за типичен ХУС, прави малко вероятна тази диагноза. При атипичен ХУС (аХУС) обичайно липсва диария, наблюдават се шизоцити, налице е комплементна активация на алтернативния път, при което нивата на C4 са запазени за разлика от разгледания случай, където има засягане на класическия път и нивата на C3 и C4 са ниски. Ограничение на представения случай е липсата на възможност за определяне на антифактор Н антитела – характерен маркер на аХУС. Из-



Фиг. 4. Динамика на лабораторните показатели при представения случай

Таблица 4. Диференциална диагноза между катастрофален антифосфолипиден синдром, ДИК, атипичен хемолитикоуремичен синдром, тромбоцитопенична пурпура (ТТР), сепсис и клинични симптоми в разгледания клиничен случай (оградени)

	Катастрофален АФС	ДИК	а ХУС	ТТР	СЕПСИС
Температура	+/-	+/-	+/-	+/-	++
Треска/невр. симпт.	+/-	+/-	+/-	+	+
Некръвава диария	-	-	++	+/-	+/-
Хеморагии	-	++	-	-	+/-
Тромбоцитопения	++	++	++	+++	+
Хемолит. анемия	+/-	+/-	+++	+++	+/-
Шизоцити	+/-	+/-	+++		-
Удължаване на аРТТ	+/-	+	-	-	-
Фибриноген деград. продукти	+/-	+	+/-	+/-	+/-
Хемокултура	-	-	-	-	+
Антифосфолипидни антитела	++	+/-	-	+/-	-
ADAMTS-13 (неизсл.)	-	-	-	++	-

следването не се осъществява в рутинната клинична практика. Също така рутинно не се определя активност на ADAMTS13 и антитела срещу тази металлопротеиназа за изключване съответно на вродена и придобита форма на тромботична тромбоцитопения. Установените от нас АКЛА от клас IgG, липсата на шизоцити и неврологично засягане, както и включването на класическия път с изчерпване на C3 и C4, ни накарва да интерпретираме състоянието като агресивна хематологична изява на системен лупус с катастрофален антифосфолипиден синдром и вторична дисеминирана интравазална коагулопатия.

Подобни на представения от нас случай са редки и представляват диагностичен проблем в световен мащаб, поради което се провеждат мултицентрови проучвания.

Тъй като в световен мащаб смъртността е висока на фона на стандартното лечение, напоследък се търсят нови терапевтични подходи. При рефрактерни случаи се дискутира приложението на хидроксихлороквин, ритуксимаб, екулизумаб, сиролimus, дефибротид и др. (12). Засега обаче КАФС остава диагностичен и най-вече терапевтичен проблем, който представлява предизвикателство пред съвременната медицина.

Библиография

1. Aguiar CL, Erkan D. Catastrophic antiphospholipid syndrome: how to diagnose a rare but highly fatal disease. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2013; 5(6):305-14.
2. Asherson RA, et al. Disseminated intravascular coagulation in catastrophic antiphospholipid syndrome: clinical and haematological characteristics of 23 patients. Ann Rheum Dis, 2005; 64(6):943-6.

3. Asherson RA, Pierangeli SS, Cervera R. Is there a microangiopathic antiphospholipid syndrome? *Ann Rheum Dis* 2007; 66(4):429-32.
4. Espinosa G et al. Morbidity and mortality in the catastrophic antiphospholipid syndrome: pathophysiology, causes of death, and prognostic factors. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34(3):290-4.
5. Espinosa G et al. The lung in the antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*, 2002; 61(3):195-8.
6. Hill GS, Nochy D. Antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. *J Am Soc Nephrol*, 2007; 18(9):2461-4.
7. Miyakis S et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4(2):295-306.
8. Noris M, Mescia F, Remuzzi G. STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation. *Nat Rev Nephrol*, 2012; 8(11):622-33.
9. Rodríguez-Pintó I, Moitinho M, Santacreu I, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome (CAPS): Descriptive analysis of 500 patients from the International CAPS Registry. *Autoimmun Rev*, 2016; 15(12):1120-1124.
10. Samarkos M, Asherson RA, Loizou S. The clinical significance of IgA antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol*, 2001; 28(4):694-7.
11. Scully M, Hunt BJ, Benjamin S, et al. Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. *Br J Haematol*, 2012; 158(3):323-35.
12. Unlu O, Erkan D. Catastrophic Antiphospholipid Syndrome: Candidate Therapies for a Potentially Lethal Disease. *Annu Rev Med*, 2017; 68:287-296.

Адрес за кореспонденция:

Д-р Мария Христова
Клиника по нефрология
УМБАЛ „Александровска“
Катедра по вътрешни болести
Медицински университет
ул. „Св. Г. Софийски“ № 1
1431 София
e-mail: bulgaria_neo@yahoo.co.uk

Address for correspondence:

Maria Hristova, MD
Clinic of Nephrology
University Hospital “Aleksandrovska”
Department of Internal Medicine
Medical University
1 Sv. G. Sofiyski St.
Bg – 1431 Sofia
e-mail: bulgaria_neo@yahoo.co.uk

ИМУНОЛОГИЧНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ РЕВМАТОИДЕН АРТРИТ

Р. Шумналиева¹, Цв. Великова², Д. Качакова³, Е. Иванова-Тодорова²,
К. Тумангелова-Юзеир², Д. Кюркчиев², С. Монов¹

¹Клиника по ревматология, Катедра по вътрешни болести, Медицински университет – София

²Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“,
Медицински университет – София

³Център по молекулна медицина, Катедра по Медицинска химия и биохимия,
Медицински университет – София

Резюме. Ревматоидният артрит (RA) е автоимунно заболяване, възникващо в резултат на взаимодействие на генетични и епигенетични фактори с фактори на околната среда. Оценката на болестната активност и мониторирането ѝ в хода на терапията при болните от RA се базира на неспецифични показатели на системно възпаление, поради което случаите със субклинично синовиално възпаление и ниска болестна активност често остават недооценени. Това поражда необходимостта от идентифициране на биомаркери, които директно отразяват степента и активността на синовиалното възпаление и са лесно приложими в ежедневната клинична практика.

Ключови думи: ревматоиден артрит, синовиално възпаление, биомаркери

IMMUNOLOGICAL BIOMARKERS IN RHEUMATOID ARTHRITIS

R. Shumnalieva¹, Ts. Velikova², D. Kachakova³, E. Ivanova-Todorova²,
K. Toumangelova-Yuzeir², D. Kyurkchiev², S. Monov¹

¹Clinic of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Medical University – Sofia

²Laboratory of Clinical Immunology, University Hospital „Sv. Ivan Rilski“, Medical University – Sofia

³Molecular Medicine Center, Department of Medical Chemistry and Biochemistry,
Medical University – Sofia

Abstract. Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease that is considered to be developed as a result of interactions between genetic and epigenetic factors and environmental factors. The assessment of the disease activity in patients with RA and its monitoring during the therapeutic course are based on the use of not specific measurement of the systemic inflammation, which leads to underestimation of cases with subclinical synovial inflammation and low disease activity. This raises the need of identifying biomarkers which directly reflect the synovial inflammation and are easily used in the daily clinical practice.

Key words: rheumatoid arthritis, synovial inflammation, biomarkers

ВЪВЕДЕНИЕ

Ревматоидният артрит (rheumatoid arthritis – RA) е автоимунно, хронично възпалително, системно заболяване, с водеща клинична проява симетричен, ерозивен артрит, ангажиращ периферните стави. Болестта е разпространена във всички климато-географски зони и засяга от 0,5 до 1% от населението на

Земята. Среща се два до три пъти по-често при женския пол, като честотата ѝ нараства с напредване на възрастта (32, 45).

Етиологията на RA не е напълно изяснена. Предполага се, че болестният процес се отключва при взаимодействието между генетични и епигенетични фактори с фактори на околната среда, в това число инфекции,

тютюнопушене и др. Патоморфологично болестта се характеризира с възпаление и хиперплазия на синовиалната мембрана, разрастване на грануляционна тъкан и ерозивни и деструктивни промени в хрущяла и подлежащата кост (32).

Подробно се проучват патогенетичните промени, които настъпват в засегнатите ставни структури, основно под влияние на фибробластоподобните синовиоцити (фиг. 1). При активирането си те отделят цитокини и медиатори, които участват във възникването и поддържането на възпалителната реакция като интерлевкин (interleukin – IL) 6, тумор-некротизиращ фактор-алфа (tumor necrotizing factor alfa – TNF- α), IL-1 β . Установена е и повишена секреция на ангиогенни фактори, отговорни за синовиалната неоваскуларизация, както и на фактори, стимулиращи хрущялната и костната резорбция, като RANK лиганд (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand – RANKL). Последният индуцира диференциацията и активацията на остеокластите (32). Блокирането на проинфламаторните цитокини овладява активността на болестта (3, 39, 47, 52, 78).

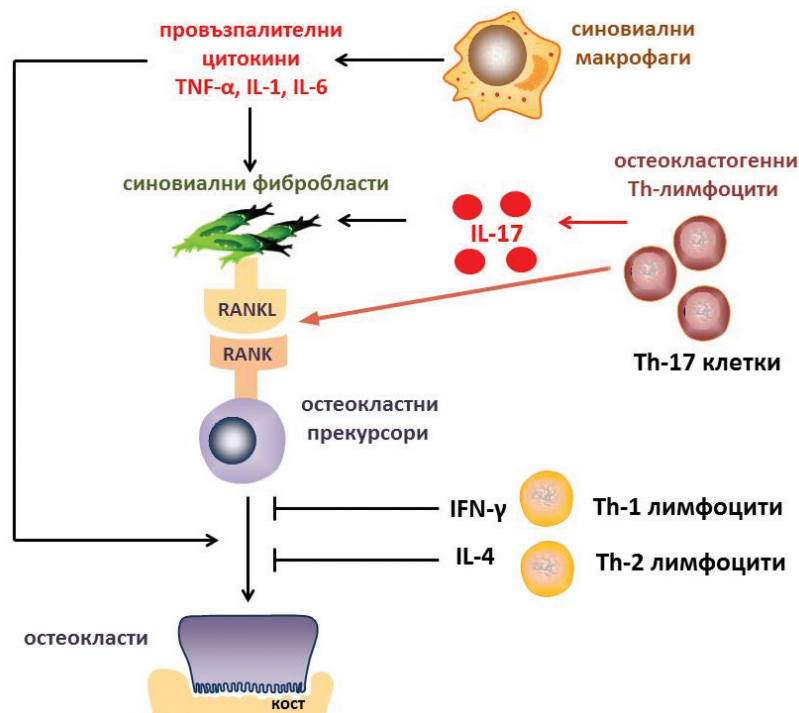
Диагностичният процес при RA изисква правилно интерпретиране на клиничната картина, резултатите от лабораторните и инструменталните изследвания. Критериите на Американската колегия по ревматология (American College of Rheumatology – ACR) от 1987 г., както и новите класификационни критерии за ранен RA на ACR и Европейската лига за борба с ревматизма (European League against Rheumatism – EULAR) определят насоките за клинична, лабораторна и инструментална оценка при подозиране на RA (2, 8, 54). Поставянето на диагнозата рано в хода на болестния процес, както и ранното започване на симптоматична и патогенетична терапия със синтетични и биологични болестопроменящи антиревматични средства (БПАРС) е от основно значение за предотвратяване на ставните деформации и запазване на функцията на опорно-двигателния апарат (67, 79).

В хода на терапевтичната програма и проследяването на болните важно място заема мониторирането на терапевтичния отговор чрез използване на показатели за оценка на болестната активност, като Disease Activity Index 28 (DAS28) (46).

Прогнозата на RA се определя от болестната активност, ставното и извънставното ангажиране, както и отговора към терапията с БПАРС.

БИОМАРКЕРИ В РЕВМАТОЛОГИЧНАТА ПРАКТИКА

Биомаркерите са биологични показатели за оценка на нормалните и патологичните процеси, необходимостта от специфично лечение и отговора от приложената терапия. Необходимо условие даден показател да се използва като биомаркер, е той да има висока чувствителност и специфичност. Като биомаркери могат да се използват лабораторни (генетич-



Фиг. 1. Подлежащи патогенетични механизми при RA

ни, епигенетични, протеомни, метаболитни, хистологични, цитоморфологични) и клинични показатели.

Биомаркерите могат да бъдат както с прогностична, така и с предиктивна стойност. Първите оценяват риска за заболяване и биологичната прогресия, а вторите – избора на терапевтичен подход и ефекта от терапия (5). С диагностична стойност при RA се изследват специфичните автоантитела срещу циклични цитрулинирани пептиди – aCCP (anti-cyclic citrullinated peptides antibodies) (7). Като високочувствителни, но неспецифични лабораторни показатели за оценка на възпалителната или имунологичната активност широко се използват маркери като скорост на утаяване на еритроцитите (СУЕ), С-реактивен протеин (CRP), нива на комплемента и неговите фракции и др. (7). Необходимо е търсенето на биомаркер, който отразява и измерва степента и тежестта на ставното засягане при RA, който има практическа полза в клиничната практика за оценка на болните с различна болестна активност и за прогнозиране хода на болестния процес (33).

Неутрофилни маркери на възпаление – калпротектин

Калпротектинът е описан от M. Fagerhol и съавт. през 1979 г. като хетеродимерен белтък, съставен от два малки анионни протеина (MRP8 и MRP14), принадлежащи към фамилията на калций-свързващите белтъци (27, 56). Калпротектинът представлява до 60% от протеините в цитозола на неутрофилите. Открити са ниски концентрации и при моноцити и активирани макрофаги, но такива липсват в тромбоцити и лимфоцити (28).

Калпротектин се експресира на повърхността на клетките или във вътрешността на сквамозния епител на мукозата и кожата. Бактериостатичният и фунгистатичният му ефект се свързва с предотвратяване проникването на бактериални агенти (37, 56). Епителните клетъчни линии, които постоянно експресират калпротектин, са по-малко възприемчиви към инвазия на патогени като *Listeria* и някои видове *Salmonella* (55).

Определянето на фекален калпротектин отразява индиректно активацията на гранулоцити (23, 37) и техния инфлукс в чревния лумен (59). Доказана е силна позитивна корелация между него и фекалната екскреция на маркирани със ^{111}In неутрофили, което доказва, че повишените нива на фекалния калпротектин отразяват неутрофилното възпаление в червата (30, 31).

Увеличен фекален калпротектин се установява при пациенти с болест на Крон и улцерозен колит (71, 74-77), с колоректален карцином (69), дивертикулозна болест (74, 77), при болни, провеждащи терапия с нестероидни противовъзпалителни средства (75), цъолиакия (19), кистична фиброза, бактериална инфекция, некротизиращ ентероколит, при недоносени (26), както и при ревматични заболявания – RA, спондилоартропатии, системен лупус еритематозус, псориаатичен артрит, остеоартроза и др. (29). При последните са установени и завишени серумни или плазмени нива на калпротектин, както и корелацията им с показатели на болестната активност, което показва възможността за използване на калпротектин в клиничната практика за диагностика, мониториране и прогнозиране на клиничния ход на дадена болест (9, 10, 11, 15, 34).

При хроничните възпалителни ставни заболявания са доказани възпалителни промени в чревната лигавица при около 30-60% от болните. Те могат да се дължи както на основното ревматично заболяване, така и на хроничната употреба на кортикостероидни препарати (29). Освен в лумена на червата при наличие на интестинално възпаление, калпротектин специфично се секретира и локално, в местата на ставно възпаление. При възпалително активиране на ендотела се натрупват левкоцити, които експресират калпротектин в подлежащия слой на възпалената синовиална тъкан и го секретират в синовиалната течност (70).

При RA е описана корелация между повишената системна и локална експресия на калпротектин. Най-висока е експресията му в новосформираната грануляционна

тъкан и местата на инвазията ѝ в ставния хрущял (34).

Нивата на калпротектин на системно и локално ниво корелират с индексите за оценка на болестна активност при RA, с клинични и лабораторни показатели – брой оточни и брой болезнени стави, индекс на Richie за болка, CRP, СУЕ, както и със структурните увреди при RA (16, 34, 35, 41). Н. Hammer и съавт. (2008) проследяват значението на нивата на калпротектин при болни от RA за десетгодишен период. Те установяват, че по-високите нива на калпротектин в синовиална течност и тъкан при поставяне на диагнозата RA се асоциират с по-тежки клинични и рентгенографски белези в края на периода. Тъй като калпротектинът се отделя от активираните неутрофили по време на активно възпаление, получените резултати са биологично обясними.

Използването на калпротектин за оценка на синовиалното възпаление и ставната увреда в процеса на проследяване на болните има предимството, че той не се повлиява от провежданата биологична терапия с медикаменти, насочени срещу TNF- α , IL-1 β , IL-6 (33).

Th17 субпопулация лимфоцити при RA

Th17-лимфоцитната субпопулация обхваща група клетки, които секретират цитокина IL-17. Те са част от семейството на CD4⁺ Т-хелперните клетки (Т-helpers – Th) клетки – основни регулатори на имунните отговори при възпалителните болести. През 1986 г. Т. Mosmann и съавт. представят концепцията за различните видове Th клетки, базираща се на цитокиновата им продукция (фиг. 2) (53). Според тях Th лимфоцити са две основни субпопулации – Th1 и Th2. Th1-лимфоцитите активират макрофагите и са високоефективни в борбата с вътреклетъчни патогени. Функцията им се свързва с действието на IL-12 и интерферон-гама (interferon-gamma – IFN- γ) (38). Th2-лимфоцити се диференцират под въздействието на IL-4 и отговарят за продукцията на антитела и обезвреждането на извънклетъчните организми (14, 50, 68). Описана и проучена е една „нова“ субпопулация от CD4⁺ Th-лимфоцити, наречени Th17 клетки, които секретират ос-

новно IL-17. Диференциацията на Th17 клетките се осъществява под въздействието на специфични цитокини – комбинация от TGF β 1 и IL-6, и транскрипционни фактори – ROR γ t, ROR α и STAT3, докато IL-23 е важен за поддържане на фенотипа и патогенетичната им активност (53).

Th17 клетките секретират множество цитокини: освен основния IL-17A (IL-17), още IL-17F, IL-22, IL-6 и TNF- α (12, 13). Семейството IL-17 цитокини е представено от голяма гама цитокини – IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) и IL-17F (44). Човешкият IL-17A е гликопротеин с молекулно тегло 20 kDa. Неговата аминокиселинна последователност е близка до тази на мишия IL-17, който е идентифициран като антиген 8 – асоцииран с Т-цитотоксичните клетки (51). Повечето автори съобщават за секреция на IL-17 само от Т-лимфоцити, предимно паметови CD45RO⁺ клетки (61), но в последните години е доказано, че моноцити и макрофаги могат да секретират IL-17F. IL-17 е плеотропен цитокин, който медира тъканното възпаление чрез индуциране на проинфламаторни цитокини, хемокини, растежни фактори (като IL-6, TNF- α , GM-CSF, LIF) и адхезионни молекули (15). Същевременно IL-17 води до усилване на проинфламаторните отговори на цитокините IL-1 β и TNF- α (42).

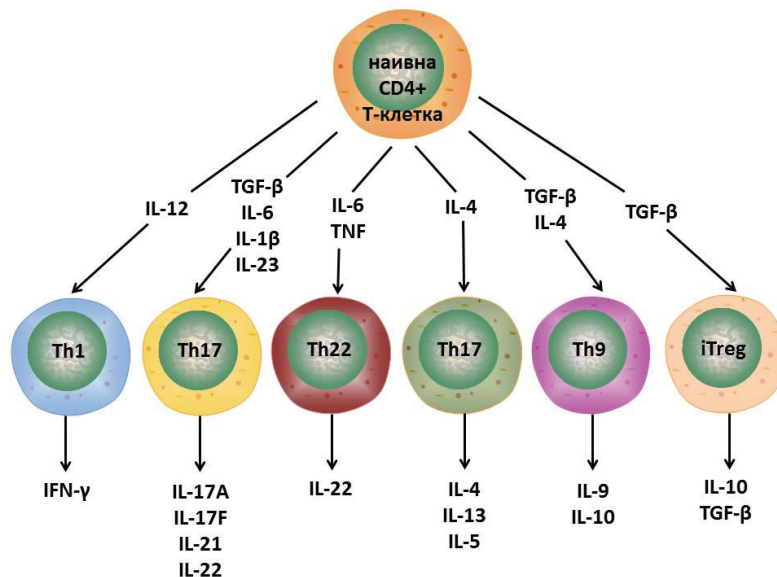
Физиологичната функция на Th17 клетките се изразява в защитата на организма от инфекциозни агенти като гъби и екстрацелуларни бактерии чрез активация на макрофаги и неутрофили (49). Патогени, които индуцират Th17 отговори, са основно от грам-положителни бактерии: *Propionibacterium acnes*, и от грам-отрицателни – *Citrobacter rodentium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacteroides species*, *Borrelia species*, *Mycobacterium tuberculosis*, както и някои видове гъби като *Candida albicans* (40). Тъй като рецепторът за IL-17 е широко разпространен върху различни видове клетки, се счита, че цитокините от семейството на IL-17 са потенциални медиатори на възпалителните отговори в различни тъкани. Th17 клетките играят критична роля в патогенезата на редица аутоимунни болести, като

RA, системен лупус еритематозус, псориаичен артрит, аутоимунни възпалителни чревни заболявания, H. pylori-асоцииран гастрит, експериментален аутоимунен енцефалит, мултиплена склероза, бронхиална астма и други (24, 25, 36, 58, 64, 66, 71, 72).

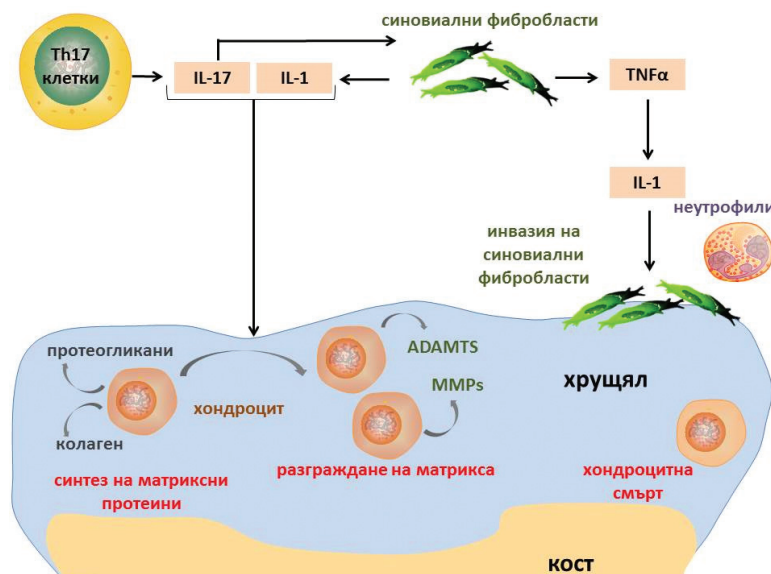
Според една от основните хипотези за етиопатогенезата на RA именно инфекциозен причинител или негови пептиди, попаднали в ставите, могат да индуцират аутоимунния процес при тази болест. Хронифицирането на възпалителния процес

при RA може да се дължи на неконтролируемо активиране на Th17 лимфоцитите и привличане на неутрофилите. Незабавното активиране на каскадата IL-23/IL-17, в която IL-23 поддържа Th17 лимфоцитите, води до привличане на неутрофили, които отделят кислородни радикали и други възпалителни медиатори, насочени срещу микробната инвазия (фиг. 3).

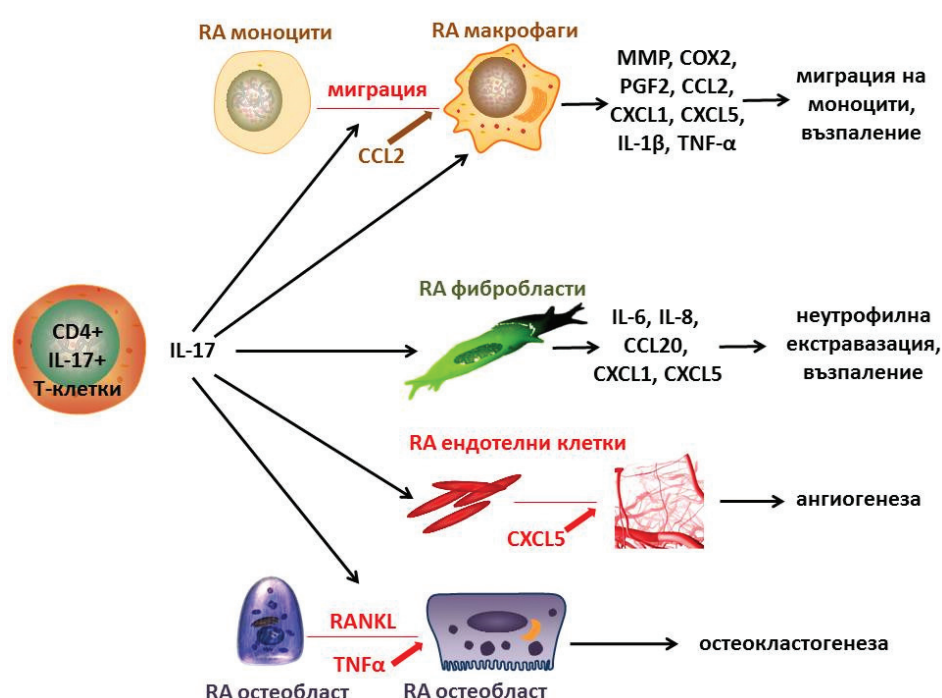
Th17 и IL-17 играят важна комплексна роля в патогенезата на RA и възникването на ерозивните ставните промени (фиг. 4).



Фиг. 2. Th-лимфоцитни субпопулации (модифицирана по D.C. Newcomb, *Current Opinion in Immunology*, 2013)



Фиг. 3. Участие на калпротектин и IL-17 в ставното увреждане при RA (модифицирана по I. McInnes, G. Schett. *Nature review immunology*, 2007)



Фиг. 4. Роля на Th17 и IL-17 във възникването на ставните промени при RA (източник: *oticonline.org*, модифицирана)

IL-17 повлиява различни клетки. Той стимулира миграцията на моноцитите от периферната кръв към възпалените стави, където те се диференцират в макрофаги. Макрофагите и фибробластите в синовиалната тъкан, активирани от IL-17, продуцират голямо количество проинфламаторни цитокини. От една страна, те медиират и поддържат възпалението, а от друга, привличат неутрофилите. Самите неутрофили играят важна роля във възпалителната реакция чрез секретирание на калпротектин. IL-17A стимулира неоангиогенезата във възпалените стави. Това поддържа възпалението чрез доставяне на нутриенти и кислород към тъканите, от една страна, както и чрез струпването на нови възпалителни клетки, от друга. IL-17A играе също роля в костната деструкция при RA чрез стимулиране продукцията на RANKL и синергично действие към TNF- α . В. Миланова и съавт. (2014) проучват възпалителния и деструктивния потенциал на неутрофилите при RA при зимозан-индуцирани миши модели на артрит. Те установяват, че неутрофилите повишават процесите на костна и хрущялна деструкция на ставите чрез експресия

на RANKL и повишена продукция на IL-17A (73). Разработването на нови терапевтични агенти – моноклонални антитела, насочени срещу IL-17A, дава възможност теоретичните познания, натрупани за ролята на IL-17 в патогенезата на RA, да бъдат използвани и за практически цели (43, 65).

Витамин D, Th17 лимфоцити и калпротектин при RA

Биологичните функции на витамин D (vit. D) се изразяват основно в поддържане на калциево-фосфорната хомеостаза и костния метаболизъм. Ензимът

25(OH)D-1 α -хидроксилаза, отговорен за синтез на активния метаболит на vit. D, е описан в клетки на имунната система, вкл. макрофаги и дендритни клетки. Синтезираният от тях vit. D действа по автокринен/паракринен механизъм. Рецептори за vit. D са описани върху активирани Т- и В-лимфоцити, моноцити, антиген-представящи клетки и други клетки на имунната система (1).

Витамин D има разнообразни цитокин-модулиращи ефекти, като повлиява функцията на редица клетки на имунната система (6, 18). Резултатите от изследвания при миши и човешки клетъчни модели доказват, че vit. D потиска антигенното представяне, Т-клетъчната пролиферация, Th1-клетъчните отговори и Th17-клетъчната функция (62). Витамин D забавя диференциацията на В-клетките в плазматични клетки и потиска продукцията на имуноглобулини, което има особено значение в автоимунна възпалителна реакция (20, 62). Дефицитът на vit. D играе важна роля в патогенезата на редица автоимунни болести, като захарен диабет тип I и мултипла склероза (4).

В последните години ниските нива на vit. D се свързват и с риск от възникване на RA (48). Дефицитът на vit. D се асоциира с IL-17-медирано възпаление на ставите и регулацията на ангиогенезата при RA (57). Рецептори за vit. D са открити в макрофаги, хондроцити и синовиоцити в ревматоидната синовиална мембрана, както и на местата на костните ерозии при болни от RA. Такива не са открити в тъкани от контролната група изследвани лица (63).

Налице е и корелация между дефицитът на vit. D и болестната активност при RA (21, 22, 60). Експериментален модел с мишки с колаген-индуциран артрит демонстрира, че заместителното лечение с vit. D предпазва от развитие и прогресия на този вид артрит (17).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Калпротектин, Th17 лимфоцитите, IL-17 и vit. D участват в основни патогенетични процеси и модулирането на имунния отговор при

RA. Калпротектинът е стабилен и устойчив биомаркер за болестна активност, тъй като директно отразява локалното възпаление – в ревматоидната синовиална мембрана и синовиалната течност, сравнен с конвенционалните острофазови показатели – CRP и СУЕ, и нивата му не се повлияват от провежданата патогенетична терапия. Съществува корелация между системните и локалните нива на калпротектин и болестната активност при RA, което има значение при проследяване на пациентите и мониториране на отговора към терапията. Определянето на нивата на калпротектин в периферна кръв и синовиална течност има за цел откриване на потенциален стабилен и устойчив системен и локален биомаркер за активността, тежестта и прогнозата на RA.

Обзорът е във връзка с проект № 315/15.01.2015 г., Договор № 61/2015 г., финансиран от МУ – София.

Библиография

1. Adams J, Hewison M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2008; 4(2):80-90.
2. Aletaha D, Neogi T, Silman A. Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*, 2010; 62(9):2569-2581.
3. Anderson JK, Zimmerman L, Caplan L, Michaud K. Measures of rheumatoid arthritis disease activity: Patient (PtGA) and Provider (PrGA) Global Assessment of Disease Activity, Disease Activity Score (DAS) and Disease Activity Score with 28-Joint Counts (DAS28), Simplified Disease Activity Index (SDAI), Clinical Disease Activity Index (CDAI), Patient Activity Score (PAS) and Patient Activity Score-II (PASII), Routine Assessment of Patient Index Data (RAPID), Rheumatoid Arthritis Disease Activity Index (RADAI) and Rheumatoid Arthritis Disease Activity Index-5 (RADAI-5), Chronic Arthritis Systemic Index (CASI), Patient-Based Disease Activity Score With ESR (PDAS1) and Patient-Based Disease Activity Score without ESR (PDAS2), and Mean Overall Index for Rheumatoid Arthritis (MOI-RA). *Arthritis Care Res*, 2011; 63(Suppl. 11):S14-36.
4. Arnsen Y, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis*, 2007; 66(9):1137-1142.
5. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*, 2001; 69(3):89-95.
6. Baeke F, Takiishi T, Korf H, et al. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol*, 2010; 10(4):482-496.
7. Bas S, Genevay S, Meyer O, Gabay C. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, IgM and IgA rheumatoid factors in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2003; 42(5):677-680.
8. Bernelot-Moens H, Laar Mvd, Korst Lvd. Comparison of the sensitivity and specificity of the 1958 and 1987 criteria for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 1992; 19(2):198-203.
9. Berntzen HB, Fagerhol MK, Ostensen M, et al. The L1 protein as a new indicator of inflammatory activity in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 1991; 18 (1):133-138.
10. Berntzen HB, Munthe E, Fagerhol MK. A longitudinal study of the leukocyte protein L1 as an indicator of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 1989; 16(11):1416-1420.
11. Berntzen HB, Olmez U, Fagerhol MK, Munthe E. The leukocyte protein L1 in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol*, 1991; 20 (2):74-82.
12. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006; 441 (7090):235-238.
13. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*, 2007; 19(6):652-657.
14. Bottomly K. A functional dichotomy in CD4+ T lymphocytes. *Immunol Today*, 1988; 9(9):268-274.

15. Brun JG, Haga HJ, Boe E, et al. Calprotectin in patients with rheumatoid arthritis: relation to clinical and laboratory variables of disease activity. *J Rheumat*, 1992; 19(6):859-862.
16. Brun JG, Jonsson R, Haga HJ. Measurement of plasma calprotectin as an indicator of arthritis and disease activity in patients with inflammatory rheumatic diseases. *J Rheumatol*, 1994; 21(4):733-738.
17. Cantorna M, Hayes CE, Luca D. 1,25 dihydroxyvitamin D prevents and ameliorates symptoms in two experimental models of human arthritis. *J Nutr Biochem*, 1998; 128 (68-72).
18. Cantorna MT, Mahon BD. D-hormone and the immune system. *J Rheumatol*, 2005; 76(Suppl.):11-20.
19. Carroccio A, Iacono G, Cottone M, et al. Diagnostic accuracy of fecal calprotectin assay in distinguishing organic causes of chronic diarrhea from irritable bowel syndrome: a prospective study in adults and children. *Clin Chem*, 2003; 49 (6 Pt 1):861-867.
20. Chen S, Sims G, Chen X, et al. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol*, 2007; 179:1634-1647.
21. Cutolo M. Vitamin D and autoimmune rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2009; 48(3):210-212.
22. Cutolo M, Otsa K, Laas K, et al. Circannual vitamin d serum levels and disease activity in rheumatoid arthritis: Northern versus Southern Europe. *Clin Exp Rheumatol*, 2006; 24(6):702-704.
23. Desai D, Faubion WA, Sandborn WJ. Review article: biological activity markers in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2007; 25(3):247-255.
24. Eastaff-Leung N. Regulatory T Cells, Th17 Effector Cells and Cytokine Microenvironment in Inflammatory Bowel Disease and Coeliac Disease. Adelaide: School of Medical Sciences, University of Adelaide; 2009.
25. Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, et al. Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol*, 2010; 30(1):80-89.
26. Fagerberg UL, Loof L, Myrdal U, et al. Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2005; 40(4):450-455.
27. Fagerhol MK. Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? *Clin Mol Pathol*, 1996; 49(2):M74-79.
28. Fagerhol MK. Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality. *Lancet*, 2000; 356 (9244):1783-1784.
29. Fries W. Inflammatory bowel disease-associated spondyloarthropathies. *World J Gastroenterol*, 2009; 15(20):2441-2442.
30. Gaya DR, Lyon TD, Duncan A, Neilly JB, Han S, Howell J, et al. Faecal calprotectin in the assessment of Crohn's disease activity. *Qjm*, 2005; 98(6):435-441.
31. Gaya DR, Mackenzie JF. Faecal calprotectin: a bright future for assessing disease activity in Crohn's disease. *Qjm*, 2002; 95(9):557-558.
32. Gibofsky A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Managed Care*, 2012; 18(13 Suppl):S295-302.
33. Hammer HB, Haavardsholm EA, Kvien TK. Calprotectin (a major leucocyte protein) is associated with the levels of anti-CCP and rheumatoid factor in a longitudinal study of patients with very early rheumatoid arthritis. *Scand J Rheum*, 2008; 37(3):179-182.
34. Hammer HB, Kvien TK, Glennas A, Melby K. A longitudinal study of calprotectin as an inflammatory marker in patients with reactive arthritis. *Clin Exp Rheum*, 1995; 13(1):59-64.
35. Hammer HB, Odegard S, Fagerhol MK, et al. Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2007; 66(8):1093-1097.
36. Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol*, 2006; 18(3):349-356.
37. Hestvik E, Tumwine JK, Tylleskar T, et al. Faecal calprotectin concentrations in apparently healthy children aged 0-12 years in urban Kampala, Uganda: a community-based survey. *BMC Pediatr*, 2011; 11:9.
38. Hsieh CS. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science (New York, NY)*. 1993; 260(5107):547-549.
39. Hueber AJ, Asquith DL, Miller AM, et al. Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol*, 2010; 184(7):3336-3340.
40. Ivanov, II, Frutos Rde L, Manel N, et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe*, 2008; 4(4):337-349.
41. Kane D, Roth J, Frosch M, et al. Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum*, 2003; 48(6):1676-1685.
42. Katz Y, Nadiv O, Rapoport MJ, Loos M. IL-17 regulates gene expression and protein synthesis of the complement system, C3 and factor B, in skin fibroblasts. *Clin Exp Immunol*, 2000; 120(1):22-29.
43. Kellner H. Targeting interleukin-17 in patients with active rheumatoid arthritis: rationale and clinical potential. *Ther Adv Musculoskel Dis*, 2013; 5 (3):141-152.
44. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Ann Rev Immunol*, 2009; 27:485-517.
45. MacGregor A, Silman A. Rheumatoid arthritis: Classification and Epidemiology. 2nd ed. 1998.
46. Makinen H, Kaarela K, Huhtala H, et al. Do the 2010 ACR/EULAR or ACR 1987 classification criteria predict erosive disease in early arthritis? *Ann Rheum Dis*, 2013; 72 (5):745-747.
47. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 2011; 365 (23):2205-2219.
48. Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, et al. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum*, 2004; 50(1):72-77.
49. Milner JD. IL-17 producing cells in host defense and atopy. *Curr Opin Immunol*, 2011; 23 (6):784-788.
50. Min B, Prout M, Hu-Li J, et al. Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *J Exp Med*, 2004; 200(4):507-517.
51. Miossec P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes and infection*. Institut Pasteur. 2009; 11(5):625-630.
52. Mor A, Abramson S, Pillinger M. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clin Immunol*, 2005; 115 (2):118-128.

53. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profile of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 1986; (136):2348-2357.
54. Mueller RB, Schiff M, Kaegi T, et al. The new 2010 ACR/EULAR criteria as predictor of clinical and radiographic response in patients with early arthritis. *Clin Rheumatol*, 2015; 34(1):51-59.
55. Naughton PJ, Clohessy PA, Grant G, et al. Faecal calprotectin: non-invasive marker of gastrointestinal inflammation in *Salmonella* infected rats. *Biochem Soc Transact*, 1996; 24(2):308S.
56. Nisapakultorn K, Ross KF, Herzberg MC. Calprotectin expression in vitro by oral epithelial cells confers resistance to infection by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 2001; 69(7):4242-4247.
57. Ranganathan P, Khalatbari S, Yalavarthi S, et al. Vitamin D deficiency, interleukin 17, and vascular function in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 2013; 40(9):1529-1534.
58. Romagnani S. Human Th17 cells. *Arthr Res Ther*, 2008; 10(2):206.
59. Roseth AG, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N. Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion*, 1997; 58(2):176-180.
60. Rossini M, Maddali Bongi S, La Montagna G, et al. Vitamin D deficiency in rheumatoid arthritis: prevalence, determinants and associations with disease activity and disability. *Arthr Res Ther*, 2010; 12(6):R216.
61. Shin MS, Lee N, Kang I. Effector T-cell subsets in systemic lupus erythematosus: update focusing on Th17 cells. *Curr Opin Rheumatol*, 2011; 23(5):444-448.
62. Tang J, Zhou R, Luger D, et al. Calcitriol suppresses antiretinal autoimmunity through inhibitory effects on the Th17 effector response. *J Immunol*, 2009; 182(8):4624-4632.
63. Tetlow LC, Smith SJ, Mawer EB, Woolley DE. Vitamin D receptors in the rheumatoid lesion: expression by chondrocytes, macrophages, and synoviocytes. *Ann Rheum Dis*, 1999; 58(2):118-121.
64. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol*, 2008; 172(1):146-155.
65. van den Berg WB, Miossec P. IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Nature Rev*, 2009; 5(10):549-553.
66. Velikova T, Karakolev I, Spassova Z, et al. Upregulation of mRNA Cytokine Expression Profile in Inflamed Colonic Mucosa of Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Comptes rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*. 2013; 66(12):1769-1776.
67. Vermeer M, Kuper HH, Hoekstra M, et al. Implementation of a treat-to-target strategy in very early rheumatoid arthritis: results of the Dutch Rheumatoid Arthritis Monitoring remission induction cohort study. *Arthr Rheum*, 2011; 63(10):2865-2872.
68. Voehringer D, Reese TA, Huang X, et al. Type 2 immunity is controlled by IL-4/IL-13 expression in hematopoietic non-eosinophil cells of the innate immune system. *J Exp Med*, 2006; 203(6):1435-1446.
69. von Roon AC, Karamountzos L, Purkayastha S, et al. Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy. *Am J Gastroenterol*, 2007; 102(4):803-813.
70. Youssef P, Roth J, Frosch M, et al. Expression of myeloid related proteins (MRP) 8 and 14 and the MRP8/14 heterodimer in rheumatoid arthritis synovial membrane. *J Rheumatol*, 1999; 26(12):2523-2528.
71. Великова Ц. Проучване на имунологични параметри, характеризиращи чревното възпаление, с оглед внедряване на нови показатели за диагноза и слеждане на клиничния ход при хроничните възпалителни чревни заболявания. Дис., София, Медицински университет, 2014.
72. Великова Ц, Алтънкова И. Роля на Th17-лимфоцитната субпопулация при възпалителните чревни заболявания. Годишник на БАКИ. 2014; 24-28.
73. Миланова В. Възпалителен и деструктивен потенциал на неутрофилите при артрит. София; 2014.
74. Наков В. Фекален калпротектин – неинвазивен маркер за оценка на чревното възпаление. Дис., София, Медицински университет, 2011.
75. Наков В, Владимирова Б, Шишков М, и др. Фекален калпротектин – неинвазивен маркер за установяване на интестинално възпаление при пациенти, приемащи нестероидни противовъзпалителни средства. БХГЕ, 2012; 1:31-35.
76. Наков В, Шишков М, Пенчев П, и др. Клинично значение на фекалния калпротектин за оценка на възпалителната активност, мониториране на терапията и предсказване на релапсите при пациенти с улцерозен колит. БХГЕ, 2012; 1:25-30.
77. Наков В, Шишков М, Стойнов С, Терзиев И. Фекален калпротектин – маркер за чревното възпаление (пилотно проучване). БХГЕ, 2009; 2:25-29.
78. Шумналиева Р, Коларов З. Патогенетична роля на вируса на Epstein-Barr и на cytomegalovirus за възникване, поддържане и активиране на синовиалната възпалителна реакция при пациенти с ревматоиден артрит. Ревматология, 2011; 2:5-13.
79. Шумналиева Р, Монов С, Коларов З. Съвременен подход за лечение на ревматоиден артрит, Медик Арт, 2014; 6:26-30.

Адрес за кореспонденция:

Р. Шумналиева
Клиника по ревматология
Катедра по вътрешни болести
Медицински университет
ул. Урвич 13
1612 София

Address for correspondence:

R. Shumnalieva
Clinic of Rheumatology
Department of Internal Medicine
Medical University
13 Urvitch st.
Bg – 1612 Sofia

КАКВО НЕ ЗНАЕМ ЗА РОЛЯТА НА ВИТАМИН D И АНДРОГЕНИТЕ В ПРОСТАТНАТА КАНЦЕРОГЕНЕЗА?

Б. Русев, Б. Ц. Галунска

*Катедра по биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика,
Факултет по фармация, МУ – Варна*

Резюме. Простатният карцином е едно от най-често срещаните злокачествени заболявания сред мъжете в напреднала възраст. В България той е на трето място по честота. Клетките на простатната жлеза съдържат рецептори за витамин D (VDR) и за андрогени (AR). Това показва, че както витамин D, така и андрогените играят важна роля за нормалната функция на простатната жлеза. Витамин D, посредством VDR рецептора, активира гени, свързани с апоптоза, антипролиферация и диференциране на простатната жлеза, което предполага неговото антипролиферативно и противотуморно действие. Промени в нивата на витамин D, както и полиморфизми, свързани с VDR рецептора, могат да бъдат причина за появата и развитието на простатен карцином. Андрогените, чрез AR рецептор, също активират гени, свързани с пролиферацията и растежа на простатната жлеза. При простатен карцином настъпват промени в метаболизма на андрогените, което е един от факторите за развитие на простатен карцином. В настоящата обзорна статия са разгледани съвременните схващания за молекулните механизми, чрез които витамин D и андрогените участват в иницирането и прогресията на простатния карцином.

Ключови думи: простатен карцином, витамин D, андрогени

WHAT WE DON'T KNOW ABOUT THE ROLE OF VITAMIN D AND ANDROGENS IN PROSTATE CARCINOGENESIS?

B. Roussev, B. Ts. Galunska

*Department of Biochemistry, Molecular Medicine and Nutrigenomics,
Faculty of Pharmacy, Medical University – Varna*

Abstract. Prostate cancer is one of the most frequent cancer diseases among aged men. It represents the third most common malignancy in Bulgaria. The cells of prostate gland contain receptors for vitamin D (VDR) and androgens (AR). It indicates that vitamin D and androgens play an important role regarding the normal functioning of prostate gland. Through VDR receptor, vitamin D activates genes related with apoptosis, anti-proliferation and differentiation processes in prostate gland, suggesting its anti-proliferative and antitumor action. Changes in vitamin D levels and polymorphisms regarding VDR receptor may be a cause of the onset and development of prostate cancer. Through AR receptor, androgens also activate genes related with growth and proliferation of prostate gland. In prostate cancer, changes in androgen metabolism start to be present, which are one of the factors for the development of prostate cancer. In this review article discussed are the modern concepts of the molecular mechanisms, through which vitamin D and androgens participate in the initiation and progression of prostate cancer.

Key words: prostate carcinoma, vitamin D, androgens

УЧАСТИЕ НА ВИТАМИН D В ПРОСТАТНАТА КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Превенцията на простатния карцином е предизвикателство както за изследващите молекулните механизми на канцерогенезата,

така и за клиницистите, занимаващи се с диагностиката и лечението на едно от най-разпространените неопластични заболявания сред мъжете. Потенциалното противотуморно действие на витамин D при простатен

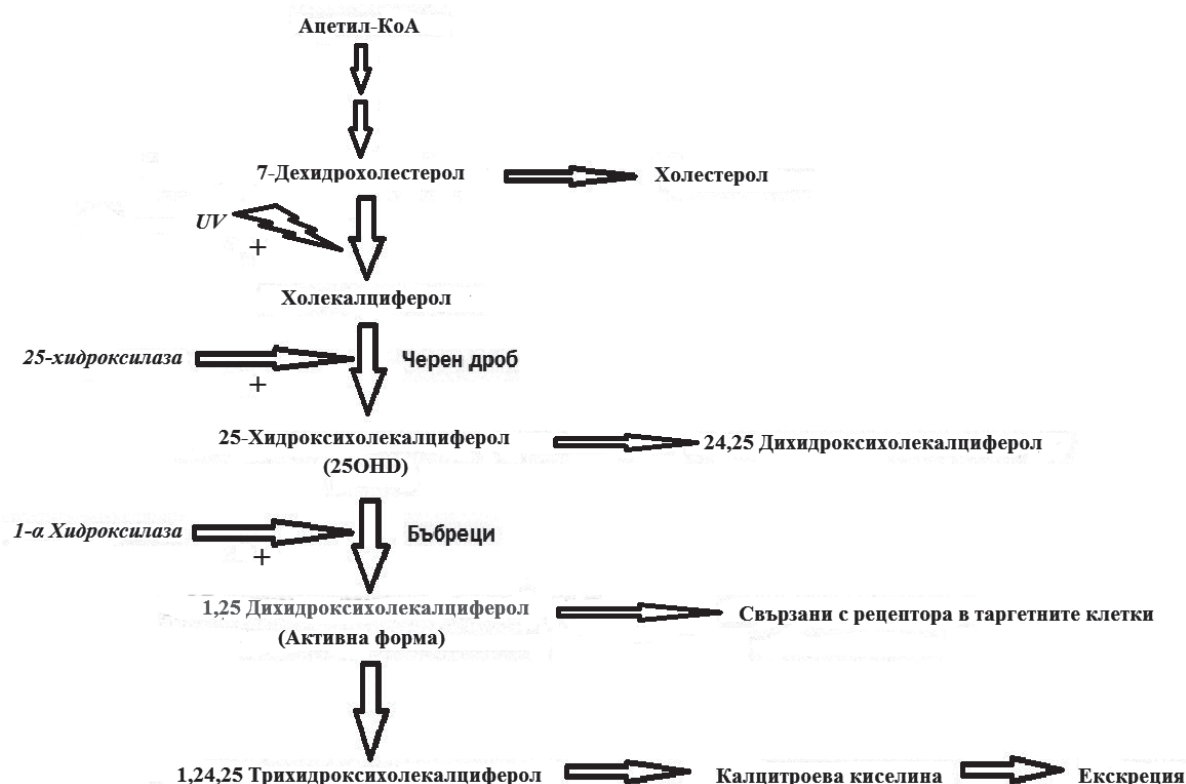
карцином се опосредства от неговите метаболити, от ензимите, участващи в синтеза на тези метаболити, от витамин D-рецептора, взаимодействащ с тези метаболити, както и от гените, чиято експресия се регулира от активната форма на витамин D.

Биологични ефекти на витамин D

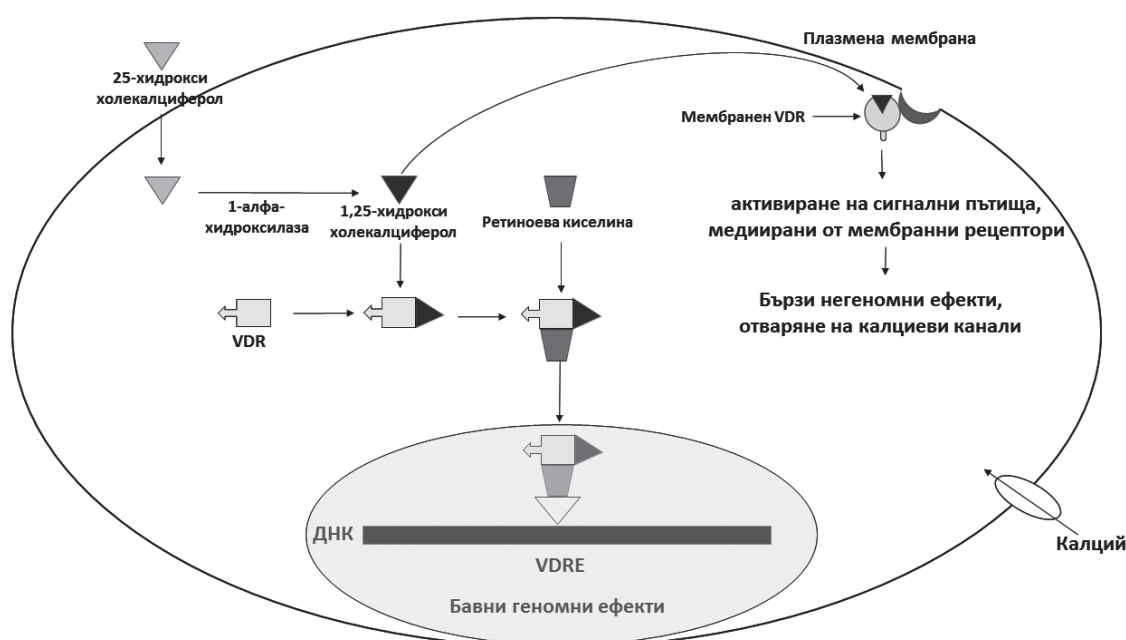
Витамин D е липофилно съединение, принадлежащо към групата на секостероли. От поне пет форми, открити в природата, две са физиологично активни – ергокалциферол (витамин D₂) и холекалциферол (витамин D₃). Счита се, че физиологично по-активният изомер е витамин D₃ (11). Ергокалциферол се синтезира от растителния стерол ергостерол и се открива основно в растения и гъби. Холекалциферол се синтезира от холестерол в гръбначни организми и се съдържа в храни от животински произход като риба, рибено масло, яйца, месо и мляко (1). В човешкия организъм витамин D се набавя главно чрез ендегенен биосинтез от холестерол в кожата

под действие на UV лъчите и в по-малка степен с храната.

Самият витамин D е неактивен стероид, който се превръща в активен хормон след двуетапно хидроксилиране в черния дроб до 25-хидроксихолекалциферол (25OHD) и в бъбреците до 1,25-дихидроксихолекалциферол (калцитриол). Съществена роля в този процес играе бъбречната 1-алфа-хидроксилаза, която, от една страна, регулира получаването на калцитриол, а от друга, е под хормонален контрол и участва в поддържането на калциево-фосфорната хомеостаза (фиг. 1А) (26). Биологичните си ефекти калцитриол осъществява основно чрез вътреклетъчен рецептор (vitamin D receptor, VDR), регулиращ експресията на над 300 гена и отговорен за бавните геномни ефекти на калцитриол (23). Мембранният VDR е отговорен за бързите негеномни ефекти на калцитриол, свързани с активиране на сигнални пътища и отваряне на йонни канали (6, 13) (фиг. 1Б).



Фиг. 1 А



Фиг. 1 Б

Некалцитропни биологични ефекти на витамин D

В последните години се установи, че редица екстрааренални тъкани експресират 1-алфа-хидроксилаза и VDR (63). За разлика от бъбречния изоензим екстраареналната 1-алфа-хидроксилаза не се регулира от калцитропни хормони и активността ѝ зависи единствено от концентрацията на 25OHD, което детерминира некалциемичните ефекти на калцитриола, включващи имуномодулаторни, антипролиферативни и проапоптозни действия (50).

Установено е, че 1-алфа-хидроксилаза и VDR се експресират и в простатна жлеза, което предопределя възможността витамин D и неговият активен хормон да ѝ въздействат (34). Счита се, че антипролиферативното си действие витамин D осъществява чрез повишена експресия на инхибитори на циклин-зависимите кинази p21 и p27, водещи до арест на клетъчния цикъл (2). Локалните концентрации на 25OHD са основен фактор, който повлиява продукцията на калцитриол в простатна жлеза. Установено е, че нивата на 25OHD в простатата са близки до тези в серума, но

нивата на калцитриол и 24,25(OH)₂D са значително по-високи, отколкото в серума. Това предполага активен метаболизъм на 25OHD в простатна жлеза (31). Според същите автори при физиологични концентрации 25OHD е активният хормон, регулиращ растеж и пролиферация в простатна жлеза, а 1,25(OH)₂D₃ става активен при фармакологични концентрации. Това предполага, че дефицитът на 25OHD играе важна роля в развитието и прогресията на простатния карцином.

В последните години интензивно се проучва ролята на полиморфизмите на VDR в патогенезата на различни неопластични заболявания. Има данни, че полиморфизмите във VDR гена са свързани с риска от простатен карцином (19). Основните полиморфизми, които са обект на най-интензивни проучвания, са Fok I, Taq1, Apa1 и Bsm1 (27). Fok I е полиморфизъм, откриващ се във втория екзон на VDR гена. При него се измества рамката на четене на гена на VDR, което води до снижаване на ефективността на VDR. Значима връзка между Fok I полиморфизма и риска от простатен карцином е установена само за кавказката раса (24). Taq1 е полиморфизъм, намиращ

се в деветия екзон на VDR гена. Установено е, че хомозиготни индивиди с генотип TT на Taq1 полиморфизъм имат по-ниски нива на калцитриол и са с увеличен риск от развитие на простатен карцином (27). Полиморфизмите Apa1 и Bsm1 не променят нуклеотидната последователност, но се предполага, че влияят върху генната експресия на VDR (27). Друго възможно участие на витамин D в канцерогенезата в различни тъкани, включително и в простатна жлеза, документирано в редица проучвания, е стимулиране експресията на онкопротеина GF11, водеща до намалена активност на екстрацелуларната 1-алфа-хидроксилаза и намален синтез на калцитриол (7).

Витамин D-статус

Друга причина за намалена активност на 1-алфа-хидроксилазата е дефицитът на 25OHD, определящ витамин D-статуса на индивида. Напълно активната форма на витамин D, отговорна за неговите биологични ефекти, е 1,25(OH)₂D (калцитриол). Поради този факт би могло да се заключи, че именно тази форма е идеалният маркер за оценка на витамин D-статуса. На практика обаче калцитриол се оказва неподходящ маркер поради ниската му концентрация в кръвта, кратко време на полуживот и вариации в нивата му поради зависимостта му от плазмените нива на паратхормон, калций и фосфор (16, 40). Установено е, че измежду всички метаболити на витамин D, 25OHD представлява най-подходящият и надежден маркер, отразяващ в най-добра степен наситеността на организма с витамин D и дефиниращ витамин D-статуса на организма. Той има дълго време на полуживот, плазмените му нива са относително стабилни и добре отразяват клетъчните му нива, които локално в таргетните клетки се превръщат в напълно активния хормон под въздействие на екстрацелуларната 1-алфа-хидроксилаза.

Прието е нива на 25OHD под 25 nmol/L да се обозначават като абсолютен витамин D-дефицит, водещ до развитие на рахит и остео-

малация (47, 55). Плазмени нива между 25 и 75 nmol/L се обозначават като витамин D недостатъчност. От своя страна витамин D-недостатъчността се разделя на две подсъстояния: тежка степен на недостатъчност, с нива на 25OHD между 25 и 50 nmol/L, и лека степен на недостатъчност, с нива на 25OHD между 50 и 75 nmol/L. Плазмени нива между 80 и 200 nmol/L се определят като състояние на насищане. За поддържане на адекватни нива на калций и фосфор за нормална костна обмяна са необходими нива от поне 50 nmol/L, а за некалциемичните ефекти на витамин D и превенция на рака са необходими концентрации в диапазона 75-200 nmol/L. При това, според някои автори, колкото по-високи са нивата на витамин D, толкова по-изразени са неговите протективни функции (18, 64). Според последните препоръки на Ендокринологичното дружество за оптимални се приемат нива на 25OHD над 75 nmol/L (15).

Витамин D и простатна канцерогенеза

Много изследвания в *in vitro* и *in vivo* модели потвърждават хипотезата, че калцитриол и други агонисти на VDR индуцират забавянето на растежа, програмираната клетъчна смърт и/или спомагат диференциацията на ракови клетки. Установено е, че простатните неопластични клетки експресират както рецептора за витамин D, така и ензимите, участващи в метаболизма му (5, 33). В експериментални модели с клетъчни култури от простатни ракови клетки е установено, че добавянето на калцитриол инхибира растежа им по андроген-зависим и андроген-независим механизъм (65).

Докато в експериментални модели с клетъчни култури и опитни животни се установява по един категоричен начин противотуморният ефект на витамин D, не така категорично са потвърдени ефектите на витамин D по отношение на превенцията, възникването и/или прогресията на простатния карцином при хора. Интензивните проучвания в тази област предоставят все още твърде дискуссионни резултати. Повечето епидемиологични проучва-

ния установяват дефицит и различна по степен недостатъчност на витамин D със стойности на 25OHD под 50 nmol/L, корелиращи с повишения риск от простатен карцином (39). Изследване от последните години установява тежко изразена витамин D недостатъчност, характеризираща се с двукратно по-ниски средни стойности на 25OHD при мъже с простатен карцином спрямо контролна група здрави мъже (29.25 ± 2.65 nmol/L спрямо 60.75 ± 3.85 nmol/L) (22). Витамин D-недостатъчност или дефицит се доказва както при рецидивирание на заболяването, така и при локализиран простатен карцином (56). Пилотно проучване сред български пациенти с простатен карцином доказва субоптимален (под 75 nmol/L) витамин D-статус при 71.7 % от изследваната популация (9). В групата пациенти с простатен карцином процентът на индивидите със субоптимални нива е по-голям в сравнение с този в групата с доброкачествена хиперплазия на простатната жлеза (80.0% спрямо 64.3%). Това различие се запазва и при стратифициране на недостатъчността: при тежката степен на недостатъчност съотношението е 24.0% спрямо 17.9% респективно за пациентите с простатен карцином и с доброкачествена хиперплазия на простатата, а при умерената степен на недостатъчност то е 56.0% спрямо 46.4%. Редица изследвания са в подкрепа на факта, че по-ниски серумни концентрации на 25OHD се обвързват с по-агресивни форми на простатен карцином (9, 10). Много данни сочат, че нивата на 25OHD в организма са в обратна корелационна връзка с появата и/или прогресията на простатния карцином (17, 52).

Би могло да се твърди, че ниските циркулиращи нива на 25OHD не могат да осигурят достатъчно субстрат за простатната 1-алфа-хидроксилаза, с което да се подсигури локалният и адекватен в количествено отношение биосинтез на активната форма на витамин D. В подкрепа на тази идея е и наблюдението, че неопластични простатни клетки се характеризират с намалена активност на 1-алфа-хидроксилазата в сравнение с нормални

епителни клетки от простатна жлеза (4). Комбинацията от тези два фактора води до драматично понижена възможност за синтез на активната форма на витамин D в простатните карциномни клетки, което предопределя и невъзможността за проява на протективните функции на витамин D като диференциращ и антипролиферативен агент.

В литературата се срещат и изследвания, които не доказват статистически значими различия по отношение на витамин D-статуса между пациентите с простатен карцином и съответните им здрави контроли (53, 61). Възможно обяснение е, че понякога се сравняват данни, без да се съобразяват сезонните вариации или възрастовите и расовите различия между пациентите (3).

Съществуват и проучвания, които посочват позитивна корелационна връзка както между ниски, така и между високи нива на 25OHD с риска от възникване на простатен карцином (21, 54). Едно възможно обяснение на този така наречен U-виден риск е приблизително еднакво ниското количество на калцитриол в простатните клетки както при ниските, така и при много високите серумни нива на 25OHD. Предполага се, че ниските нива на 25OHD са свързани с дефицита на субстрат за 1-алфа-хидроксилазата, а високите водят до тъканна резистентност чрез авторегулационни процеси на повишена експресия на 24-хидроксилазата, водеща до получаване на неактивните метаболити 1,24(OH)₂D и 24,25OHD.

Вероятно противоречията в резултатите от епидемиологичните изследвания се дължат на факта, че засега се проследяват само плазмените нива на метаболитите на витамин D, които понякога се различават значимо от локалните им нива в засегнатата тъкан. Трябва да се отчита и фактът, че при някои напреднали ракови заболявания витамин D метаболитът и VDR експресията в съответната засегната тъкан са така дерегулирани и променени, че витамин D, дори и наличен в достатъчни количества в циркулацията, не е в състояние да прояви антитуморните си ефекти.

АНДРОГЕНИ И ПРОСТАТЕН КАРЦИНОМ

Разбирането на андрогенния метаболизъм е от съществено значение при търсенето на нови терапевтични таргети при простатен карцином. С прогресиране на заболяването настъпват промени в метаболизма на андрогените поради променена експресия на стероидогенни ензими, мутации в отделните компоненти от метаболизма и транспорта на андрогените. Тези промени могат да бъдат причина както за прогресия и повишена агресивност на туморния процес, така и за резистентност към хормоналната терапия.

Андрогените представляват група стероидни хормони, към които принадлежат тестостерон, андростендион и дехидроепиандростерон (DHEA). Сходно на витамин D, те са липофилни съединения, синтезират се от холестерол и осъществяват разнообразни биологични функции. Физиологичните действия на андрогените в простатната жлеза са свързани със стимулиране на пролиферацията и растежа на простатните епителни клетки (58). Редица проучвания сочат, че дисбаланс в андрогенния метаболизъм играе важна роля за отключване и развитие на простатен карцином. Счита се, че балансът между андроген-индуцираната клетъчна пролиферация и апоптоза е ключов фактор за поддържане на нормален растеж на простатната жлеза. Промяна в този баланс (повишен биосинтез, намалена инактивация на андрогени) може да бъде причина за повишена клетъчна пролиферация, растеж и развитие на простатен карцином (48).

Метаболизъм на андрогени в простатна жлеза

Тестостеронът е главният циркулиращ андроген при човека. Той се продуцира главно в тестисите от синтезираните от холестерол в адреналната жлеза андростендион, DHEA и DHEA-сулфат под действие на ензима 17,20-лиаза. При човек адреналната жлеза и тестисите са единствените органи, експресирани достатъчно активна 17,20-лиаза, която продуцира андрогени в сравнително високи концентрации в циркулацията. В тестиси

андростендион и DHEA под действие на ензимите 3 β -хидроксистероид дехидрогеназа (3 β -HSD) и 17 β -хидроксистероид дехидрогеназа (17 β -HSD) се метаболизират съответно до андростендион и до по-активния андроген тестостерон. В прицелните тъкани, вкл. и в простатата, тестостеронът под действие на 5 α -редуктаза (5 α -R) се превръща в по-активния дихидротестостерон (DHT), основен андроген в простатната жлеза (49).

Доказано е, че простатната жлеза експресира 7 изоформи на ензима 17 β -HSD, 2 изоформи на 5 α -R и 3 изоформи на ензима 3 β -HSD и осъществява биосинтез на тестостерон и DHT от циркулиращите в достатъчно високи концентрации адренални андрогени андростендион и DHEA по два метаболитни пътя, по-активен от които е 5 α -андростендионовият път (фиг. 2A).

Редица проучвания установяват, че при простатен карцином настъпват съществени промени в метаболизма на андрогените в простатната жлеза. Активира се *de novo* биосинтезът на андрогени от холестерол, поради увеличена генна експресия на ензима 17,20-лиаза (3), повишено интракринно превръщане на андростендион и DHEA в по-активните тестостерон и DHT (8), намалено локално инактивиране на андрогените, трансформация на 17 β -HSD от оксидативна в редуктивна изоформа, водеща до допълнително получаване на тестостерон. Всички тези промени водят до повишаване на нивата на андрогените в простатната жлеза, и активиране на процеси на растеж и пролиферация.

Молекулни механизми на действие

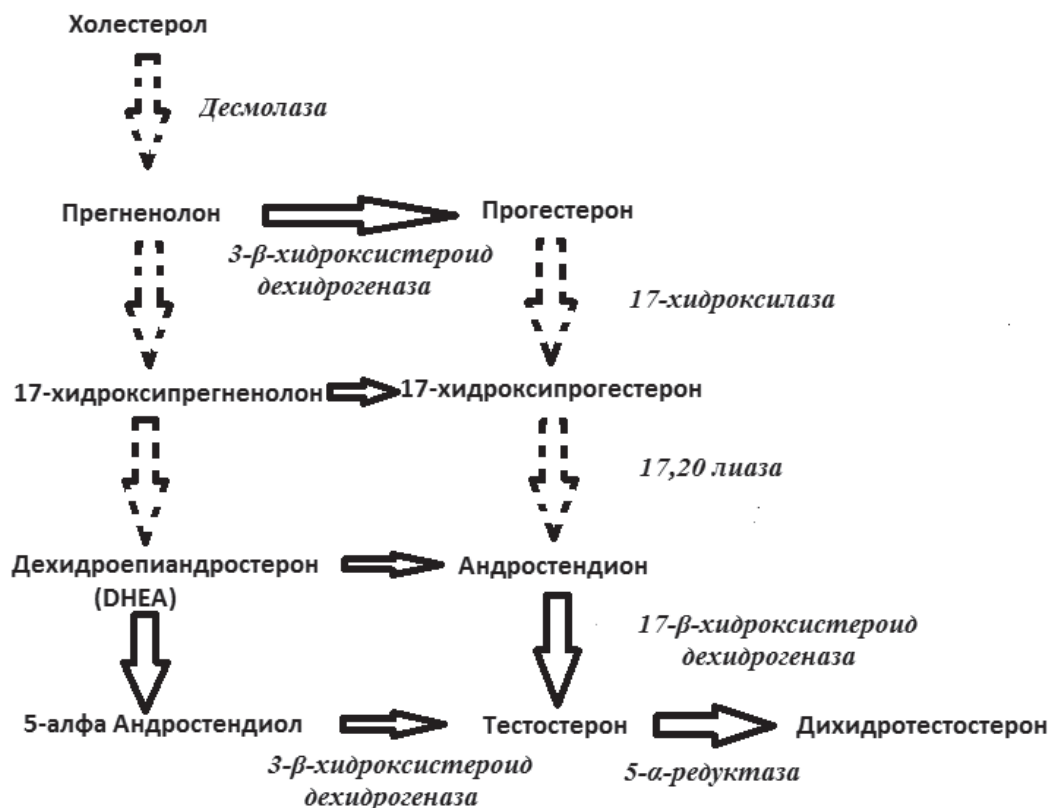
Транспортът на андрогените са медира от транспортни белтъци, а техните клетъчни ефекти от андрогенния рецептор (AR). Те се транспортират до тъканите по кръвен път, свързани основно с глобулин, свързващ половите хормони (SHBG) и в по-малка степен с албумин. Около 2% от андрогените са в свободна биологично активна форма, която се свързва с AR, експресирани в таргетните клетки. С най-висок афинитет с AR се

свързва DHT, следван от тестостерон (35). Андростендион и DHEA се свързват с AR значително по-слабо (12).

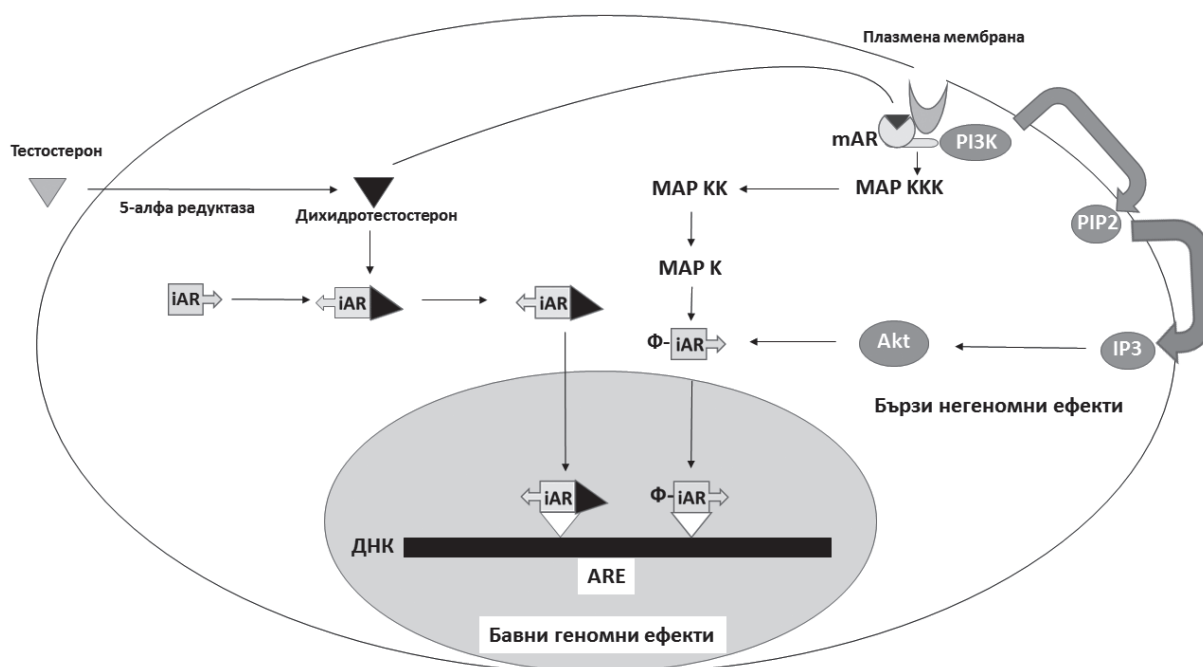
Андрогенният рецептор може да бъде вътреклетъчно (iAR) или мембранно (mAR) локализиран. Вътреклетъчният AR пряко повлиява генната експресия (геномен ефект). Андрогенът се свързва с iAR в цитозола, образува се комплекс андроген-iAR, който се транспортира в ядрото, свързва се към хормон-чувствителни елементи от ДНК и повлиява експресията на специфични гени (41, 59). Мембранният mAR може да индуцира както бавни геномни, така и бързи негеномни клетъчни отговори, медирирани от G-белтъци и множество сигнални каскади, като Rho-зависима протеинкиназа, MAP киназни каскади, P38 митоген-активирана

протеинкиназа, фосфоинозитиден сигнален път с участието на фосфатидилинозитол-3-киназа (29, 42, 51). Активирането на тези сигнални пътища е свързано с отваряне на калциеви канали и увеличаване на вътреклетъчния калций, реорганизация на цитоскелета, клетъчна пролиферация и апоптоза (43) (фиг. 2Б).

Различни проучвания установяват, че причина за отключване и развитие на простатен карцином могат да бъдат полиморфизми в гена на AR. Генът на AR е с дължина над 90 kb и е съставен от 8 екзона, които кодират 4 функционални домена (57). Асоциираните с този ген полиморфизми са CAG и GGN повтарящи се последователности. Тези полиморфизми могат да присъстват с висока честота в ДНК веригата (над 22 пъти за CAG, над



Фиг. 2 А



Фиг. 2 Б

12 за GGN) или да са с ниска честота (под 22 пъти за CAG, под 12 за GGN) (57). Weng et al., 2017, анализират данните от различни проучвания на тези полиморфизми и установяват, че при индивиди с ниска честота на CAG и GGN съществува 1.31-1.38 пъти по-голям риск от рак на простатата в сравнение с тези, при които честотата е висока. Други автори установяват обратнопропорционална зависимост между честотата на CAG и транскрипционната активност на рецептора (62).

Взаимовръзка между андрогени и простатен карцином

Все още не е напълно изяснена връзката между андрогени и простатен карцином. Според „андрогенната хипотеза“, предложена още през 1941 г. от Huggins и Hodges, увеличени нива на тестостерон са предпоставка за рак на простатата. Авторите са констатирани, че при проведена андрогенна супресия на пациенти с това заболяване, те имат подобрене на състоянието. На базата на тази хипотеза андрогенната супресия се използва като един от терапевтичните подходи при пациенти с

простатен карцином. Този подход има ограничено действие и след време видоизменените простатни клетки се превръщат в андроген-независими по отношение на пролиферацията и растежа. Данни от различни проучвания потвърждават „андрогенната хипотеза“ (60).

В последните години се установи, че ниски нива на тестостерон са свързани с увеличен риск от простатен карцином, което лежи в основата на т.нар. хипотеза на „насищане на андрогенния рецептор“ (37). Според нея андрогенният рецептор се насища при концентрации на тестостерон около 8 pmol/L и всяко повишение в нивата на тестостерона над 8 pmol/L не води до значими промени в простата-специфичния антиген (PSA), приет като маркер за пролиферацията на простатната жлеза (36, 38). Тази хипотеза се потвърждава от Shin et al., които установяват по-висок риск от простатен карцином при пациенти с нива на тестостерон под 13,3 pmol/L (46).

Установено е, че нивата на тестостерона имат отношение и към агресивността на туморния процес. Някои изследвания доказват,

че ниски нива на тестостерон корелират с високи стойности на индекса на Gleason и съответно с увеличена агресивност на туморния процес (28). Обратно, други проучвания намират позитивна корелация между нивата на тестостерон и индекса на Gleason (44). При проведеното от нас изследване на пациенти с рак на простатата бяха установени по-ниски нива на тестостерон при пациентите с най-висок индекс на Gleason (45).

Метаанализ, проведен от Klap et al., установява при 40% от случаите обратна корелация, между нивата на андрогените и риска от простатен карцином, при 37,7% положителна взаимовръзка, а при 22,2% липса на взаимовръзка (25).

Витамин D, андрогени, простатен карцином

В последните години нарастват проучванията, търсещи причинно-следствена връзка между нивата на витамин D и андрогенезата. В модел на клетъчни култури от клетки на тестиси е установено, че калцитриол повишава експресията на ензими, участващи в биосинтеза и в метаболизма на андрогени (14). Редица проучвания предполагат, че ефектът на витамин D върху простатни ракови клетки е андроген-зависим. In vitro изследвания показват андроген-зависим инхибиращ ефект на витамин D при простатни ракови клетки. In vivo проучвания върху експериментални животни установяват липса на ефект на витамин D върху растежа на простатата при дефицит на андрогени. Тези данни подкрепят хипотезата, че андрогените са ключов фактор за инхибиращото действие на витамин D върху клетъчния растеж. От друга страна, лонгитудинални проучвания демонстрират позитивна корелация между нивата на 25OHD и продукцията на

андрогени (56). Витамин D индуцира експресията на ензимите CYP3A4 и CYP3A5, които участват в метаболизма и инактивирането на тестостерон и андростендиол в простатни клетки, което предполага регулаторна роля на витамин D в поддържането на нормални нива на андрогени в простатата (32).

Ретроспективно проучване върху 3369 мъже на възраст 40-79 години от 8 европейски държави показва позитивна връзка между витамин D-дефицит и вторичен хипогонадизъм (30). Тези данни дават основание да се предполага, че серумните нива на витамин D са важен фактор в андроген-медираната сигнализация, а взаимодействията между сигналния път на витамин D и този на андрогените играят съществена роля в биологията на простатния карцином. Може да се очаква, че корекция на витамин D-статуса във физиологични граници би могла да бъде допълнителен терапевтичен подход при заболявания, свързани с дефицит на тестостерон, включително и при простатен карцином.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Витамин D и андрогените играят важна роля както за поддържане на нормален метаболизъм в простатната жлеза, така и за предотвратяване на дедиференциацията на простатни ракови клетки в по-агресивен фенотип. Редица проучвания показват, че поддържането на адекватни нива на витамин D и андрогени би потиснало прогресията на простатния карцином, особено при пациенти в ранен стадий на заболяването. Допълнителни клинични проучвания биха изяснили рисковете и ползите от комбинираното им прилагане при пациенти с простатен карцином.

Библиография

1. Герова Д, Галунска Б, Желязкова М, Паскалев Д. Витамин D: Отвън Рубикона на Рахита. Изд. Стено, 2012.
2. Chakraborti CK. Vitamin D as a promising anticancer agent. *Indian J Pharmacol*, 2011; 43(2):113-120.
3. Chang KH, Sharifi N. Prostate cancer – from steroid transformations to clinical translation. *Nature Reviews Urology*, 2012; 9(721-724).
4. Chen TC, Wang L, Whitlatch LW, et al. Prostatic 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase and its implication in prostate cancer. *J Cell Biochem*, 2003; 88(2):315-22.
5. Deeb KK, Luo W, Karpf AR et al. Differential vitamin D 24-hydroxylase/CYP24A1 gene promoter methylation in endothelium from benign and malignant human prostate. *Epigenetics*, 2011; 6(8):994-1000.
6. Doroudi M, Plaisance MC, Boyan BD, et al. Membrane actions of 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ are mediated by Ca $^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II in bone and cartilage cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015; 145:65-74.

7. Dwivedi PP, Anderson PH, Omdahl JL, et al. Identification of growth factor independent-1 (GFI1) as a repressor of 25-hydroxyvitamin D 1-alpha hydroxylase (CYP27B1) gene expression in human prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer*, 2005; 12(2):351-65.
8. Elahe A. Steroid hormone synthetic pathways in prostate cancer. *Transl Androl Urol*, 2013; 2(3):212-227.
9. Galunska B, Gerova D, Kosev P, et al. Serum 25-hydroxy vitamin D levels in Bulgarian patients with prostate cancer: a pilot study. *Clin Lab*, 2015; 61(3-4):329-35.
10. Gilbert R, Metcalfe C, Fraser WD, et al. Associations of Circulating 25-hydroxyvitamin D with prostate cancer diagnosis, stage and grade. *Int J Cancer*, 2012; 131(5):1187-1196.
11. Heaney RP, Recker RR, Grote J, et al. Vitamin D(3) is more potent than vitamin D(2) in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011; 96(3):E447-52.
12. Heinlein CA, Sampson ER, Chang C. Androgens and Androgen Receptor: Mechanisms, Functions, and Clinical Applications Editors: Chawnsang Chang, 2002; 91-138.
13. Hirota Y, Nakagawab K, Mimatsub S, et al. Nongenomic effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 on cartilage formation deduced from comparisons between Cyp27b1 and Vdr knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017; 483(1):29:359-365.
14. Hofer D, Münzker J, Schwetz V, et al. Testicular synthesis and vitamin D action. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014; 99(10):3766-73.
15. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011; 96(7):1911-30.
16. Holick MF. Optimal vitamin D status for the prevention and treatment of osteoporosis. *Drugs Aging*, 2007; 24(12):1017-29
17. Holick MF. Vitamin D and Sunlight: Strategies for Cancer Prevention and Other Health Benefits. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008; 3(5):1548-1554.
18. Hollis BW, Johnson D, Hulsey TC, et al. Vitamin D supplementation during pregnancy: double-blind, randomized clinical trial of safety and effectiveness. *J Bone Miner Res.*, 2011; 26(10):2341-57.
19. Hu J, Qiu Z, Zhang L, Cui F. Kallikrein 3 and vitamin D receptor polymorphisms: potentials environmental risk factors for prostate cancer. *Diagn Pathol*, 2014; 9:84.
20. Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA Cancer J Clin*, 1972; 22(4):232-40.
21. Jackson MD, Tulloch-Reid MK, Lindsay CM, et al. Both serum 25-hydroxyvitamin D and calcium levels may increase the risk of incident prostate cancer in Caribbean men of African ancestry. *Cancer Med*, 2015; 4(6): 925-935.
22. Kambale PR, Haldar D, Kabi BC, Kambale KP. A Study of Vitamin D Levels in Patients of Prostate Cancer. *Intern J Clin Biochem Res*, 2016; 3(2):169-171.
23. Kaneko I, Sabir MS, Dussik CM, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D regulates expression of the tryptophan hydroxylase 2 and leptin genes: implication for behavioral influences of vitamin D. *FASEB J*, 2015 Jun 12. pii: fj.14-269811.
24. Kang S, Zhao Y, Liu J, et al. Association of vitamin D receptor Fok I polymorphism with the risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*, 2016; 7(47):77878-77889.
25. Klap J, Schmid M, Loughlin KR. The relationship between total testosterone levels and prostate cancer: a review of the continuing controversy. *J Urol*, 2015; 193(2):403-13.
26. Kochupillai N. The physiology of vitamin D: current concepts. *Indian J Med Res*, 2008; 127(3):256-62.
27. Köstner K, Denzer N, Müller CS, et al. The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer Res*, 2009; 29(9):3511-36.
28. Lane BR, Stephenson AJ, Magi-Galluzzi C, et al. Low Testosterone and Risk of Biochemical Recurrence and Poorly Differentiated Prostate Cancer at Radical Prostatectomy. *Urology*, 2008; 72(6):1240-1245.
29. Lang F, Alevizopoulos K, Stournaras C. Targeting membrane androgen receptors in tumors. *Expert Opin Ther Targets*, 2013; 17(8):951-63.
30. Lee DM, Tajar A, Pye SR. Association of hypogonadism with vitamin D status: the European Male Ageing Study. *Eur J Endocrinol*, 2012; 166:77-85.
31. Lou YR, Qiao S, Talonpoika R, et al. The role of Vitamin D3 metabolism in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004; 92(4):317-25.
32. Maguire O, Pollock C, Martin P, et al. Regulation of CYP3A4 and CYP3A5 expression and modulation of "intracrine" metabolism of androgens in prostate cells by liganded vitamin D receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 2012; 364(1-2):54-64.
33. Marshall DT, Savage SJ, Garrett-Mayer E, et al. Vitamin D3 supplementation at 4000 international units per day for one year results in a decrease of positive cores at repeat biopsy in subjects with low-risk prostate cancer under active surveillance. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012; 97(7):2315-24.
34. Maund SL, Cramer SD. Prostate Cancer – From Bench to Bedside. Chapter 20: The Role of Vitamin D in the Prevention and Treatment of Prostate Cancer, 2011, Philippe E. Spiess, In Tech, 528 p.
35. Mauvais-Jarvis P. Regulation of androgen receptor and 5 alpha-reductase in the skin of normal and hirsute women. *Clin Endocrinol Metab*, 1986; 15(2):307-17.
36. Morgentaler A, Connors III William P. Testosterone therapy in men with prostate cancer: literature review, clinical experience, and recommendations. *Asian J Androl*, 2015; 17(2):206-211.
37. Morgentaler A, Rhoden EL. Prevalence of prostate cancer among hypogonadal men with prostate-specific antigen levels of 4.0 ng/mL or less. *Urology*, 2006; 68(6):1263-7.
38. Morgentaler A. Goodbye androgen hypothesis, hello saturation model. *Eur Urol*, 2012; 62(5):765-7.

39. Murphy AB, Nyame Y, Martin IK, et al. Vitamin D deficiency predicts prostate biopsy outcomes. Clin Cancer Res, 2014; 20(9):2289-99.
40. Nair S. Vitamin d deficiency and liver disease. Gastroenterol Hepatol (NY), 2010; 6(8):491-3.
41. Nguyen MM, Dincer Z, Wade JR, et al. Cytoplasmic localization of the androgen receptor is independent of calreticulin. Mol Cell Endocrinol, 2009 10; 302(1): 65-72.
42. Papadopoulou N, Charalampopoulos I, Alevizopoulos K et al. Rho/ROCK/actin signaling regulates membrane androgen receptor induced apoptosis in prostate cancer cells. Exp Cell Res, 2008; 314(17):3162-74.
43. Papadopoulou N, Papakonstanti EA, Kallergi G, et al. Membrane androgen receptor activation in prostate and breast tumor cells: molecular signaling and clinical impact. IUBMB Life, 2009; 61(1):56-61.
44. Porcaro AB, Petrozziello A, Ghimenton C, et al. Associations of pretreatment serum total testosterone measurements with pathology-detected Gleason score cancer. Urol Int, 2014; 93(3):269-78.
45. Roussev B, Kosev P, Hinev A, Galunska B. Correlation between serum testosterone, biochemical and clinical markers in prostate cancer patients. J IMAB, 2016; 22(3):1314-1319.
46. Shin B, Hwang E, Im C, et al. Is a decreased serum testosterone level a risk factor for prostate cancer? A cohort study of Korean men. Korean J Urol, 2010; 51(12):819-823.
47. Singh RJ, Taylor RL, Reddy GS, Grebe SK. C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25-hydroxyvitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status. J Clin Endocrinol Metab, 2006; 91(8):3055-61.
48. Soronen P, Laiti M, Törn S et al. Sex steroid hormone metabolism and prostate cancer. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004;92(4):281-6.
49. Srinivasan R, Chaudhry S, Wong E. Sex hormone synthesis, regulation, and function. McMaster Pathophysiology Review 2012-2016.
50. Polek, TC, Weigel NL. Vitamin D and Prostate Cancer. J Androl. 2002, 23(1).
51. Thouverey C, Caverzasio J. Focus on the p38 MAPK signaling pathway in bone development and maintenance. Bonekey Rep, 2015; 4:711.
52. Toner CD, Davis CD, Milner JA. The vitamin D and cancer conundrum: aiming at a moving target. J Am Diet Assoc, 2010; 110(10):1492-500.
53. Trump DL, Chadha KM, Sunga AY, et al. Vitamin D deficiency and insufficiency among patients with prostate cancer. BJU Int, 2009; 104(7): 909-914.
54. Tuohimaa P, Tenkanen J, Honen M et al. Both high and low levels of blood vitamin D are associated with a higher prostate cancer risk: A longitudinal, nested case-control study in the nordic countries. Int. J. Cancer: 2004;108, 104-108.
55. Vieth, R. Effects of Vitamin D on Bone and Natural Selection of Skin Color: How Much Vitamin D Nutrition Are We Talking About? In: Bone Loss and Osteoporosis in Past Populations: an Anthropological Perspective 2003 (Agarwal, S. C. & Stout, S. D. eds.) Kluwer Academic Plenum, pp 135-150.
56. Wang WL, Tenniswood M. Vitamin D, intermediary metabolism and prostate cancer tumor progression. Front Physiol, 2014; 5:183.
57. Weng H, Li S, Huang J, He Z, et al. Androgen receptor gene polymorphisms and risk of prostate cancer: a meta-analysis. Sci Rep, 2017; 7:40554.
58. Wilczynski C, Agrawal L. Testosterone Effects on the Prostate Gland: Review of Pathophysiology and considerations in Prostate Cancer. J Fam Med Dis Prev, 2015, 1:1.
59. Wu Y, Zhao W, Zhao J et al. Identification of androgen response elements in the insulin-like growth factor I upstream promoter. Endocrinology, 2007; 148(6):2984-93.
60. Yano M, Imamoto T, Suzuki H et al. The clinical potential of pretreatment serum testosterone level to improve the efficiency of prostate cancer screening. Eur Urol, 2007; 51(2):375-80.
61. Yaturu S, Zdunek S, Youngberg B. Vitamin d levels in subjects with prostate cancer compared to age-matched controls. Prostate Cancer, 2012; 524206.
62. Yoo S, Pettersson A, Jordahl KM, et al. Androgen receptor CAG repeat polymorphism and risk of tmprss2:erg positive prostate cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014; 23(10):2027-2031.
63. Zehnder D, Bland R, Williams MC et al. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase. J Clin Endocrinol Metab, 2001; 86(2):888-94.
64. Zhang R, Naughton DP. Vitamin D in health and disease: current perspectives. Nutr J, 2010 8;9:65.
65. Zhao XY, Peeh DM, Navone NM, Feldman D. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits prostate cancer cell growth by androgen-dependent and androgen-independent mechanisms. Endocrinology, 2000; 141(7):2548-56.

Адрес за кореспонденция:

Богдан Русев Хаджиев
 Катедра по биохимия, молекулна медицина
 и нутригеномика
 Факултет по фармация
 Медицински университет
 бул. „Цар Освободител“ № 84
 9002 Варна
 тел. 0876675088
 e-mail: bogdanroussev@gmail.com

Address for correspondence:

Bogdan Roussev
 Department of Biochemistry, Molecular Medicine
 and Nutrigenomics,
 Faculty of Pharmacy
 Medical University
 84 Tsar Osvoboditel Bulvd.
 Bg – 9002 Varna
 Phone +359 876675088
 e-mail: bogdanroussev@gmail.com

ИЗИСКВАНИЯ КЪМ АВТОРИТЕ

Общи изисквания:

Изискванията към авторите на сп. „Съвременна медицина“ са съобразени с „Единните изисквания към ръкописите, представяни на биомедицинските списания: писане и редакция на биомедицинска публикация“, предложени през 2007 г. от международен комитет от редактори на медицински списания. (www.ICMJE.org). Приемат се за печат материали, които не са публикувани в писмен или електронен вид и не са дадени за печат в друго издание. Прилага се декларация (www.medunion-bg.org/subpagesspisanie.aspx?id=2). Всички съавтори следва да удостоверяват съгласието си за публикация на предлагания материал. Авторът, посочен за контакт, е задължен да съгласува с всички съавтори препоръките за корекции. Авторите носят отговорност за съдържанието на публикациите. Представените материали и описанията в тях изследвания следва да съответстват на утвърдените етични стандарти относно провеждането на клинични и/или експериментални проучвания с хора и опитни животни. Не трябва да се упоменават пациенти с техните имена, инициали или снимков материал, на който могат да бъдат разпознати. Предложените материали се публикуват след одобряване и рецензиране от Редакционната колегия.

Технически изисквания:

Материалите се представят в електронен вид (e-mail, CD или USB-флаш, написани с името на първия автор и заглавието).

- За оригинална статия и кратко съобщение: **ВЪВЕДЕНИЕ, ЦЕЛ, МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ, РЕЗУЛТАТИ, ОБСЪЖДАНЕ, ИЗВОДИ;**
- Обзорите започват с **ВЪВЕДЕНИЕ**, а останалата част от текста се разделя структурно по преценка на авторите;
- **РЕЗЮМЕТАТА** към оригиналните статии, кратките съобщения и обзорите повтарят съответната структура;

Материалът е с включени заглавия, автори и работно място, резюмета, ключови думи, адрес за контакти (всичко дотук на български и английски език), текст и библиография.

Публикувани материали в рубриките:	Максимален обем страници:
Оригинални статии	12
Обзори	15
Кратки съобщения	5
Форум (писма до редакцията)	1

- **Заглавие** – без съкращения;
- **Автори** – фамилия и инициали на името. При автори, работещи на различни места, се използват цифрови индекси, поставени след фамилията на съответния автор и пред наименованието на местоработата му (нов ред);
- **Резюме** – до 300 думи, обобщаващо най-същественото в оригиналната статия, обзора или краткото съобщение;
- **Ключови думи** – до 7-8, на български и на английски език;
- **Адрес за контакти** – име, пощенски адрес, телефонен номер и e-mail адрес (по желание) на отговорния автор;
- **Основен текст** – на български език. Желателно е да се избягват чуждиците, когато е възможно. Допуска се използването на общоприети съкращения, които следват цялостното наименование – там, където то се появява за първи път. Библиографските източници се цитират в края на съответното изречение, с поредния номер от библиографията, изписан в кръгли скоби. Мерните единици следва да са в системата SI.
- Илюстрациите включват таблици, схеми, формули (Power Point или Word), фигури, снимки JPEG или PDF формат;

- **Библиография** – изписване на оригиналния език и подреждане според последователността на цитиране на източника в текста. За цитираната литература на български език се изброяват всички автори, а за тези на латиница – трима, следвани от et al. Препоръчително е цитиране на българските автори, работили в съответната област, и броят цитирани източници за обзорните материали да е между 30 и 60.
- **Статии от списание:** Автор(и). Заглавие на статията. Заглавие на списанието (съкратено по Index Medicus), година, том (volumen), номер на книжката (брой) в скоби, страници (от-до). *Пример:* Yakub YN, Freedman RB, Pabico RC. Renal transplantation in systemic lupus erythematosus. Nephron, 1981, 27(1), 197-201.
- **Публикации от сборник:** Автор(и). Заглавие. В: (за латиница In:) Заглавие на сборника. Поредност на изданието, редактори. Местоиздаване (град), издателство, година на издаването, страници (от-до). *Пример:* Wilkinson AH. Evaluation of the transplant recipient. In: Handbook of Kidney Transplantation. 2nd ed. G. M. Danovitch (Ed.). Boston, Little, Brown and Co., 1996, 109-122.
- **Книги:** Автор(и). Заглавие. Местоиздаване (град), издателство, година на издаването, страници (от-до). *Пример:* Шейтанов Й. Системни васкулити. С., ЦИМ, 1997, 8-11.
- **Благодарности** – в края на материала авторите могат да изкажат благодарност към лица или институции, които са допринесли интелектуално или са оказали техническа, материална или финансова помощ.

Статистическа обработка:

- Статистическите методи трябва да се описват достатъчно подробно, така че информираният читател, който има достъп до оригиналните данни, да може да провери представените резултати.
- Резултатите трябва да се представят количествено (когато е възможно) чрез подходящи индикатори за грешката на измерване или неопределеност (например доверителни интервали).
- Да се избягва използването единствено на r-стойности при проверката на хипотези, тъй като този подход не дава достатъчно количествена информация. Желателно е да се посочват точните r-стойности, заедно с подходящите доверителни интервали.
- Трябва да се посочва точно целевата популация, за която ще се отнасят изводите, както и критериите за подбор на участниците в експеримента. В този случай трябва да се посочи и начинът на рандомизация. Броят на измерванията (обемът на извадката) задължително се посочва и се обосновава начинът на изчисляването.
- Цитират се стандартни източници на подобни проучвания и статистическият анализ.
- Трябва да се посочат статистическите програми, с които е извършен анализът.
- При обобщаването на данните в раздел „Резултати“ трябва да се посочват и статистическите методи, използвани при анализа.
- Броят на таблиците и графиките да се ограничава до необходимия за списанието и аргументирането на резултатите.
- Да се избягва дублирането на информация (едни и същи данни, представени като таблица и фигура; в текста и в илюстрация; с повече от един тип анализ).
- Да се дефинират еднозначно използваните статистически термини, съкращения, символи.

Препоръчително е авторите (поне един от колектива) да подкрепят списанието чрез годишен абонамент в редакцията.



IN MEMORIAM

д-р Емил Таков Андреев

1963-2017

По-голямата част от професионалния му път (22 години) преминава в Клиниката по нефрология на Александровска болница, а в последните години работи в УМБАЛ "Софиямед".

С фин интелект и с нестандартно чувство за хумор, като специалист д-р Андреев беше изключително съвестен и прецизен. Потомствен медик с широка култура, скромен и задълбочен, полагаше цялостна грижа за пациентите извън обсега на часове и формалности, с мисъл за причините и последствията. На болните си той посвети и книгата „Бъбреците и техните заболявания“.

Ранната смърт на нашия колега нефролог ни оставя безмълвни.

Поклон пред паметта му!

От Редколегията на сп. „Съвременна медицина“

At Amgen, biologic medicines are
rooted in **quality** and nurtured
by **reliability**.



BG-C-BBA-0915-115022 (1)



BIOTECHNOLOGY
BY **AMGEN**®