



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ

Факултет „Медицина“

Катедра „Физиология и патофизиология“

д-р Цветелина Валентинова Петкова-Маринова

**ПРОУЧВАНЕ УЧАСТИЕТО НА ХЕПСИДИН, МЕД И СЕЛЕН В
ПОДДЪРЖАНЕ НА ЖЕЛЯЗНАТА ХОМЕОСТАЗА
ПРИ МОМИЧЕТА В ЮНОШЕСКА ВЪЗРАСТ И БРЕМЕННИ ЖЕНИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане
на образователна и научна степен „Доктор“

Научна специалност
„Физиология на животните и човека“

Научен ръководител:

Доц. д-р Боряна Крумова Русева, д.м.

Официални рецензенти:

Проф. д-р Негрин Негрев, д.м.н.

Проф. д-р Анна Толева, д.м.

Плевен, 2021

Дисертационният труд е написан на 156 страници. Съдържа: 9 таблици, 45 фигури и 2 приложения.

Библиографията включва 336 източника, от които 16 на кирилица и 320 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Разширен Катедрен съвет на Катедра „Физиология и патофизиология“, Факултет „Медицина“, Медицински Университет – Плевен.

Клиничният материал, свързан с дисертацията е събран в: ДКЦ III – Плевен ЕООД и Медицински Център Клиничен Институт за Репродуктивна Медицина „Света Елисавета“ – Плевен.

Изследванията са извършени в: Медико-Диагностична Клинична Лаборатория УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ – Плевен, Централна Клинична Лаборатория УМБАЛ „Александровска“ – София и Сектор „Биология“ на МУ – Плевен.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 10.12.2021 г. от 13.00 ч. в зала „Амброаз Парев“.

Използвани съкращения

г.с. – Гестационна седмица

ЖД – Железен дефицит

ЖДА – Желязодефицитна анемия

ЖРЖДА – Желязо-рефрактерна желязодефицитна анемия

НБ – Нормално протичаща бременност

ПБ – Проблемно протичаща бременност

СЗО – Световна Здравна Организация

ТЖСК – Тотален желязо-свързващ капацитет

ANOVA – Еднофакторен дисперсионен анализ

ВМІ – Индекс на телесната маса

CDC – Центрове за контрол и превенция на заболяванията (САЩ)

CI – Доверителен интервал

CRP – С-реактивен протеин

Cu – Мед

ECLIA – Електро-хемилюминесцентен имуноанализ

ELISA – Ензимно-свързан имуносорбентен анализ

ETAAS – Електротермична атомно-абсорбционна спектрометрия

FAAS – Пламъкова атомно-абсорбционна спектрометрия

Fe – Желязо

Ferr – Феритин

GPx – Глутатион пероксидаза

Hb – Хемоглобин

Hct – Хематокрит

Нерс25 – Нерсидин 25

HIF – Хипоксия-индуцируем фактор

HRP – Horseradish peroxidase

IL – Интерлевкин

IUI – Вътрематочна инсеминация

IVF – Конвенционално ин витро оплождане

JAK – Janus (Янус)-киназа

MCH – Средно хемоглобиново съдържание

MCHC – Средна хемоглобинова концентрация
MCV – Среден обем на еритроцита
n – Брой
OR – Отношение на шансовете (Odds ratio)
pO₂ – Парциално налягане на кислорода
RBC – Брой еритроцити
ROS – Реактивни кислородни видове
SatTf – Коефициент на насищане на трансферина с желязо (Сатурация на трансферина)
SCu – Серумна концентрация на мед
SD – Стандартно отклонение
Se – Селен
SE – Стандартна грешка
SFe – Серумно желязо
SFerr – Серумен феритин
SHerc – Серумен хепсидин
SSe – Серумна концентрация на селен
STAT3 – Сигнален трансдюсер и активатор на транскрипция-3
sTfR – Разтворим трансферин рецептор
Tf – Трансферин
TNF- α – Тумор-некротизиращ фактор α
WHO – Световна Здравна Организация
 δ -ALA – δ -аминолевулинова киселина

СЪДЪРЖАНИЕ

Въведение	7
Цел и задачи	9
Контингент и методи	10
Критерии за включване и изключване на изследваните лица за оформяне на работните и контролните групи	10
Оформяне на работните и контролните групи	12
Изследователски методи	13
Резултати	18
Описание на работните и контролните групи	18
Определяне на серумните концентрации на хепсидин, IL-6, Cu и Se при изследваните лица от работните и контролните групи	19
Определяне на хематологичните показатели при изследваните лица от работните и контролните групи	21
Определяне на биохимичните маркери на желязната обмяна при изследваните лица от работните и контролните групи	23
Оценка на желязния, медния и селеновия статус на изследваните лица от работните и контролните групи	27
Установяване на зависимостите между серумните концентрации на хепсидин, IL-6, Cu и Se, хематологичните показатели и биохимичните маркери на желязната обмяна при изследваните лица от работните и контролните групи	40
Обсъждане на резултатите	51
Изводи	64
Препоръки	66
Алгоритъм за мониториране на желязния метаболизъм и селеновия статус при бременни жени с проблемна бременност, предшествана от репродуктивни неудачи или асоциирана с хронични възпалителни заболявания, в т. ч. автоимунни	66
Алгоритъм за диагноза и поведение при деца в юношеска възраст с ЖДА	67
Приноси на дисертационния труд	68
Списък на публикации и участия в научни прояви, свързани с дисертационния труд	69
Резюме	71

Въведение

Поддържането на хомеостазата на желязото (Fe) е от изключително значение за здравето и развитието. Както недостигът, така и излишъкът на Fe са свързани с нарушение на клетъчните функции. Дефицитът на Fe се свързва с нарушения във физическото, нервно-психическото развитие и имунитета, повишена чревна резорбция на тежки метали като олово и кадмий и намалена работоспособност. Излишъкът от Fe има токсично действие поради участие на свободните желязни йони във Fenton и Haber-Weiss реакции с генериране на реактивни кислородни видове (ROS).

Юношеската възраст и периодът на бременността се характеризират с интензивен тъканен растеж и развитие, което води до повишаване на потребностите от макро- и микронутриенти. Съществено повишени са потребностите от Fe на организма, което е причина за физиологична предразположеност към развитие на желязен дефицит (ЖД). Поради често срещаните ограничения в храненето и повишаване на загубите от Fe със започване на менструацията, момичетата в юношеска възраст са сред най-често и тежко засегнатите от желязонеодоимъчни състояния. Друга рискова група са бременните жени, при които повишените потребности от Fe се обуславят от интензивния растеж на плода и плацентата, нарастването на кръвния обем и от кръвозагубите по време на раждането.

Най-тежката степен на ЖД – желязодефицитната анемия (ЖДА), в наши дни все още остава сериозен проблем на общественото здравеопазване в целия свят. Значимостта на ЖДА се определя от широкото ѝ разпространение и неблагоприятните последици върху здравето на засегнатите групи. Тя се посочва като едно от 10-те водещи заболявания в глобалното бремене на болестите. По данни на Световната Здравна Организация (СЗО; 2008 г., 2015 г.), в световен мащаб анемия се среща при 25,4% от децата между 5 и 14 годишна възраст и при 29,4% от жените над 15 годишна възраст. Честотата на анемия сред бременните жени достига до 38,2%. Смята се, че половината от случаите на анемия се дължат на ЖД, но в детска възраст относителният дял на ЖДА в общата структура на анемиите достига до 90%.

Въпреки че ЖД е водеща причина за развитие на анемия, само около 40-60% от случаите на анемия се повлияват от лечение с Fe-съдържащи препарати. Възниква необходимостта от изследване на фактори, които биха могли да обусловят недостатъчния или липсващ терапевтичен ефект на желязните препарати.

В началото на XXI-ви век се установява, че един малък пептиден хормон – хепсидин, синтезиран главно в хепатоцитите, играе ролята на ключов регулатор в желязната

хомеостаза, понижавайки бионаличността на Fe в организма. Хепсидинът осъществява връзката между факторите, регулиращи хомеостазата на желязото, и различни аспекти на желязния метаболизъм – резорбция, освобождаване на Fe от макрофагите и хепатоцитите и трансплацентарен транспорт на Fe по време на бременността. Този хормон поддържа нивата на циркулиращо Fe в относително тесни физиологични граници, съответстващи на потребностите от Fe на еритропоезата, и същевременно предотвратява възможността за възникване на оксидативен стрес в клетките. Главните фактори, регулиращи синтеза и секрецията на хепсидин, са статусът на Fe в организма, активността на еритропоезата, парциалното налягане на кислорода (pO_2) и възпалението. Установено е, че синтезът на хепсидин при възпаление се индуцира от проинфламаторния цитокин интерлевкин (IL)-6.

Въпреки че статусът на Fe е доказан фактор, регулиращ производството на хепсидин, регулацията на хепсидиновия синтез и секреция в условия на ЖДА е все още недостатъчно изяснена. Интерес представлява въпросът, че въздействието върху хепсидина и желязната хомеостаза се медира не пряко от желязния дефицит или анемията, а от все още неизяснен сигнал, възникващ в условията на повишена активност на еритропоезата.

Проучванията за серумните концентрации на хепсидин и промените им по време на бременността в световната научна литература са сравнително малко. Все още остава недостатъчно изяснена ролята на хепсидина в регулацията на желязния метаболизъм, както и факторите, регулиращи секрецията на хепсидин по време на бременността. Противоречиви са резултатите от проучвания, изследващи взаимовръзките между нивата на хепсидин и лабораторни показатели, характеризиращи различни аспекти от обмяната на желязото.

Публикуваните в научната литература данни показват, че хомеостазата на желязото е тясно свързана с тази на микроелементите мед (Cu) и селен (Se) на основата на редица взаимодействия. Счита се, че едно от възможните свързващи звена е пептидът хепсидин. Механизмите на взаимодействие на хепсидин с микроелементите Cu и Se все още не са напълно изяснени. Наличните данни в световната научна литература за взаимовръзки между показатели, характеризиращи желязния метаболизъм, и серумните концентрации на Cu и Se са противоречиви.

Цел и задачи

Цел

Целта на настоящото научно изследване е да се проучи участието на хепсидин, мед и селен в поддържане на желязната хомеостаза при момичета в юношеска възраст и бременни жени.

Задачи

- 1) Определяне на серумните концентрации на хепсидин, IL-6, Cu и Se при изследваните лица от работните и контролните групи;
- 2) Определяне на хематологичните показатели при изследваните лица от работните и контролните групи;
- 3) Определяне на биохимичните маркери на желязната обмяна при изследваните лица от работните и контролните групи;
- 4) Оценка на желязния, медния и селеновия статус на изследваните лица от работните и контролните групи;
- 5) Установяване на зависимостите между серумните концентрации на хепсидин, IL-6, Cu и Se, хематологичните показатели и биохимичните маркери на желязната обмяна при изследваните лица от работните и контролните групи;
- 6) Разработване на алгоритъм за диагноза и поведение при деца в юношеска възраст с ЖДА;
- 7) Разработване на алгоритъм за мониториране на желязния метаболизъм и селеновия статус при бременни жени с проблемна бременност, предшествана от репродуктивни неудачи или асоциирана с хронични възпалителни заболявания, в т. ч. автоимунни.

Контингент и методи

Критерии за включване и изключване на изследваните лица за оформяне на работните и контролните групи

Критерии за включване на лицата в основната група деца в юношеска възраст с ЖДА:

- Възраст от 12 до 17 години вкл.;
- Концентрация на хемоглобин (Hb) < -2 SD от средното ниво за съответната възраст и пол;
- MCV < -2 SD от средното ниво за съответната възраст и пол;
- Наличие на ЖД [SatTf $< 16\%$; SatTf (%) = (SFe/ТЖСК) x 100];
- Подписано информирано съгласие.

Критерии за включване на лицата в контролната група деца в юношеска възраст:

- Възраст от 12 до 17 години вкл.;
- Концентрация на Hb ≥ -2 SD от средното ниво за съответната възраст и пол;
- MCV ≥ -2 SD от средното ниво за съответната възраст и пол;
- SatTf $\geq 16\%$;
- Подписано информирано съгласие.

Критерии за изключване на лицата от основната и контролна група деца в юношеска възраст:

- Възраст под 12 и над 17 години;
- Хронични чернодробни и бъбречни заболявания;
- Автоимунни заболявания;
- Хронични възпалителни процеси;
- Захарен диабет;
- Затлъстяване – индекс на телесната маса (BMI) ≥ 30 kg/m²;
- Хронични инфекциозни заболявания (туберкулоза, вирусен хепатит В и С, HIV-инфекция);
- Прекарани остри инфекциозни и гастроинтестинални ентероколитни заболявания до 1 месец преди определеното изследване;

- Злокачествени заболявания;
- Наследствени анемии – хипорегенераторни и хемолитични;
- Придобити анемии – витамин-дефицитни, хипорегенераторни и хемолитични;
- Прием на желязни препарати и хранителни добавки, съдържащи витамини и микроелементи до 10 дни преди определеното изследване;
- Отказ за подписване на информирано съгласие.

Критерии за включване на лицата в работната група бременни жени с проблемна бременност:

- Бременни жени с хронични възпалителни заболявания, включително автоимунни заболявания, затлъстяване ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$ при регистриране за женска консултация), захарен диабет (прегестационен и гестационен), преекламписия [гестационна хипертония (артериално налягане $\geq 140/90 \text{ mmHg}$, установено за първи път след 22 г.с.), протеинурия и евент. отоци];
- Едноплодна или многоплодна бременност;
- Подписано информирано съгласие.

Критерии за изключване на лицата от работната група бременни жени с проблемна бременност:

- Прекарани остри инфекциозни заболявания до 1 месец преди определеното изследване;
- Отказ за подписване на информирано съгласие.

Критерии за включване на лицата в контролната група бременни жени с нормално протичаща бременност:

- Здрави бременни жени с едноплодна бременност;
- Подписано информирано съгласие.

Критерии за изключване на лицата от контролната група бременни жени с нормално протичаща бременност:

- Хронични сърдечно-съдови, респираторни, чернодробни, бъбречни заболявания;
- Автоимунни заболявания;
- Хронични възпалителни процеси;
- Захарен диабет или нарушен глюкозен толеранс;

- Затлъстяване – $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$;
- Прееклампсия;
- Хронични инфекциозни заболявания (туберкулоза, вирусен хепатит В и С, HIV-инфекция);
- Прекарани остри инфекциозни заболявания до 1 месец преди определеното изследване;
- Многоплодна бременност;
- Отказ за подписване на информирано съгласие.

Оформяне на работните и контролните групи

През периода октомври 2015 г. – май 2016 г. бяха изследвани общо 40 бременни жени на средна възраст [SD] = $28,86 \pm 4,8$ години (обхват 21,0-39,0 години), отговарящи на критериите за включване и изключване на лицата от изследването. Според изработените критерии, изследваните лица бяха разделени в две групи: работна група бременни жени с проблемна бременност (ПБ) и контролна група бременни жени с нормално протичаща бременност (НБ).

Работна група: 20 жени с проблемно протичаща бременност. В тази група бяха включени рискови бременности, предшествани от репродуктивни неудачи – инфертилитет, спонтанни аборти и/или асоциирани с хронични възпалителни и аутоимунни заболявания – аутоимунен тиреоидит на Хашимото и затлъстяване. При значителна част от изследваните жени с предшестващи репродуктивни неудачи настоящата бременност е била постигната чрез прилагане на асистиран репродуктивни технологии: конвенционално ин витро оплождане (IVF) и вътрематочна инсеминация (IUI). При една от изследваните жени беше установена двуплодна бременност, а при останалите – едноплодна бременност.

Контролна група: 20 жени с нормално протичаща бременност.

Проучването беше проспективно. Изследваните жени бяха проследени двукратно:

- при регистрирането в началото на втория триместър – 16-18^{та} г.с.;
- в началото на третия триместър – 30-32^{ра} г.с.

През периода октомври 2016 г. – ноември 2017 г. бяха изследвани общо 23 деца с ЖДА и здрави контроли на средна възраст [SD] = $15,52 \pm 1,56$ години (обхват 12,0-17,0 години), отговарящи на критериите за включване и изключване на лицата от

изследването. Според изработените критерии, изследваните деца в юношеска възраст бяха разделени в две групи.

Работна група: 12 деца с ЖДА (12 момичета);

Контролна група: 11 здрави деца (7 момичета и 4 момчета).

Всички участници бяха включени в проучването след писмено информирано съгласие.

Изследователски методи

1. **Анкетен метод** – за набиране на информация за: възраст, данни за първа менструация и менструален цикъл (при момичета в юношеска възраст), поредна бременност и протичане на предшестващи бременности (при бременни жени), режим на работа и почивка, начин на хранене, вредности, прием на лекарства (вкл. витамини и микроелементи), минали заболявания, хронични заболявания, фамилна анамнеза.
2. **Клинични методи** – анамнеза и физикално изследване (общ статус; гинекологичен статус – при бременни жени).
3. **Антропометрия** – измерване по стандартна методика на телесна маса чрез калибрирана везна, ръст – чрез стандартен ръстомер и определяне на BMI по формулата $BMI (kg/m^2) = \text{телесна маса}/\text{ръст}^2$.

За определяне на заложените в проучването лабораторни показатели се взима венозна кръв. Предвид физиологичните денонощни колебания на лабораторните показатели, характеризиращи обмяната на микроелементите, кръвните проби се взимат сутрин между 8 и 9.30 часа на гладно. За определяне на хематологичните показатели се взимат 3 ml венозна кръв в стерилни вакутейнери с антикоагулант EDTA. За изследване на биохимичните маркери на желязната обмяна и определяне на серумните концентрации на хепсидин, IL-6, Cu и Se се отделя кръвен серум. За отделяне на кръвен серум се взимат 5 ml венозна кръв в стерилни вакутейнери за серум с активатор на съсирването и сепарационен гел, без антикоагулант. Серумът се отделя до 2 часа след венепункцията, след престой на стайна температура (20°C), чрез центрофугиране на 3000 об./min за 10 минути. Отделеният серум се разпределя в криоепруветки и съхранява при температура -70°C до момента на изследването.

4. **Хематологични изследвания:** определяне на брой еритроцити (RBC), концентрация на Hb, хематокрит (Hct), еритроцитни индекси (MCV, MCH и MCHC) с хематологичен анализатор MICROS. Хематологичните изследвания са извършени в сертифицирана медико-диагностична клинична лаборатория.
5. **Биохимични изследвания** – определяне на биохимични маркери на желязната обмяна – серумно Fe и ТЖСК чрез FerroZine метод с биохимичен анализатор COBAS INTEGRA 400 (Roche Diagnostics). Коефициентът на насищане на трансферина се изчислява по формулата: $SatTf (\%) = (SFe/TЖСК) \times 100$. Изследването на серумно Fe и ТЖСК е извършено в сертифицирана медико-диагностична клинична лаборатория.
6. **Имунологични методи**
 - Определяне на серумни нива на феритин (Ferr) чрез електро-хемилюминесцентен имуноанализ (ECLIA) с имунологичен анализатор COBAS E 411 (Roche Diagnostics). Изследването на серумен Ferr е извършено в сертифицирана медико-диагностична клинична лаборатория.
 - Определяне на серумните концентрации на хепсидин и IL-6 се осъществява след набиране на всички проби от изследваните деца и бременни жени чрез ELISA методи на „сандвичов” принцип. Изследванията са извършени в сектор „Биология” на МУ – Плевен.

Принцип на сандвичови ELISA методи за количествено определяне на хепсидин и IL-6

Принципът на сандвичова ELISA се основава на наличие на две антитела, които реагират с изследвания антиген. ELISA се провежда в 96-ямкови плаки с плоски дъна. Плаката е натоварена с антитела, специфични за изследвания антиген (захващащи антитела). Първо в ямките се нанася разтвор на антигена, който реагира с тези антитела. След това в ямките се нанася разтвор на антитяло, което реагира с антигена (откриващо антитяло; първо антитяло). Специално получено анти-имуноглобулиново антитяло (второ антитяло), което реагира с първото антитяло, е белязано с ензим. След добавяне на субстрат за цветна реакция, катализирана от ензима, с който е белязано второто антитяло, се получава цветно съединение. Екстинкцията се измерва с помощта на фотометър (ELISA рийдър) при определена дължина на вълната и по нея се съди за концентрацията на антиген в пробата.

Определяне на хепсидин чрез сандвичов ELISA метод

За количествено определяне на серумен хепсидин се използва Human Hepsidin 25 (Hepc25) ELISA Kit (Cusabio Biotech Co., Ltd), основан на принципа на сандвичова ELISA. Според указанията на производителя, във всяко кладенче на плаките се накапват по 100 µl от стандартите или пробите. След това плаките се инкубират за 2 часа на температура 37°C. След изтичане на този период излишната течност се отстранява и към всяко кладенче се добавят 100 µl разреден Biotin-antibody. Следва инкубиране за 1 час на температура 37°C, след което излишната течност се аспирира и плаките се промиват трикратно на автоматична миячка с 200 µl разреден промиващ буфер (Wash Buffer). Към всяко кладенче се добавят 100 µl разреден HRP (Horseradish peroxidase)-avidin и отново се инкубира за 1 час на 37°C. Следва отново аспириране на излишната течност и петкратно промиване на плаките с 200 µl разреден промиващ буфер. След добавяне на 90 µl субстратен разтвор за цветна реакция (TMB Substrate) към всяко кладенче плаките се инкубират на тъмно за 15-30 min на 37°C. Настъпва промяна на цвета на съдържимото в кладенчетата в синьо. Реакцията се спира с 50 µl стоп разтвор (Stop Solution), а цветът на съдържимото в кладенчетата се променя от син в жълт. В рамките на 5 min се отчита екстинкцията на всяко кладенче на автоматичен ELISA рийдър ("Ceres UV900C", Bio-Tec Instruments Inc.), настроен на 450 nm. Концентрациите на хепсидин за всяка проба кръвен серум се изчисляват по формула, получена от стандартна права, която е построена въз основа на екстинкциите на стандартите при различни концентрации.

Определяне на IL-6 чрез сандвичов ELISA метод

За определяне на серумните концентрации на IL-6 се използва Human IL-6 ELISA Kit (Diacclone SAS), основан на принципа на сандвичова ELISA. Според указанията на производителя, във всяко кладенче на плаките се накапват по 100 µl от пробите, стандартите, контролите или нулите (подходящ Standard Diluent). След това към всяко кладенче се добавят 50 µl разреден Biotinylated anti-IL-6. Следва инкубиране на стайна температура (18-25°C) за 1 час, след което излишната течност се аспирира и плаките се промиват трикратно на автоматична миячка с 300 µl разтвор за промиване (Washing Solution). Към всяко кладенче се добавят 100 µl Streptavidin-HRP разтвор и се инкубира на стайна температура (18-25°C) за 30 min. Следва повторно трикратно промиване. След добавяне на 100 µl субстратен разтвор (TMB Substrate) към всяко кладенче плаките се инкубират на тъмно за 12-15 min на стайна температура. Реакцията се спира

със 100 µl стоп реагент (H₂SO₄ Stop Reagent). Непосредствено след тази стъпка се отчита екстинкцията на всяко кладенче на автоматичен ELISA рийдър (“Ceres UV900C”, Bio-Tec Instruments Inc.), настроен на 450 nm. Концентрациите на IL-6 за всяка проба кръвен серум се изчисляват по формула, получена от стандартна права, която е построена въз основа на екстинкциите на стандартите при различни концентрации.

7. **Атомно-абсорбционна спектрометрия** – за определяне на серумните концентрации на микроелементите Cu и Se.

- Изследването на Cu в серум е направено с пламъкова атомно-абсорбционна спектрометрия (FAAS) – апарат AAnalyst 300 (Perkin-Elmer) в Централна Клинична Лаборатория УМБАЛ „Александровска” – София.
- Изследването на Se в серум е направено чрез електротермична атомно-абсорбционна спектрометрия (ETAAS) със Зееманова корекция на неселективната спектрална абсорбция – апарат Zeeman 5000 (Perkin-Elmer). Изследването е извършено в Централна Клинична Лаборатория УМБАЛ „Александровска” – София.

Резултатите от проведените анкетно проучване, клиничен преглед, антропометрични измервания и получените лабораторни данни се нанасят в здравна карта на пациента.

8. **Статистически методи** – данните от проучването се въвеждат и обработват със статистически програмни продукти Microsoft Office Excel 2003 и STATGRAPHICS Centurion XVI. За ниво на статистическа значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза бе избрано $p < 0,05$.

Резултатите са описани чрез таблици, графики и числови величини (показатели за структура – относителни дялове, средни стойности, корелационни коефициенти и др.). Най-често са изразявани като средна стойност на величината (X) ± стандартно отклонение (SD) и средна стойност (X) ± стандартна грешка на средната стойност (SEM) или стойност на медианата с интерквартилен обхват (IQR) в зависимост от типа на разпределение.

- **Дескриптивни методи:**
 - Честотен анализ на качествени променливи величини, който включва абсолютни и относителни честоти (%);

- Вариационен анализ на количествени променливи величини, чрез който се намират средна аритметична стойност, стандартно отклонение, обхват на вариационния ред, стандартна грешка на средната аритметична стойност и медиана.
- Параметрични методи за проверка на хипотези при нормално разпределение:
 - t-критерий на Student за сравняване на средни стойности на две изследвани групи (независими извадки);
 - Еднофакторен дисперсионен анализ (one-way Analysis of Variance – ANOVA) за изучаване влиянието на една независима променлива величина, която може да има две или повече нива.
- Непараметрични методи за проверка на хипотези:
 - за установяване на статистическа зависимост между две качествени променливи – критерий χ^2 на Pearson и точен критерий на Fisher;
 - за сравняване на средни стойности при количествени променливи величини с различно от нормалното разпределение: на две групи (независими извадки) – U-критерий на Mann-Whitney, а на повече от две извадки – H-тест на Kruskal-Wallis.
- Odds ratio (OR) за оценка на отношенията на шансовете (оценка на риска) за факторите, включени в проучването.
- Корелационен и регресионен анализ за установяване на статистическа зависимост между количествени променливи величини (с изчисляване на коефициентите на корелация по Pearson). Степента на корелационна зависимост е оценена според стойността на корелационния коефициент по 5-степенна скала.

Резултати

Описание на работните и контролните групи

Бяха изследвани 23 деца в юношеска възраст, разделени в две групи: работна група деца с ЖДА (n=12) и контролна група здрави деца (n=11).

Между двете изследвани групи деца в юношеска възраст с ЖДА и здрави контроли не бяха установени статистически значими различия по отношение на възрастта и ВМІ, което показва, че групите са сравними по отношение на тези показатели ($p>0,05$). Възрастовата характеристика, разпределението по пол и данните за ВМІ на сравняваните групи деца в юношеска възраст са представени в Табл. 1.

Табл. 1. Характеристика по възраст, пол и ВМІ на деца в юношеска възраст с ЖДА и здрави контроли

Характеристики	Групи		Ниво на значимост (p)
	Здрави контроли	Деца с ЖДА	
Възраст (години)*	15,82±1,47 (16,0)	15,25±1,66 (15,5)	0,464
Женски пол (относителен дял/брой лица)†	63,64% (7)	100% (12)	0,037
ВМІ (kg/m ²)‡	21,13±1,01	20,18±0,97	0,502

*Резултатите са представени като средна стойност ± SD с медиана в скоби

†Резултатите са представени като % (n)

‡Резултатите са представени като средна стойност ± SE

Изследвани бяха 40 бременни жени, разделени в две групи: работна група бременни жени с проблемно протичаща бременност (n=20) и контролна група бременни жени с нормално протичаща бременност (n=20).

Между сравняваните групи бременни жени с нормално протичаща и проблемна бременност не бяха установени статистически значими различия по отношение на възрастта и ВМІ ($p>0,05$; Табл. 2). Отклоненията в ВМІ в посока на нарастването му при затлъстяване са фактор, който теоретично би могъл да доведе до нарушения в хомеостазата на желязото с участие на хормона хепсидин (Tussing-Humphreys et al., 2012). Не се очаква отклонения в ВМІ при изследваните бременни жени да се отразят на серумните концентрации на хепсидин и показателите на желязния метаболизъм.

Табл. 2. Възрастова характеристика и ВМІ при бременни жени с нормално протичаща и проблемна бременност

Характеристики	Групи		Ниво на значимост (p)
	Нормална бременност	Проблемна бременност	
Възраст (години)*	29,45±4,59 (28,0)	28,13±5,1 (26,0)	0,418
ВМІ (kg/m ²) при регистрирането в 16-18 ^{та} г.с.†	23,26±0,76	26,44±1,56	0,073
ВМІ (kg/m ²) при проследяването в 30-32 ^{ра} г.с.†	27,08±0,57	26,96±0,97	0,915

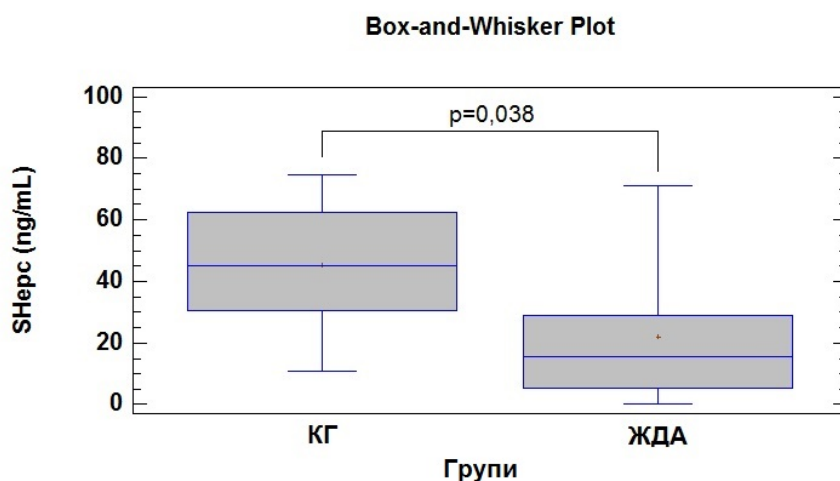
*Резултатите са представени като средна стойност ± SD с медиана в скоби

†Резултатите са представени като средна стойност ± SE

Определяне на серумните концентрации на хепсидин, IL-6, Cu и Se при изследваните лица от работните и контролните групи

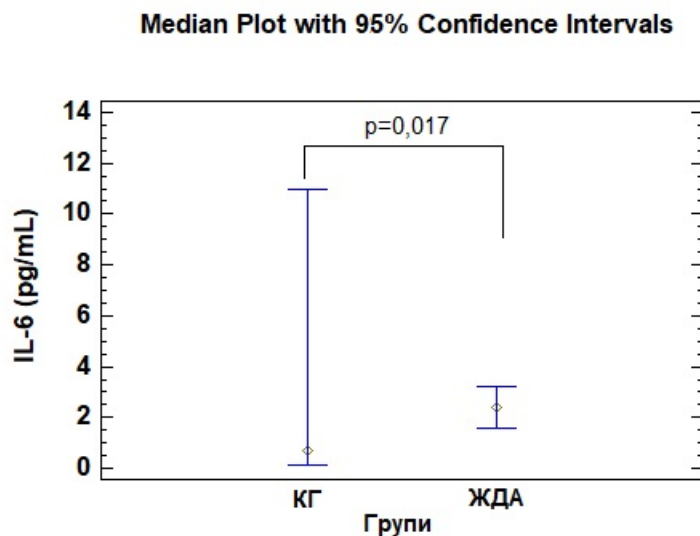
Проучвания при деца в юношеска възраст

При определяне на серумните концентрации на хепсидин беше установена статистически значимо (два пъти) по-ниска средна стойност в групата деца с ЖДА (22,09±6,79 ng/mL) спрямо контролната група (45,12±7,51 ng/mL; p=0,038; Фиг. 1).



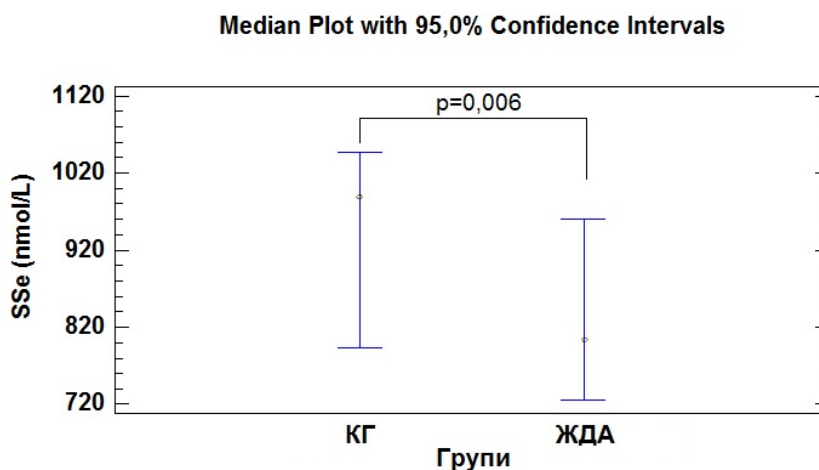
Фиг. 1. Серумни концентрации на хепсидин (SHepc) като средни стойности в ng/mL при деца в юношеска възраст с ЖДА и контролна група (КГ)

Резултатите от изследването показаха, че медианата на серумните нива на IL-6 в групата с ЖДА 2,39 pg/mL (IQR: 1,78-3,06) е статистически значимо (3,5 пъти) по-висока в сравнение с тази на контролите 0,69 pg/mL (IQR: 0,46-1,35; p=0,017; Фиг. 2).



Фиг. 2. Серумни концентрации на IL-6 като медиани в pg/mL при деца в юношеска възраст с ЖДА и контролна група (КГ)

При определяне на серумните нива на Se прави впечатление получената статистически значимо по-ниска стойност на медианата в групата деца с ЖДА 804,5 nmol/L (IQR: 747,0-891,0) в сравнение с тази на контролната група 989,0 nmol/L (IQR: 922,0-1017,0; $p=0,006$; Фиг. 3).



Фиг. 3. Серумни концентрации на Se (SSe) като медиани в nmol/L при деца в юношеска възраст с ЖДА и контролна група (КГ)

Медианата на серумните концентрации на Си в групата на здравите деца е 15,2 $\mu\text{mol/L}$ (IQR: 14,0-17,2), а в групата с ЖДА е 19,35 $\mu\text{mol/L}$ (IQR: 15,8-23,0). Не бяха

установени статистически значими различия в серумните концентрации на Cu между двете изследвани групи ($p=0,06$).

Проучвания при бременни жени

Резултатите от изследването показаха, че между двете групи бременни жени с нормално протичаща и проблемна бременност няма статистически значими различия в средните серумни концентрации на хепсидин, Cu и Se и в медианите на серумните нива на IL-6 в двата изследвани срока на бременността ($p>0,05$; Табл. 3).

Табл. 3. Резултати от изследвани серумни концентрации на хепсидин, IL-6, Cu и Se при бременни жени с нормално протичаща и проблемна бременност в началото на втория (16-18^{та} г.с.) и началото на третия триместър (30-32^{ра} г.с.)

Показател	16-18 ^{та} г.с.		30-32 ^{ра} г.с.	
	Нормална бременност	Проблемна бременност	Нормална бременност	Проблемна бременност
SHepc (ng/mL)*	13,93±4,95	15,04±4,63	12,78±4,78	26,31±7,73
IL-6 (pg/mL)†	0,59 (IQR: 0,39-1,02)	0,68 (IQR: 0,37-1,45)	0,54 (IQR: 0,42-1,02)	0,31 (IQR: 0,08-0,49)
SCu (µmol/L)*	34,72±1,71	33,93±1,68	31,58±1,69	32,6±1,62
SSe (nmol/L)*	996,4±45,23	820,18±45,17	894,7±47,28	936,22±60,42

*Данните са представени като средна стойност ± SE

†Данните са представени като медиана с IQR

При двете изследвани групи бременни жени не бяха установени отчетливи промени в средните стойности на серумен хепсидин, Cu и Se и в медианите на серумните концентрации на IL-6 с нарастване на гестационния срок ($p>0,05$).

Определяне на хематологичните показатели при изследваните лица от работните и контролните групи

Проучвания при деца в юношеска възраст

Резултатите от изследването показаха статистически значимо по-ниски средни стойности на Hb концентрация и Hct, и на еритроцитните индекси MCV и MCH в групата деца с ЖДА спрямо контролната група ($p<0,05$; Табл. 4). Не бяха установени статистически значими различия при сравняване на медианите на общия брой RBC и на

средните стойности на еритроцитния индекс МСНС между двете изследвани групи ($p > 0,05$).

Табл. 4. Резултати от изследвани хематологични показатели при деца в юношеска възраст с ЖДА и здрави контроли

Показател	Групи		Ниво на значимост (p)
	Здрави контроли	Деца с ЖДА	
RBC ($\times 10^{12}/L$)*	4,83 (IQR: 4,39-5,16)	4,48 (IQR: 3,98-4,9)	0,196
Hb (g/L)†	133,09 \pm 4,03	90,33 \pm 5,89	0,0001
Hct (L/L)†	0,4 \pm 0,01	0,29 \pm 0,02	0,0001
MCV (fL)†	84,63 \pm 1,37	68,81 \pm 3,38	0,0004
MCH (pg)†	28,4 \pm 0,65	21,57 \pm 1,4	0,0003
MCHC (g/L)†	331,18 \pm 6,37	320,0 \pm 6,88	0,249

*Данните са представени като медиана с IQR

†Данните са представени като средна стойност \pm SE

Проучвания при бременни жени

В средните стойности на изследваните хематологични показатели не се наблюдават статистически значими различия между двете групи бременни жени с нормално протичаща и проблемна бременност в двата изследвани срока на бременността ($p > 0,05$; Табл. 5).

Табл. 5. Резултати от изследвани хематологични показатели при бременни жени с нормално протичаща и проблемна бременност в началото на втория (16-18^{та} г.с.) и началото на третия триместър (30-32^{ра} г.с.). Данните са представени като средна стойност \pm SE

Показател	16-18 ^{та} г.с.		30-32 ^{ра} г.с.	
	Нормална бременност	Проблемна бременност	Нормална бременност	Проблемна бременност
RBC ($\times 10^{12}/L$)	3,86 \pm 0,08	3,79 \pm 0,09	3,67 \pm 0,08	3,6 \pm 0,1
Hb (g/L)	116,86 \pm 2,27	115,62 \pm 2,3	113,31 \pm 1,76	113,33 \pm 2,05
Hct (L/L)	0,35 \pm 0,01	0,34 \pm 0,01	0,33 \pm 0,01	0,33 \pm 0,01
MCV (fL)	89,39 \pm 1,44	87,68 \pm 1,61	90,65 \pm 1,33	90,29 \pm 1,11
MCH (pg)	30,18 \pm 0,55	30,17 \pm 0,73	30,7 \pm 0,55	31,4 \pm 0,63
MCHC (g/L)	338,07 \pm 2,18	344,25 \pm 5,24	338,54 \pm 2,51	347,6 \pm 4,48

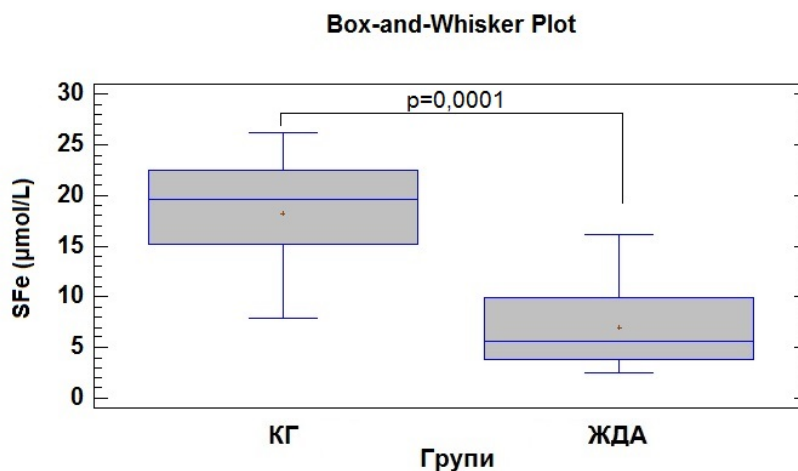
При двете изследвани групи бременни жени не бяха установени отчетливи промени в средните стойности на изследваните хематологични показатели с нарастване на гестационния срок ($p>0,05$).

Определяне на биохимичните маркери на желязната обмяна при изследваните лица от работните и контролните групи

Проучвания при деца в юношеска възраст

При определяне на биохимичните показатели на желязния метаболизъм се установиха стойности на медианата на серумен Ferr 37,22 $\mu\text{g/L}$ (IQR: 21,92-60,59) при здравите деца и 17,14 $\mu\text{g/L}$ (IQR: 4,94-37,95) в групата с ЖДА без статистически значима разлика между двете групи ($p=0,085$).

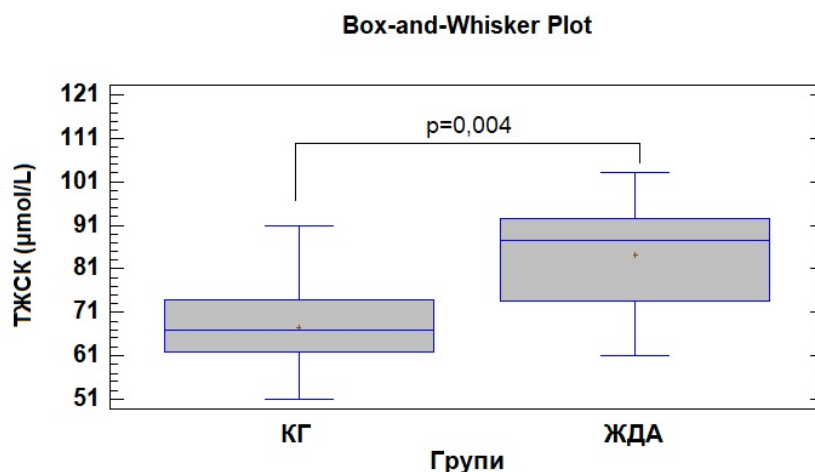
Резултатите от изследването показаха, че средното серумно ниво на Fe е статистически значимо (2,6 пъти) по-ниско в групата с ЖДА ($6,91\pm 1,25 \mu\text{mol/L}$) спрямо контролната група ($18,25\pm 1,68 \mu\text{mol/L}$; $p=0,0001$; Фиг. 4).



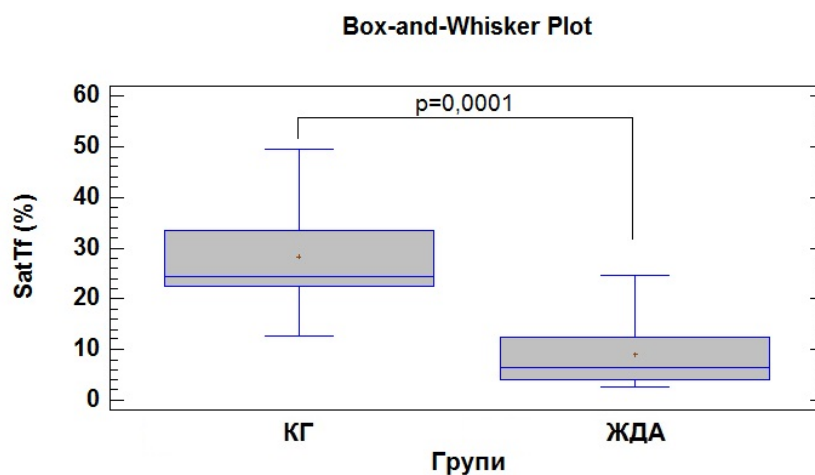
Фиг. 4. Серумни нива на Fe (SFe) като средни стойности в $\mu\text{mol/L}$ при деца в юношеска възраст с ЖДА и контролна група (КГ)

При определяне на ТЖСК се установи статистически значимо по-висока средна стойност на показателя при децата с ЖДА ($84,17\pm 3,76 \mu\text{mol/L}$) в сравнение с контролите ($67,55\pm 3,34 \mu\text{mol/L}$; $p=0,004$; Фиг. 5).

В съответствие с посочените данни, при показателя SatTf се отчетоха статистически значимо (три пъти) по-ниски средни стойности в групата с ЖДА ($9,09\pm 2,08\%$) спрямо контролната група ($28,16\pm 3,59\%$; $p=0,0001$; Фиг. 6).



Фиг. 5. Тотален желязо-свързващ капацитет (ТЖСК) като средни стойности в $\mu\text{mol/L}$ при деца в юношеска възраст с ЖДА и контролна група (КГ)

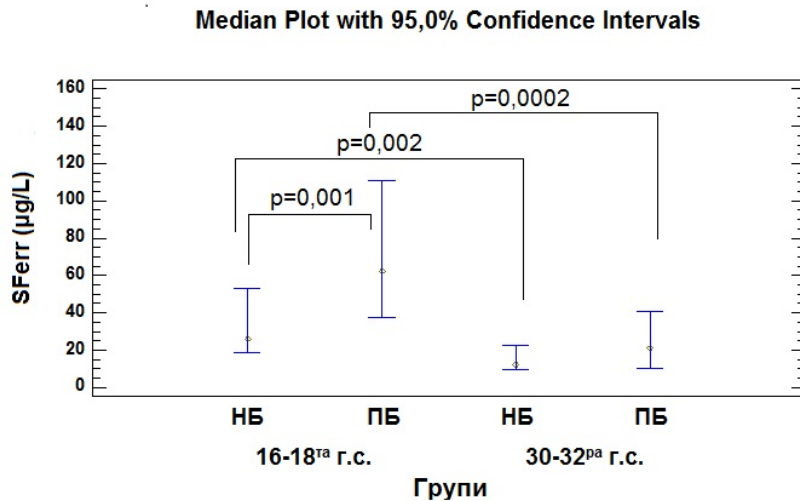


Фиг. 6. Коефициент на насищане на трансферина (SatTf) като средни стойности в % при деца в юношеска възраст с ЖДА и контролна група (КГ)

Проучвания при бременни жени

При сравняване на медианите на серумен Ferr между двете изследвани групи правят впечатление получените статистически значимо (2,4 пъти) по-високи стойности при жените с проблемна бременност $62,15 \mu\text{g/L}$ (IQR: 43,68-91,0) спрямо контролите $26,27 \mu\text{g/L}$ (IQR: 21,28-45,28) в началото на втория триместър ($p=0,001$; Фиг. 7). С нарастване на гестационния срок се наблюдава отчетливо понижение в стойностите на серумен Ferr при двете изследвани групи бременни жени – два пъти в групата с нормално протичаща бременност ($p=0,002$) и почти три пъти в групата с проблемна бременност ($p=0,0002$). Медианата на серумния Ferr за контролната група в началото на третия

триместър е 12,67 $\mu\text{g/L}$ (IQR: 11,27-19,16), а за работната група – 21,48 $\mu\text{g/L}$ (IQR: 11,69-37,98), като с нарастване на гестационната възраст разликата в медианите между двете изследвани групи загуби статистическа значимост ($p=0,113$).

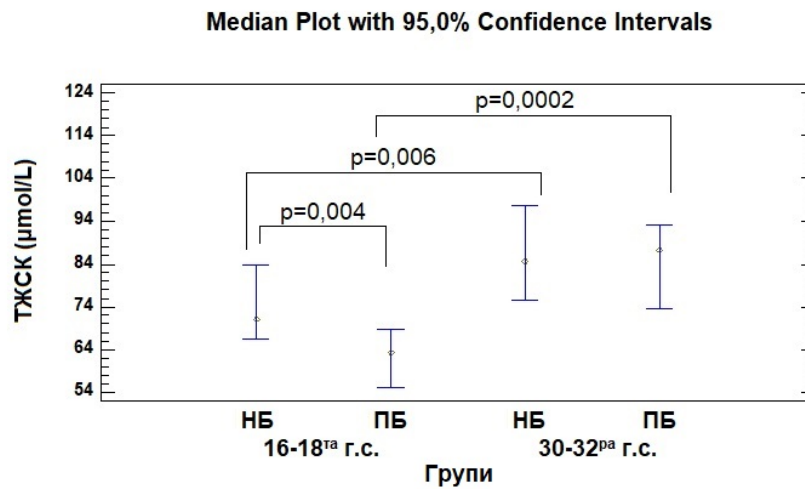


Фиг. 7. Серумни нива на Ferr (SFerr) като медиани в $\mu\text{g/L}$ при бременни жени с нормално протичаща (НБ) и проблемна бременност (ПБ) в началото на втория (16-18^{та} г.с.) и началото на третия триместър (30-32^{ра} г.с.)

Средното серумно ниво на Fe за групата с нормално протичаща бременност в началото на втория триместър е $21,75 \pm 1,73 \mu\text{mol/L}$, а за групата с проблемна бременност – $18,98 \pm 1,71 \mu\text{mol/L}$. Средните стойности на серумно Fe не показват отчетливи промени с нарастване на гестационния срок в двете изследвани групи бременни жени ($p > 0,05$). При жените с нормално протичаща бременност в началото на третия триместър средната стойност на показателя е $16,5 \pm 1,17 \mu\text{mol/L}$, а при жените с проблемна бременност – $17,73 \pm 2,17 \mu\text{mol/L}$. Между двете групи бременни жени не бяха установени статистически значими различия в средните стойности на серумно Fe в двата изследвани срока на бременността ($p > 0,05$).

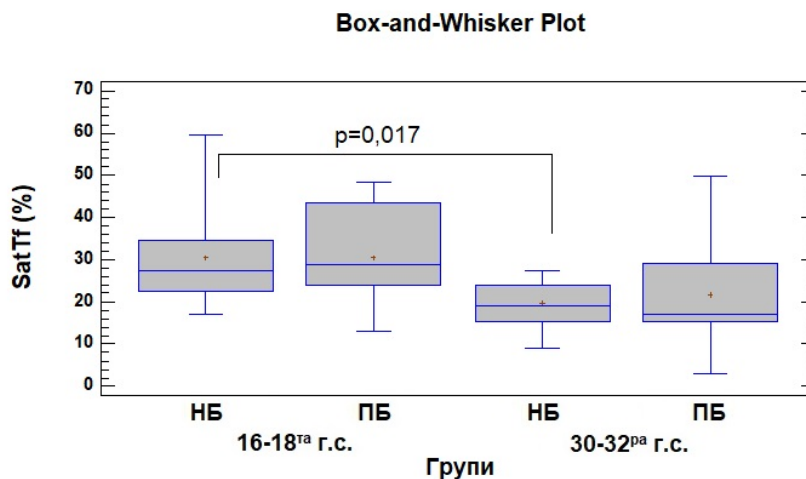
При сравняване на медианите на ТЖСК между двете изследвани групи бяха установени статистически значимо по-ниски стойности при жените с проблемна бременност $63,36 \mu\text{mol/L}$ (IQR: 57,25-68,17) спрямо контролите $71,13 \mu\text{mol/L}$ (IQR: 68,31-77,22) в началото на втория триместър ($p=0,004$; Фиг. 8). С нарастване на гестационния срок се наблюдава отчетливо повишение в стойностите на ТЖСК при двете изследвани групи бременни жени ($p < 0,05$). За групата с нормално протичаща бременност в началото на третия триместър медианата на ТЖСК е $84,69 \mu\text{mol/L}$ (IQR: 78,53-91,0), а за групата с проблемна бременност – $87,43 \mu\text{mol/L}$ (IQR: 75,15-92,9), като

с нарастване на гестационната възраст разликата в медианите между работната и контролната група загуби статистическа значимост ($p=0,801$).



Фиг. 8. Тотален желязо-свързващ капацитет (ТЖСК) като медиани в $\mu\text{mol/L}$ при бременни жени с нормално протичаща (НБ) и проблемна бременност (ПБ) в началото на втория (16-18^{та} г.с.) и началото на третия триместър (30-32^{ра} г.с.)

Средната стойност на SatTf за групата с нормално протичаща бременност в началото на втория триместър е $30,53 \pm 2,95\%$, а за групата с проблемна бременност – $30,42 \pm 2,96\%$. С нарастване на гестационния срок се наблюдава значимо понижение в стойностите на SatTf при жените с нормално протичаща бременност ($p=0,017$; Фиг. 9), но не и в групата с проблемна бременност ($p=0,772$).



Фиг. 9. Коефициент на насищане на трансферина (SatTf) като средни стойности в % при бременни жени с нормално протичаща (НБ) и проблемна бременност (ПБ) в началото на втория (16-18^{та} г.с.) и началото на третия триместър (30-32^{ра} г.с.)

Средната стойност на показателя за групата с нормално протичаща бременност в началото на третия триместър е $19,57 \pm 1,46\%$, а за групата с проблемна бременност – $21,68 \pm 3,21\%$. Между двете групи бременни жени не бяха установени статистически значими различия в средните стойности на SatTf в двата изследвани срока на бременността ($p > 0,05$).

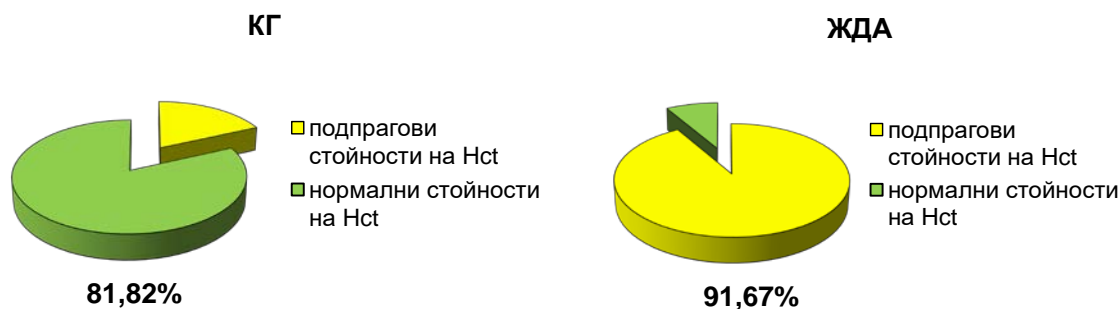
Оценка на желязния, медния и селеновия статус на изследваните лица от работните и контролните групи

Проучвания при деца в юношеска възраст

Резултатите от изследването показаха, че при децата в юношеска възраст с ЖДА 75,0% имат общ брой RBC в рамките на предложените от СЗО (2001 г.) референтни граници за съответната възраст и пол, а при три от децата показателят е под долните референтни граници (-2 SD). В контролната група относителният дял на деца със стойности на RBC в рамките на референтните граници възлиза на 81,82%, а при две от децата показателят е под долните референтни граници. Не се установи статистически значима разлика в относителните дялове на деца със стойности на RBC под и в рамките на референтните граници между двете изследвани групи ($p = 0,545$).

Като критерий за наличие на анемия при изследваните от нас деца са използвани стойности на Hb концентрация под препоръчаните от СЗО прагови (cut-off) стойности за съответната възраст и пол (WHO, 2001, 2011). Хемоглобиновият дефицит при децата с ЖДА беше категоризиран като: лек (Hb концентрация между 110 g/L и предложената от СЗО гранична стойност за съответната възраст и пол) – при две деца, като умерен (Hb концентрация 80-109 g/L) – при шест деца и като тежък (Hb концентрация < 80 g/L) – при четири деца.

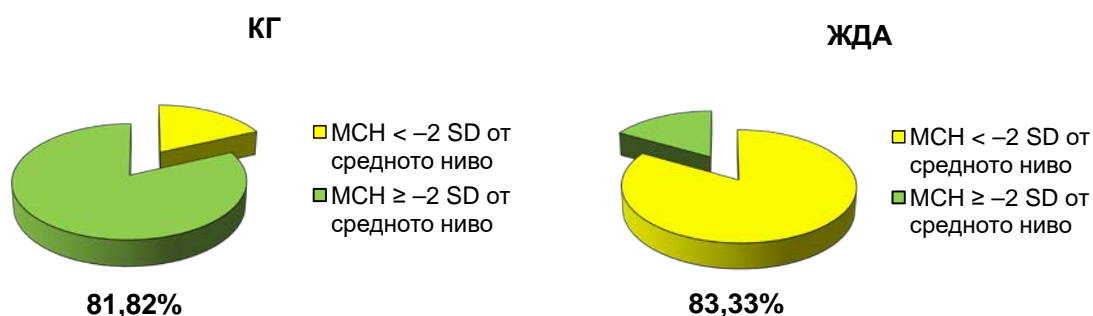
Резултатите от изследването показаха, че относителният дял на деца с подпрагови стойности на Hct според критериите на СЗО (2001 г.) в работната група е 91,67%. Само при едно дете с ЖДА се наблюдават надпрагови стойности на показателя. При 81,82% от изследваните здрави контроли бяха установени нормални стойности на Hct, а при две от децата в контролната група – подпрагови стойности (Фиг. 10). Отчете се статистически значима разлика в относителните дялове на деца с подпрагови и нормални стойности на Hct между двете изследвани групи (OR 49,5; 95% CI: 3,84-638,41; $p = 0,0006$).



Фиг. 10. Сравнителна оценка на относителните дялове на деца в юношеска възраст с подпрагови и нормални стойности на Hct между групата с ЖДА и контролна група (КГ). Данните са представени в %

Един от критериите за наличие на ЖД при изследваните от нас деца са стойности на еритроцитния индекс MCV под препоръчаните от СЗО долни референтни граници (-2 SD) за съответната възраст и пол (WHO, 2001).

Относителният дял на деца със стойности на еритроцитния индекс MCH под предложените от СЗО (2001 г.) долни референтни граници (-2 SD) достигна до 83,33% в групата с ЖДА. При две от децата в работната група стойностите на показателя останаха в рамките на референтните граници. От изследваните здрави контроли при 81,82% бяха установени стойности на MCH в рамките на референтните граници, а при две от децата в контролната група се отчетоха стойности под долните референтни граници (Фиг. 11). Установи се статистически значима разлика в относителните дялове на деца със стойности на MCH под и в рамките на референтните граници между двете изследвани групи (OR 22,5; 95% CI: 2,6-194,51; $p=0,003$).

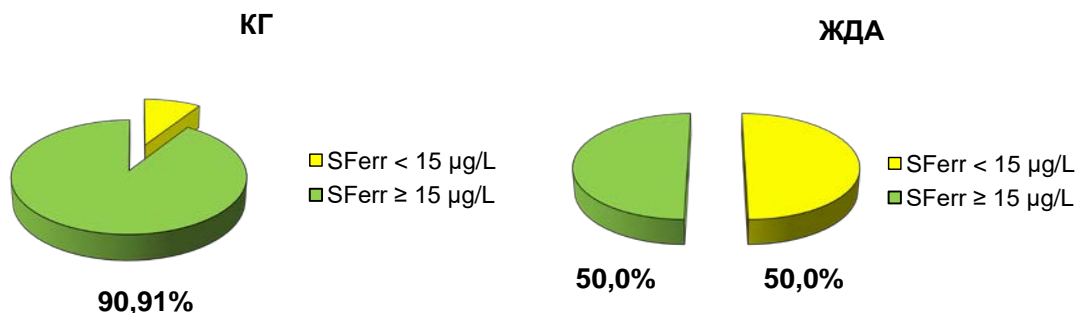


Фиг. 11. Сравнителна оценка на относителните дялове на деца в юношеска възраст със стойности на MCH <-2 SD от средното ниво и ≥ -2 SD от средното ниво между групата с ЖДА и контролна група (КГ). Данните са представени като %

Резултатите от изследването показаха, че при половината от децата с ЖДА се установяват стойности на еритроцитния индекс MCHC под долните референтни граници (-2 SD) за съответната възраст и пол (WHO, 2001). При 81,82% от децата в

контролната група бяха отчетени стойности на показателя в рамките на референтните граници, а при две от изследваните здрави контроли – стойности под долните референтни граници. Не се установи статистически значима разлика в относителните дялове на деца със стойности на МСНС под и в рамките на референтните граници между двете изследвани групи ($p=0,122$).

Относителният дял на деца с ЖДА, при които бяха установени подпрагови серумни нива на Ferr под $15 \mu\text{g/L}$, свидетелстващи за изчерпване на желязните резерви (WHO, 2001; WHO & CDC, 2007), възлиза на 50,0%. В контролната група 90,91% от децата са с надпрагови стойности на серумен Ferr, а при едно дете се отчете серумно ниво на Ferr под $15 \mu\text{g/L}$ (Фиг. 12). Установи се статистически значима разлика в стойностите на показателя, изразени като категорийна променлива, между двете изследвани групи (OR 10,0; 95% CI: 0,96-104,49; $p=0,045$).

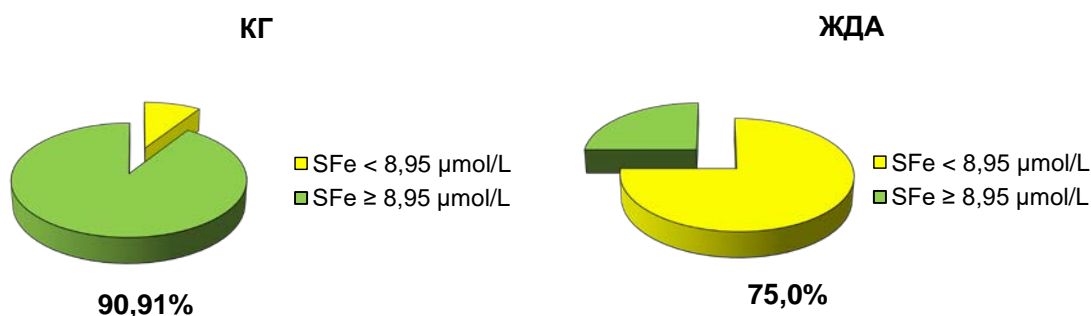


Фиг. 12. Сравнителна оценка на относителните дялове на деца в юношеска възраст със стойности на серумен Ferr (SFerr) < $15 \mu\text{g/L}$ и $\geq 15 \mu\text{g/L}$ между групата с ЖДА и контролна група (КГ). Данните са представени като %

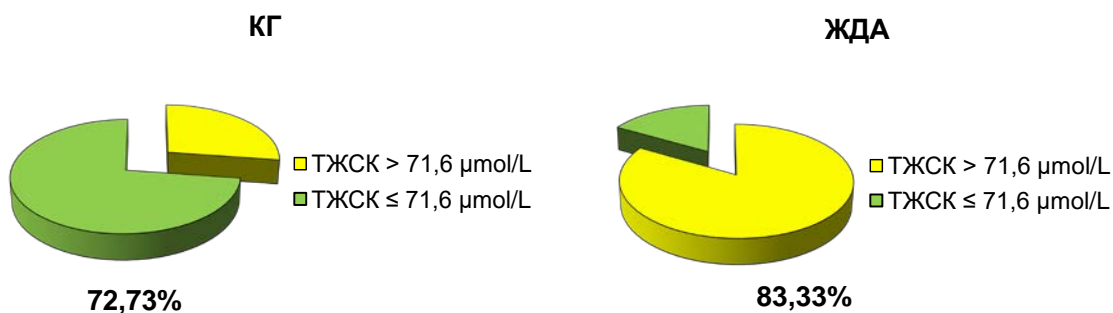
При използване на серумната концентрация на Fe като мярка за оценка на желязния статус се установи, че 75,0% от децата с ЖДА имат серумно Fe под праговата стойност $50 \mu\text{g/dL}$ ($8,95 \mu\text{mol/L}$), предложена от СЗО и CDC (2007 г.). При три деца с ЖДА показателят остава в рамките на референтните граници. При 90,91% от изследваните здрави контроли се наблюдават надпрагови стойности на серумно Fe, а при едно дете от контролната група – стойности под долната референтна граница (Фиг. 13). Установи се статистически значима разлика в стойностите на серумно Fe, изразени като категорийна променлива, между двете изследвани групи (OR 30,0; 95% CI: 2,63-342,74; $p=0,0022$).

Изхождайки от предложената от Zimmermann (2008 г.) прагова стойност на ТЖСК над $71,6 \mu\text{mol/L}$ ($400 \mu\text{g/dL}$), установихме, че при 83,33% от децата с ЖДА се наблюдава повишение на този показател. При две от децата в работната група не се

отчете повишение на ТЖСК. Относителният дял на деца с нормални стойности на ТЖСК в контролната група възлиза на 72,73%, а при три от изследваните здрави контроли се отчетоха повишени стойности (Фиг. 14). Установи се статистически значима разлика в относителните дялове на деца с нормални и повишени стойности на ТЖСК между двете изследвани групи (OR 13,33; 95% CI: 1,78-100,14; p=0,01).



Фиг. 13. Сравнителна оценка на относителните дялове на деца в юношеска възраст със стойности на серумно Fe (SFe) <8,95 µmol/L и ≥8,95 µmol/L между групата с ЖДА и контролна група (КГ). Данните са представени като %



Фиг. 14. Сравнителна оценка на относителните дялове на деца в юношеска възраст със стойности на ТЖСК >71,6 µmol/L и ≤71,6 µmol/L между групата с ЖДА и контролна група (КГ). Данните са представени като %

Като критерий за ЖД при изследваните от нас деца са използвани стойности на биохимичния показател на желязната обмяна SatTf под 16%, което е в съответствие с препоръките на CDC (1998 г.), WHO (2001 г.), както и на редица автори (Ullrich et al., 2005; Daniels, 2010).

Изхождайки от предложената от Choi и съавт. (2012 г.) прагова (cut-off) стойност на серумен хепсидин при деца ≤ 6,895 ng/mL, само при три от изследваните деца с ЖДА се установи понижение на този показател. При 72,73% от децата в работната група, както и при всички изследвани здрави контроли се отчетоха надпрагови стойности на серумния хепсидин. Не се установи статистически значима разлика в серумните

концентрации на хепсидин, изразени като категорийна променлива, между двете изследвани групи ($p=0,17$).

Определените от Ganz и съавт. (2008 г.) чрез ELISA метод референтни граници за серумен хепсидин са в диапазона от 29 до 254 ng/mL при мъже и от 17 до 286 ng/mL при жени. Включените в проучването деца в юношеска възраст с ЖДА и здрави контроли бяха разпределени в следните подгрупи: с ниски стойности на серумен хепсидин ($SHepc \leq 29$ ng/mL при момчета и ≤ 17 ng/mL при момичета) – 63,64% от децата с ЖДА и две от децата в контролната група; с нормални стойности на серумен хепсидин ($SHepc 30-254$ ng/mL при момчета и $18-286$ ng/mL при момичета) – четири от децата в работната група и шест от изследваните здрави контроли. И в двете изследвани групи не се отчетоха високи стойности на серумен хепсидин ($SHepc \geq 255$ ng/mL при момчета и ≥ 287 ng/mL при момичета).

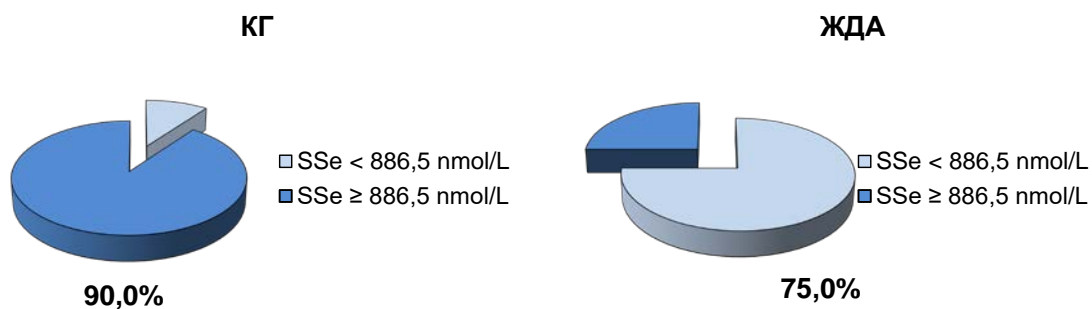
Според определените през 2014 г. от Manolov и съавт. чрез имуносорбентен ELISA метод референтни граници за серумен хепсидин за българската популация, изследваните деца в юношеска възраст от работната и контролната група бяха включени в три подгрупи: с ниски стойности на серумен хепсидин ($SHepc \leq 3,052$ ng/mL), в която попада едно дете с ЖДА; с нормални стойности на серумен хепсидин ($SHepc 3,053-37,750$ ng/mL) – 72,73% от изследваните деца с ЖДА и три от здравите деца; с високи стойности на серумен хепсидин ($SHepc \geq 37,751$ ng/mL) – две от децата в работната група и пет от контролната група.

И при двата използвани референтни интервала за серумен хепсидин не бяха установени статистически значими различия в относителните дялове на децата с ниски, нормални и високи стойности на показателя между двете изследвани групи ($p>0,05$).

Предложените от СЗО референтни стойности за серумни концентрации на Cu при мъже са в диапазона от 800 до 1200 $\mu\text{g/L}$ (12,59-18,88 $\mu\text{mol/L}$). При жени стойностите са с около 10 % по-високи от тези при мъже, което съответства на граници на референтната област от 880 до 1320 $\mu\text{g/L}$ или от 13,85 до 20,77 $\mu\text{mol/L}$ (WHO, 1996, 1998). Включените в проучването деца в юношеска възраст с ЖДА и здрави контроли бяха разпределени в следните подгрупи: с ниски стойности на серумната Cu ($SCu \leq 12,59$ $\mu\text{mol/L}$ при момчета и $\leq 13,85$ $\mu\text{mol/L}$ при момичета), с нормални стойности на серумната Cu ($SCu 12,6-18,88$ $\mu\text{mol/L}$ при момчета и $13,86-20,77$ $\mu\text{mol/L}$ при момичета) и с високи стойности на серумната Cu ($SCu \geq 18,89$ $\mu\text{mol/L}$ при момчета и $\geq 20,78$ $\mu\text{mol/L}$ при момичета). Не бяха установени статистически значими различия в

относителните дялове на децата с ниски, нормални и високи стойности на серумните концентрации на Си между двете изследвани групи ($p=0,19$).

При оценка на селеновия статус на изследваните лица е важно дали стойността на серумната концентрация на Se е достатъчна за глутатион пероксидаза (GPx)-1 активността. Използвайки стойност на серумна концентрация на Se от $70 \mu\text{g/L}$, съответстваща на $886,5 \text{ nmol/L}$, като прагова, над която плазмената GPx активност остава на постоянно ниво (Combs, 2001; Daniels, 2004), разпределението на децата от двете изследвани групи е следното: при $75,0\%$ от децата с ЖДА се отчетоха подпрагови стойности на серумния Se, свидетелстващи за нисък селенов прием. При три деца от работната група се наблюдават надпрагови стойности на показателя. Само при едно дете в контролната група серумната концентрация на Se е под $70 \mu\text{g/L}$ ($886,5 \text{ nmol/L}$), а при $90,0\%$ от изследваните здрави контроли се отчетоха надпрагови стойности. Установи се статистически значимо по-висок относителен дял на децата с подпрагови серумни концентрации на Se в групата с ЖДА спрямо контролната група (OR 27,0; 95% CI: 2,34-311,17; $p=0,004$), което се визуализира на Фиг. 15.



Фиг. 15. Сравнителна оценка на относителните дялове на деца в юношеска възраст с подпрагови стойности на серумен Se ($S\text{Se} < 886,5 \text{ nmol/L}$) и надпрагови стойности на серумен Se ($S\text{Se} \geq 886,5 \text{ nmol/L}$) между групата с ЖДА и контролна група (КГ). Данните са представени като %

Проучвания при бременни жени

Относителният дял на бременни жени с общ брой RBC в рамките на предложените от СЗО (2001 г.) референтни граници в началото на втория триместър възлиза на $57,14\%$ в групата с нормално протичаща бременност и на $53,85\%$ в групата с проблемна бременност. При шест от бременните жени във всяка от изследваните групи в този срок на бременността бяха отчетени стойности на общия брой RBC под долната референтна граница (-2 SD) $3,8 \times 10^{12}/\text{L}$ (WHO, 2001). С нарастване на гестационния срок в двете изследвани групи не бяха установени статистически значими промени в относителните

дялове на жените със стойности на RBC под и в рамките на референтните граници ($p > 0,05$). В групата с нормално протичаща бременност в началото на третия триместър относителният дял на бременни жени със стойности на RBC под долната референтна граница е 76,92%, а в групата с проблемна бременност – 83,33%. При три от жените с нормално протичаща бременност и при две от жените с проблемна бременност в този срок на бременността бяха отчетени стойности на RBC в рамките на референтните граници. Между двете групи не бяха установени статистически значими различия в относителните дялове на жените със стойности на RBC под и в рамките на референтните граници в двата изследвани срока на бременността ($p > 0,05$).

При 64,29% от жените с нормално протичаща бременност и при 76,92% от жените с проблемна бременност в началото на втория триместър се наблюдават стойности на Hb концентрация над праговото (cut-off) ниво при бременни жени 110 g/L, което е критерий за Hb дефицит (WHO, 2001, 2011). При пет от бременните жени в контролната група и при три от жените в групата с проблемна бременност бяха отчетени подпрагови стойности на Hb концентрация. Хемоглобиновият дефицит при всички засегнати жени в този срок на бременността беше определен като лек (Hb концентрация 100-109 g/L). С нарастване на гестационния срок в двете изследвани групи не бяха установени статистически значими промени в относителните дялове на жените с подпрагови и нормални стойности на Hb концентрация ($p > 0,05$). При всички жени с Hb дефицит в началото на третия триместър той беше категоризиран като лек, с изключение на една жена от работната група с умерен Hb дефицит (Hb концентрация 70-99 g/L). Между двете групи бременни жени не бяха установени статистически значими различия в относителните дялове на жените с подпрагови и нормални стойности на Hb концентрация в двата изследвани срока на бременността ($p > 0,05$).

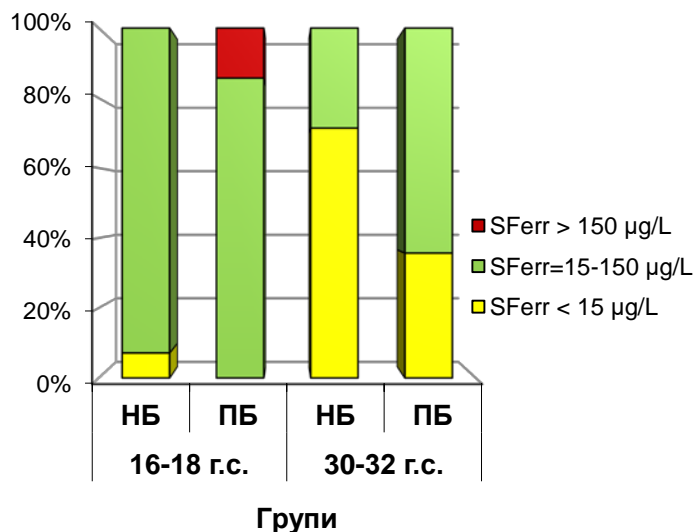
Според критериите на СЗО стойности на Hct под 0,33 L/L при бременни жени са показател за анемия (WHO, 2001). Относителният дял на бременни жени с надпрагови стойности на Hct възлиза на 71,43% в групата с нормално протичаща бременност и на 61,54% в групата с проблемна бременност в началото на втория триместър. При четири от бременните жени в контролната група и при пет от жените в работната група бяха отчетени подпрагови стойности на Hct в този срок на бременността. С нарастване на гестационния срок в двете изследвани групи не бяха установени статистически значими промени в относителните дялове на жените с подпрагови и нормални стойности на Hct ($p > 0,05$). Между двете групи бременни жени не бяха установени статистически

значими различия в относителните дялове на жените с подпрагови и нормални стойности на Hct в двата изследвани срока на бременността ($p>0,05$).

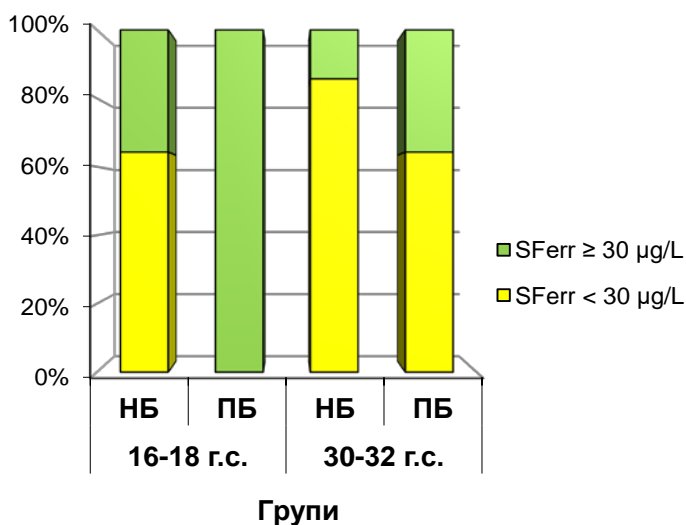
При по-голяма част от бременните жени в двете изследвани групи в началото на втория триместър и при всички изследвани бременни жени в началото на третия триместър бяха установени стойности на еритроцитни индекси (MCV, MCH и MCHC) в рамките на референтните граници, предложени от СЗО (WHO, 2001).

Праговото ниво на серумен Ferr, под което резервите от Fe се считат за изчерпани, е 15 $\mu\text{g/L}$. Стойности $> 150 \mu\text{g/L}$ свидетелстват за желязно претоварване или инфекция (WHO, 2001; WHO & CDC, 2007). В началото на втория триместър в групата с нормално протичаща бременност 92,86% от изследваните жени са с надпрагови серумни концентрации на Ferr, като няма участнички със стойности, свидетелстващи за желязно претоварване, и само една от жените има данни за изчерпване на желязните резерви (Фиг. 16). В групата с проблемна бременност всички изследвани жени са с надпрагови нива на серумен Ferr, като при две от тях стойностите са в територията на желязното претоварване и не се отчетоха резултати, свидетелстващи за изчерпване на желязните резерви. С нарастване на гестационния срок в групата с нормално протичаща бременност се наблюдава отчетлива промяна в относителните дялове на жените с под- и надпрагови стойности на серумен Ferr (OR 32,5; 95% CI: 3,13-337,82; $p=0,0007$). В тази група се установи съществено нарастване на относителния дял на жените с изчерпване на желязните резерви, който достигна до 71,43% в началото на третия триместър, за сметка на относителния дял на жените с надпрагови стойности на показателя. И в двете изследвани групи бременни жени в по-късния срок на бременността не се наблюдават серумни концентрации на Ferr в територията на желязното претоварване.

При използване на прагова (cut-off) стойност на серумен Ferr под 30 $\mu\text{g/L}$ като критерий за ЖД установихме, че в групата с нормално протичаща бременност в началото на втория триместър 64,29% от жените са с данни за ЖД, докато в групата с проблемна бременност всички бременни жени са с надпрагови серумни концентрации на Ferr ($p=0,0003$). С напредване на гестационния срок в групата с проблемна бременност се наблюдава отчетливо намаляване на относителния дял на бременни жени с надпрагови стойности на серумен Ferr ($p=0,0003$), в резултат на което не се отчита статистическа значима разлика в относителните дялове на жените със стойности, свидетелстващи за ЖД, между двете изследвани групи в началото на третия триместър ($p=0,192$; Фиг. 17).



Фиг. 16. Сравнителна оценка на относителните дялове на бременни жени с изчерпване на желязните резерви (SFerr < 15 µg/L), със стойности на SFerr 15-150 µg/L и с данни за желязно претоварване (SFerr > 150 µg/L) между групите с нормално протичаща (НБ) и проблемна бременност (ПБ) в началото на втория (16-18^{та} г.с.) и началото на третия триместър (30-32^{ра} г.с.). Данните са представени като %

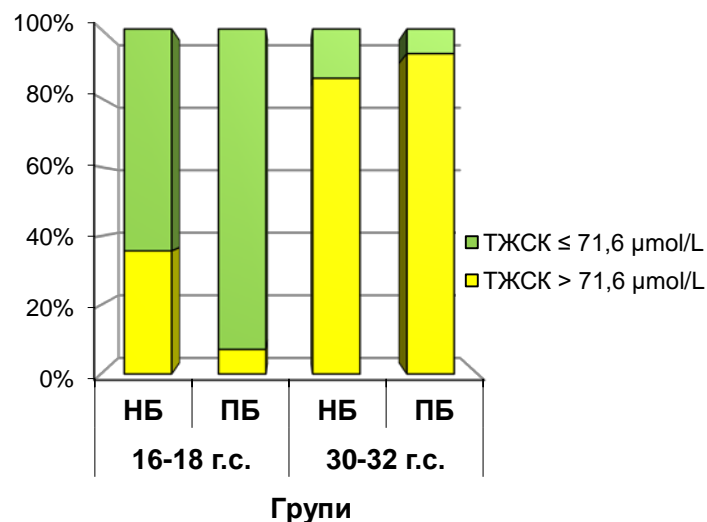


Фиг. 17. Сравнителна оценка на относителните дялове на бременни жени с ЖД, определен въз основа на серумния Ferr (µg/L), между групите с нормално протичаща (НБ) и проблемна бременност (ПБ) в началото на втория (16-18^{та} г.с.) и началото на третия триместър (30-32^{ра} г.с.). Данните са представени като %

Изхождайки от предложените от СЗО и Центровете за контрол и превенция на заболяванията в САЩ (WHO & CDC, 2007) референтни граници за серумно Fe 50-120 µg/dL (8,95-21,49 µmol/L), в началото на втория триместър и в двете изследвани групи преобладават относителните дялове на жените с нормален желязен статус – 64,29% в групата с нормално протичаща бременност и 71,43% в групата с проблемна бременност. При пет от жените с нормално протичаща бременност и при четири от

жените с проблемна бременност стойностите на показателя са в територията на желязното претоварване. В този срок на бременността няма участнички със серумни нива на Fe под праговата стойност 8,95 $\mu\text{mol/L}$ (50 $\mu\text{g/dL}$), свидетелстващи за ЖД. С нарастване на гестационния срок в двете изследвани групи не бяха установени статистически значими промени в относителните дялове на жените с ЖД, нормален желязен статус и желязно претоварване, определени въз основа на серумното Fe ($p>0,05$). И в двете групи в началото на третия триместър се запазва преобладаващият относителен дял на жените с нормален желязен статус – 78,57% при жените с нормално протичаща бременност и 64,29% при жените с проблемна бременност.

При използване на предложената от Zimmermann (2008 г.) прагова стойност на ТЖСК над 71,6 $\mu\text{mol/L}$ (400 $\mu\text{g/dL}$) установихме, че в началото на втория триместър само пет от жените с нормално протичаща бременност и една от жените с проблемна бременност са с повишени стойности на ТЖСК, свидетелстващи за ЖД. С напредване на гестационния срок се наблюдава отчетливо нарастване на относителните дялове на бременните жени с повишен серумен Fe-свързващ потенциал в групата с нормално протичаща бременност (OR 10,8; 95% CI: 1,69-68,94; $p=0,009$) и в групата с проблемна бременност (OR 169,0; 95% CI: 9,52-2999,93; $p=0,0001$). В началото на третия триместър относителните дялове на жените с ЖД, определен чрез показателя ТЖСК, достигат до 85,71% в контролната група и до 92,86% в работната група (Фиг. 18).



Фиг. 18. Сравнителна оценка на относителните дялове на бременни жени с повишени стойности на ТЖСК ($\mu\text{mol/L}$), свидетелстващи за ЖД, между групите с нормално протичаща (НБ) и проблемна бременност (ПБ) в началото на втория (16-18^{та} г.с.) и началото на третия триместър (30-32^{ра} г.с.). Данните са представени като %

При оценка на желязния статус според стойностите на SatTf в двете изследвани групи бременни жени използвахме препоръчаните от Американската National Kidney Foundation референтни граници (Asare, 2008), които се съобщават и от Muñoz и съавт. (2009 г.) и Daniels (2010 г.). В двете изследвани групи бяха определени относителните дялове на бременните жени с ЖД ($\text{SatTf} \leq 20\%$), с нормален желязен статус ($\text{SatTf} 21-50\%$) и с желязно претоварване ($\text{SatTf} \geq 51\%$). В началото на втория триместър в двете групи преобладават резултати, свидетелстващи за нормално насищане на трансферина (Tf) – 85,71% в групата с нормално протичаща бременност и 78,57% в групата с проблемна бременност. С напредване на гестационния срок нарастват относителните дялове на бременните жени с данни за ЖД за сметка на относителните дялове на жените с нормален желязен статус, но без достигане на възприетото ниво на статистическа значимост ($p > 0,05$). И в двете изследвани групи в началото на третия триместър не се наблюдават резултати, свидетелстващи за желязно претоварване.

Между двете изследвани групи с нормално протичаща и проблемна бременност не бяха установени статистически значими различия в относителните дялове на жените с ЖД, с нормален желязен статус и с данни за желязно претоварване, определени въз основа на биохимичните показатели на желязната обмяна серумно Fe, ТЖСК и SatTf в двата изследвани срока на бременността ($p > 0,05$).

Изхождайки от предложената от Pasricha и съавт. (2011 г.) като диагностичен показател за ЖД прагова (cut-off) стойност на серумен хепсидин под 8 ng/mL, в началото на втория триместър 66,67% от изследваните жени с нормално протичаща бременност и 50,0% от жените с проблемна бременност са с данни за ЖД. С напредване на гестационния срок в двете изследвани групи не се наблюдават статистически значими промени в относителните дялове на жените с ЖД, определен въз основа на серумния хепсидин ($p > 0,05$). Между групите с нормално протичаща и проблемна бременност не се установи статистически значима разлика в относителните дялове на жените с ЖД, отчетен въз основа на серумния хепсидин ($p > 0,05$).

Според определените от Ganz и съавт. (2008 г.) чрез ELISA метод референтни граници за серумен хепсидин, включените в проучването бременни жени с нормално протичаща и проблемна бременност бяха разпределени в следните подгрупи: с ниски стойности на серумен хепсидин ($\text{SHerc} \leq 17 \text{ ng/mL}$) и с нормални стойности на серумен хепсидин ($\text{SHerc} 18-286 \text{ ng/mL}$), като в двата изследвани срока на бременността не се отчетоха високи стойности на серумен хепсидин ($\text{SHerc} \geq 287 \text{ ng/mL}$). И в двете групи бременни жени в двата проучвани срока на бременността преобладават относителните

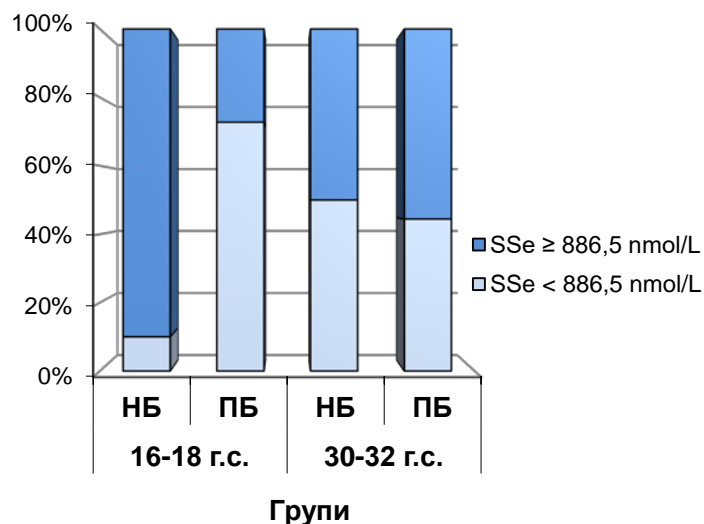
дялове на жените с ниски стойности на серумен хепсидин. Според определените през 2014 г. от Manolov и съавт. чрез имуносорбентен ELISA метод референтни граници за серумен хепсидин за българската популация, изследваните жени с нормално протичаща и проблемна бременност бяха включени в три подгрупи: с ниски стойности на серумен хепсидин ($SHepc \leq 3,052 \text{ ng/mL}$), с нормални стойности на серумен хепсидин ($SHepc 3,053-37,750 \text{ ng/mL}$) и с високи стойности на серумен хепсидин ($SHepc \geq 37,751 \text{ ng/mL}$). И при двата използвани референтни интервала за серумен хепсидин не беше установено статистически значимо влияние на срока на бременността върху стойностите на показателя, както и разлика в относителните дялове на бременните жени с ниски, нормални и високи стойности на серумен хепсидин между двете изследвани групи ($p > 0,05$).

Определените от СЗО референтни стойности за серумни концентрации на Cu при жени са с около 10 % по-високи от стойностите за мъже, които са в диапазона от 800 до 1200 $\mu\text{g/L}$ (80-120 $\mu\text{g/dL}$). Границите на референтната област за жени следователно съответстват на 880 до 1320 $\mu\text{g/L}$ или 13,85 до 20,77 $\mu\text{mol/L}$ (WHO, 1996, 1998). При всички изследвани бременни жени в двете групи в двата проучвани срока на бременността се установиха стойности на серумните концентрации на Cu над посочената горна граница на референтната област.

Използвайки стойност на серумна концентрация на Se от 70 $\mu\text{g/L}$, съответстваща на 886,5 pmol/L , като прагова, над която плазмената GPx активност остава на постоянно ниво (Combs, 2001; Daniels, 2004), установихме, че в началото на втория триместър при 72,73% от жените с проблемна бременност и само при една от жените с нормално протичаща бременност се отчитат подпрагови стойности на серумен Se, свидетелстващи за нисък селенов прием (OR 24,0; 95% CI: 2,06-279,63; $p=0,006$; Фиг. 19). С нарастване на гестационната възраст в началото на третия триместър относителните дялове на жените с подпрагови серумни концентрации на Se в двете изследвани групи почти се изравниха и не се отчита статистически значима разлика между тях ($p=0,586$).

При отчитане на железния, медния и селеновия статус на изследваните бременни жени е необходимо да се има предвид и дали те са лекувани с препарати, съдържащи Fe, Cu и Se, през периода на проучването. Получените от нас данни показват, че в началото на втория триместър пет от жените в групата с проблемна бременност и една жена с нормално протичаща бременност са приемали Fe-съдържащи препарати. В началото на третия триместър броят на жените, приемащи железни препарати, нараства

в двете изследвани групи – 64,29% от жените в работната група и четири жени в контролната група, но без достигане на възприетото ниво на статистическа достоверност ($p > 0,05$). Приеманите Fe-съдържащи препарати са под форма на феро- (Fe^{2+}) и фери- (Fe^{3+}) соли на желязото за перорално приложение.



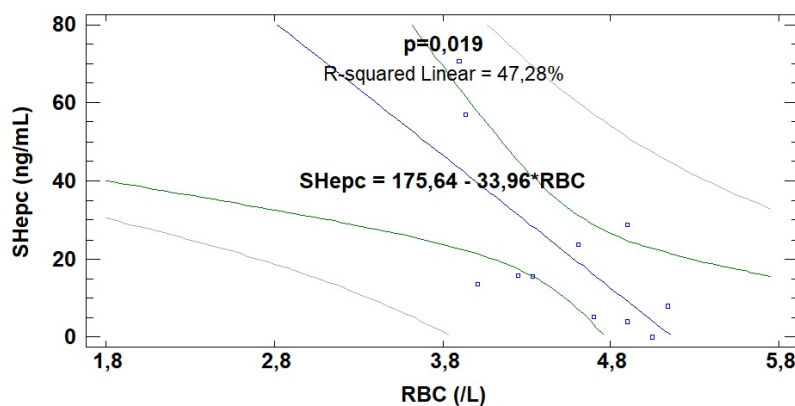
Фиг. 19. Сравнителна оценка на относителните дялове на бременни жени с подпрагови стойности на серумен Se ($\text{SSe} < 886,5 \text{ nmol/L}$) и надпрагови стойности на серумен Se ($\text{SSe} \geq 886,5 \text{ nmol/L}$) между групите с нормално протичаща (НБ) и проблемна бременност (ПБ) в началото на втория (16-18^{та} г.с.) и началото на третия триместър (30-32^{ра} г.с.). Данните са представени като %

По отношение приложението на препарати, съдържащи комбинации от микроелементи, през периода на проучването, нашите резултати показват, че значителна част от жените в групата с проблемна бременност – 57,14% в началото на втория триместър и 78,57% в началото на третия, са приемали комбинирани препарати, съдържащи Fe, Cu и Se. Броят на жените, приемали комбинирани микроелементни препарати в контролната група, е нисък в двата проучвани периода на бременността – една жена в началото на втория триместър и три в началото на третия триместър. Сравнително малкият брой бременни жени, за които са налице данни, че са приемали желязни препарати и комбинирани микроелементни препарати, съдържащи Fe, Cu и Se, през периода на проучването, не позволява да се направят надеждни заключения за ефекта им върху показатели на желязния, медния и селеновия статус.

Установяване на зависимостите между серумните концентрации на хепсидин, IL-6, Cu и Se, хематологичните показатели и биохимичните маркери на желязната обмяна при изследваните лица от работните и контролните групи

Проучвания при деца в юношеска възраст

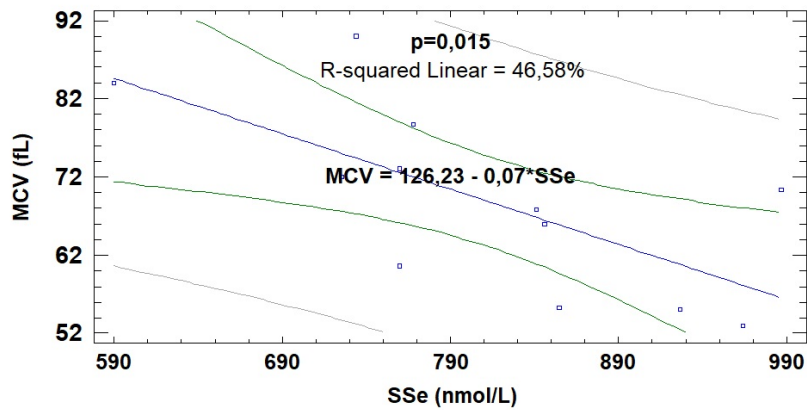
При извършения корелационен анализ беше установена значителна по сила отрицателна зависимост между серумните нива на хепсидин и стойностите на общия брой RBC в групата деца с ЖДА ($r=-0,688$; $p=0,019$; Фиг. 20). Нашите резултати показват, че при децата с ЖДА серумният хепсидин намалява с нарастване на общия брой RBC.



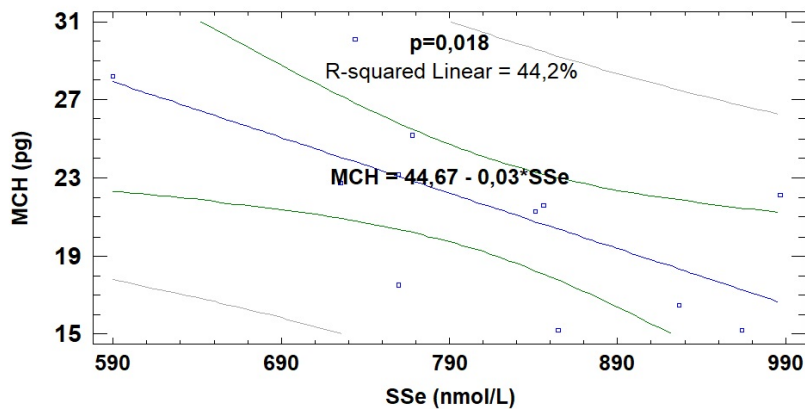
Фиг. 20. Регресионен модел на корелационна зависимост между общ брой RBC и серумни концентрации на хепсидин (SHepc) при деца в юношеска възраст с ЖДА

Не бяха наблюдавани значими взаимовръзки на серумния хепсидин с концентрацията на Hb, Hct, еритроцитните индекси, биохимични показатели на желязната обмяна и възпалителния маркер IL-6 ($p>0,05$).

Серумните концентрации на Se показаха значителни по сила отрицателни корелационни зависимости с еритроцитните индекси MCV ($r=-0,683$; $p=0,015$; Фиг. 21) и MCH ($r=-0,665$; $p=0,018$; Фиг. 22) при децата с ЖДА.

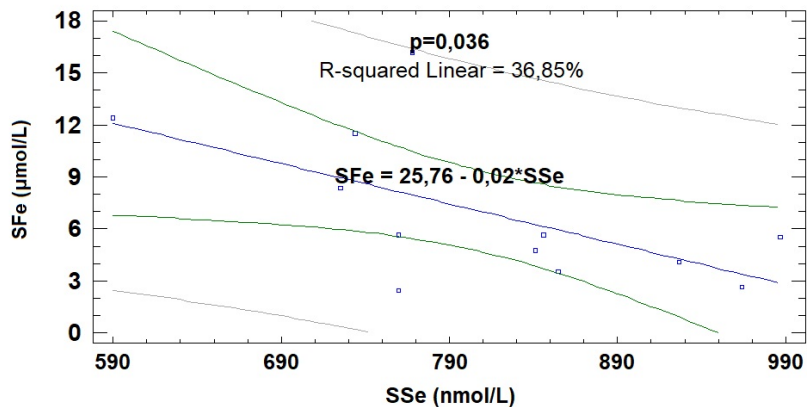


Фиг. 21. Регресионен модел на корелационна зависимост между серумна концентрация на Se (SSe) и MCV при деца в юношеска възраст с ЖДА

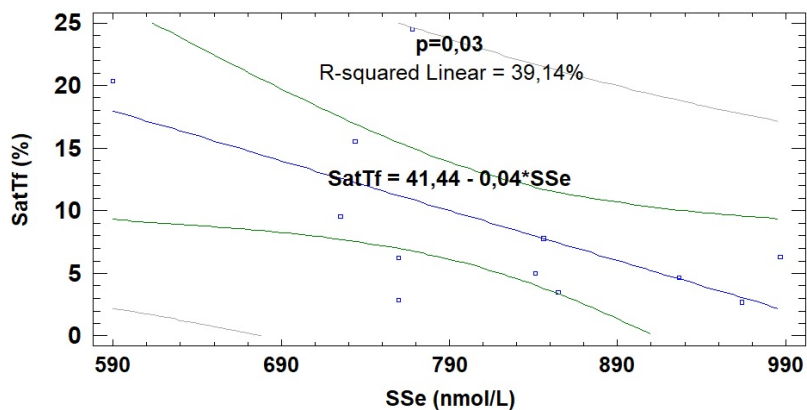


Фиг. 22. Регресионен модел на корелационна зависимост между серумна концентрация на Se (SSe) и MCH при деца в юношеска възраст с ЖДА

В същата група се установиха и значителни по сила корелации между серумните нива на Se и биохимични маркери на желязния метаболизъм – отрицателни със серумното ниво на Fe ($r=-0,607$; $p=0,036$; Фиг. 23) и SatTf ($r=-0,626$; $p=0,03$; Фиг. 24) и положителна с ТЖСК ($r=0,617$; $p=0,033$; Фиг. 25).

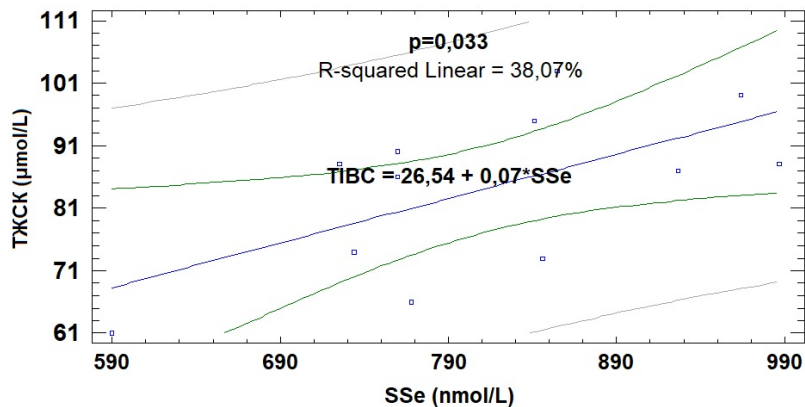


Фиг. 23. Регресионен модел на корелационна зависимост между серумни нива на Se (SSe) и Fe (SFe) при деца в юношеска възраст с ЖДА



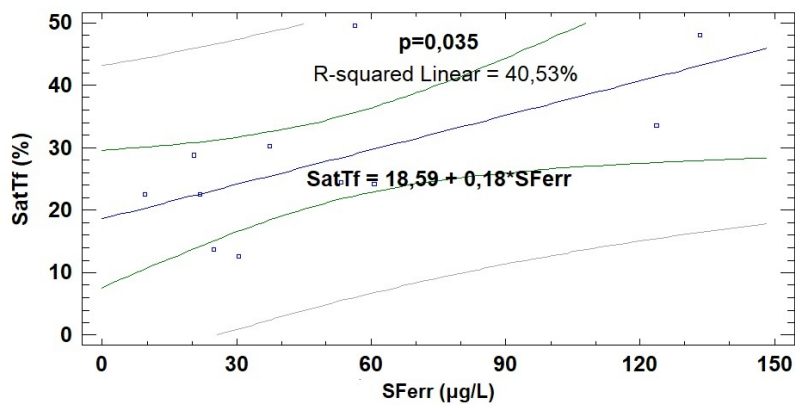
Фиг. 24. Регресионен модел на корелационна зависимост между серумна концентрация на Se (SSe) и SatTf при деца в юношеска възраст с ЖДА

При изследване на взаимовръзките между биохимичните маркери на желязната обмяна се установи наличие на статистически значима пряка зависимост между серумното ниво на Ferr и SatTf в групата здрави деца ($r=0,637$; $p=0,035$; Фиг. 26). В групата с ЖДА се доказва наличие на голяма по сила отрицателна взаимовръзка между серумното Fe и ТЖСК ($r=-0,808$; $p=0,002$; Фиг. 27).

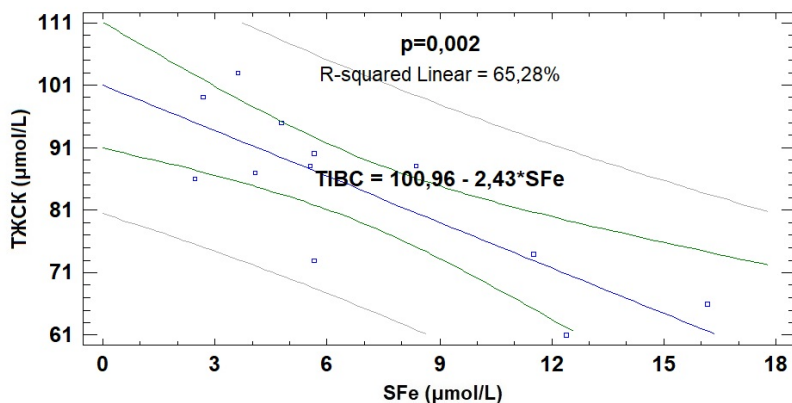


Фиг. 25. Регресионен модел на корелационна зависимост между серумна концентрация на Se (SSe) и ТЖСК при деца в юношеска възраст с ЖДА

Нашите резултати показват, че с повишаване на резервите от Fe в организма нараства насищането с Fe на транспортния белтък Tf, а с намаляване на серумното Fe нараства серумният Fe-свързващ потенциал.



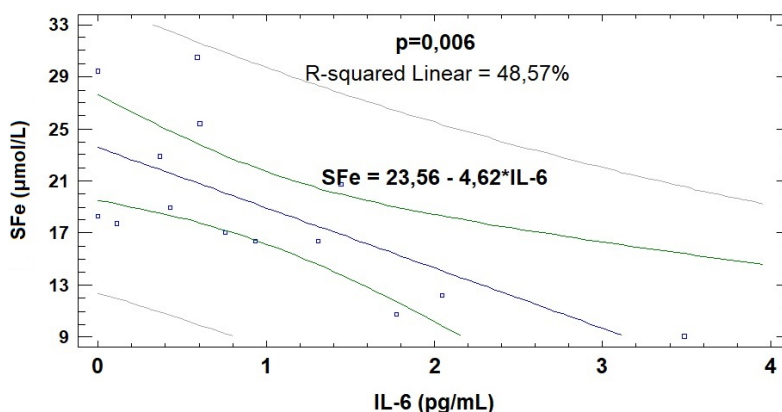
Фиг. 26. Регресионен модел на корелационна зависимост между серумно ниво на Ferr (SFerr) и SatTf при здрави деца в юношеска възраст



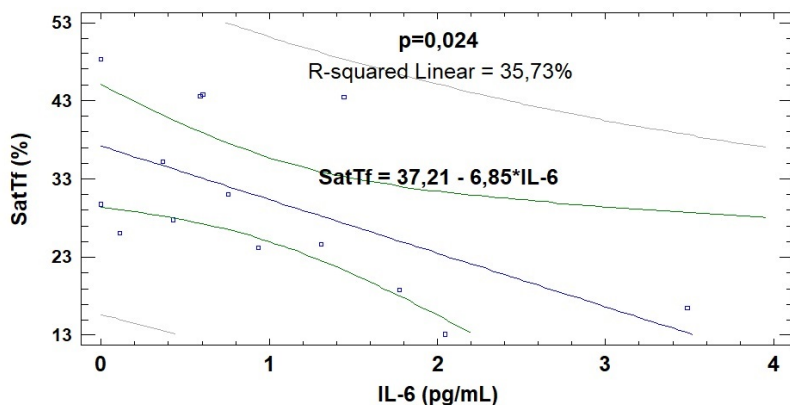
Фиг. 27. Регресионен модел на корелационна зависимост между серумно ниво на Fe (SFe) и ТЖСК при деца в юношеска възраст с ЖДА

Проучвания при бременни жени

В групата с проблемна бременност бяха установени значителни по сила отрицателни корелации между серумните нива на IL-6 и стойностите на серумно Fe ($r=-0,697$; $p=0,006$; Фиг. 28) и SatTf ($r=-0,598$; $p=0,024$; Фиг. 29), регистрирани в пробите от 16-18^{та} г.с. Нашите резултати показват, че с нарастване на серумните концентрации на IL-6 при жените с проблемна бременност се понижават стойностите на серумно Fe и SatTf.

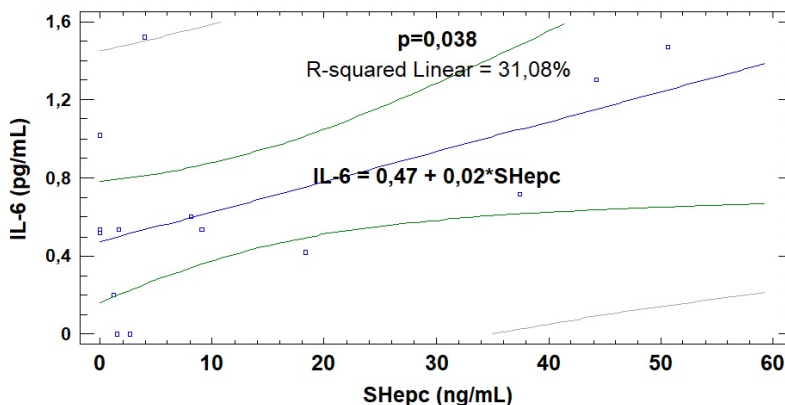


Фиг. 28. Регресионен модел на корелационна зависимост между серумни концентрации на IL-6 и Fe (SFe) при жени с проблемна бременност в 16-18^{та} г.с.



Фиг. 29. Регресионен модел на корелационна зависимост между серумни концентрации на IL-6 и SatTf при жени с проблемна бременност в 16-18^{та} г.с.

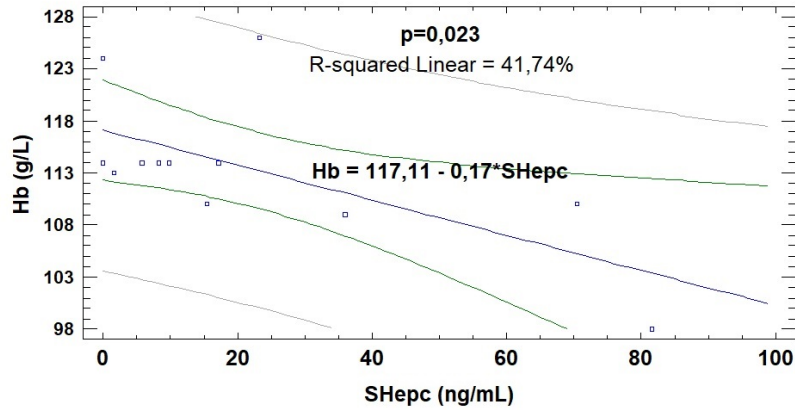
При пробите от 30-32^{ра} г.с. в групата с нормално протичаща бременност се доказва наличие на значителна по сила пряка зависимост между серумните концентрации на хепсидин и IL-6 ($r=0,558$; $p=0,038$; Фиг. 30), докато при жените с проблемна бременност не беше установена значима връзка между тези величини.



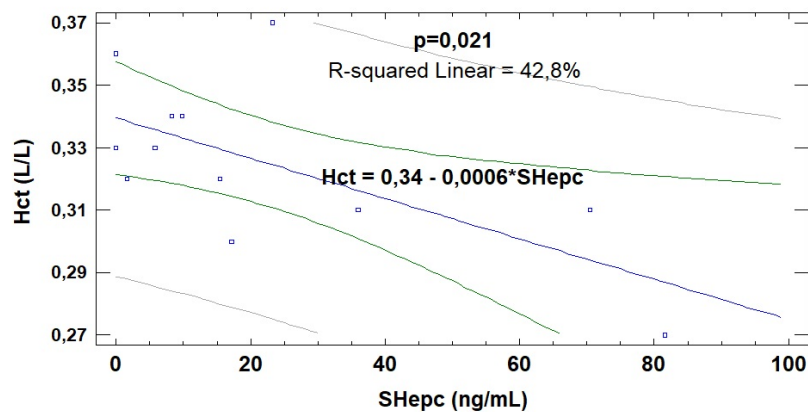
Фиг. 30. Регресионен модел на корелационна зависимост между серумни концентрации на хепсидин (SHepc) и IL-6 при жени с нормално протичаща бременност в 30-32^{ра} г.с.

В групата с проблемна бременност при пробите от 30-32^{ра} г.с. се наблюдават значителни по сила отрицателни корелации между серумните нива на хепсидин и стойностите на Hb концентрация ($r=-0,646$; $p=0,023$; Фиг. 31) и Hct ($r=-0,654$; $p=0,021$;

Фиг. 32). Нашите резултати показват, че с нарастване на серумния хепсидин при жените с проблемна бременност се понижават концентрацията на Hb и хематокрита.



Фиг. 31. Регресионен модел на корелационна зависимост между серумно ниво на хепсидин (SHepc) и концентрация на Hb при жени с проблемна бременност в 30-32^{ра} г.с.

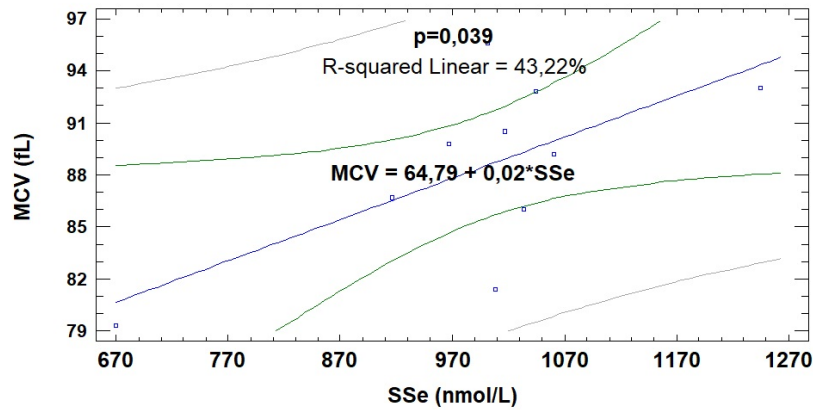


Фиг. 32. Регресионен модел на корелационна зависимост между серумна концентрация на хепсидин (SHepc) и Hct при жени с проблемна бременност в 30-32^{ра} г.с.

При жените с нормално протичаща бременност не бяха установени значими взаимовръзки на серумния хепсидин и IL-6 с изследваните хематологични показатели и биохимични маркери на желязната обмяна в двата проучвани срока на бременността.

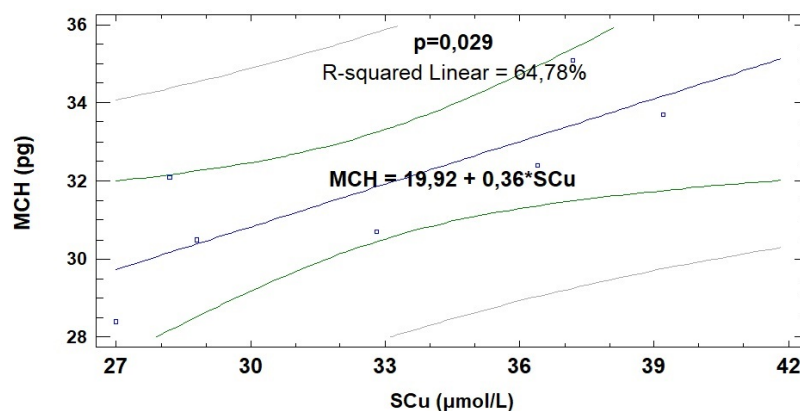
Серумните концентрации на Se показаха значителна по сила положителна корелация с еритроцитния индекс MCV при жените с нормално протичаща бременност ($r=0,657$;

$p=0,039$) за пробите от 16-18^{та} г.с. (Фиг. 33), докато в групата с проблемна бременност не беше установена значима зависимост между тези величини.



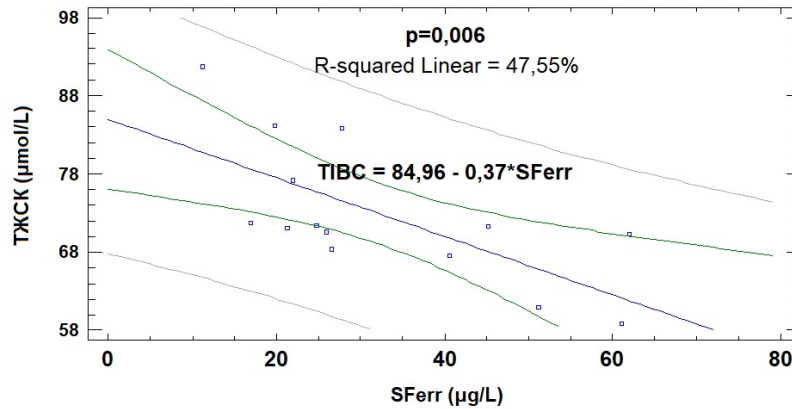
Фиг. 33. Регресионен модел на корелационна зависимост между серумна концентрация на Se (SSe) и MCV при жени с нормално протичаща бременност в 16-18^{та} г.с.

Серумните концентрации на Cu не показаха значими взаимовръзки с изследваните показатели при жените с нормално протичаща бременност, а в групата с проблемна бременност се доказва наличие на положителна корелация с голяма сила на връзката между серумната Cu и еритроцитния индекс MCH ($r=0,805$; $p=0,029$), регистрирана в пробите от 30-32^{ра} г.с. (Фиг. 34).



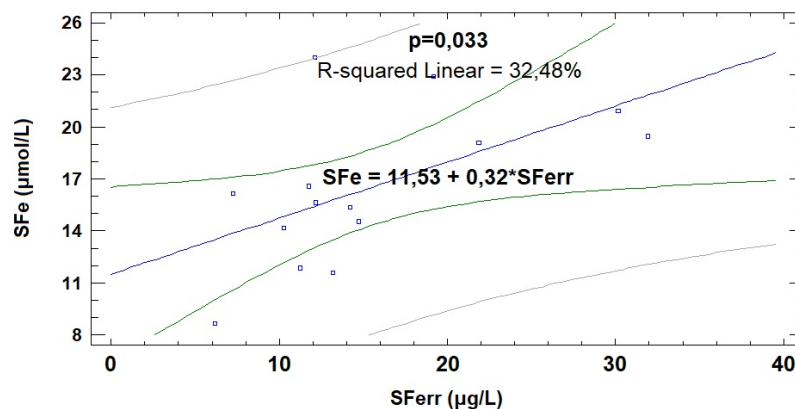
Фиг. 34. Регресионен модел на корелационна зависимост между серумна концентрация на Cu (SCu) и MCH при жени с проблемна бременност в 30-32^{ра} г.с.

При изследване на взаимовръзките между биохимичните маркери на желязната обмяна се установи наличие на значителна по сила отрицателна зависимост между серумното ниво на Ferr и ТЖСК в групата с нормално протичаща бременност ($r=-0,69$; $p=0,006$) за пробите от 16-18^{та} г.с (Фиг. 35). Нашите резултати показват, че с намаляване на резервите от Fe нараства серумният Fe-свързващ потенциал.

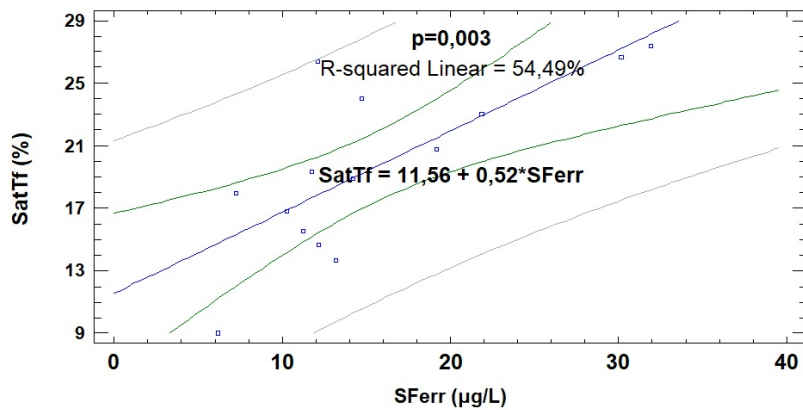


Фиг. 35. Регресионен модел на корелационна зависимост между серумно ниво на Ferr (Ferr) и ТЖСК при жени с нормално протичаща бременност в 16-18^{та} г.с.

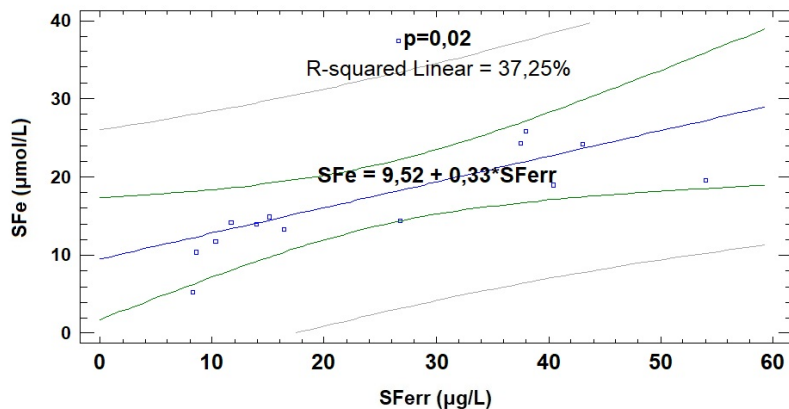
При двете изследвани групи бременни жени серумните нива на Ferr показваха положителни корелации със серумното Fe и SatTf в 30-32^{ра} г.с. (Фигури 36, 37, 38).



Фиг. 36. Регресионен модел на корелационна зависимост между серумни нива на Ferr (SFerr) и Fe (SFe) при жени с нормално протичаща бременност в 30-32^{ра} г.с.

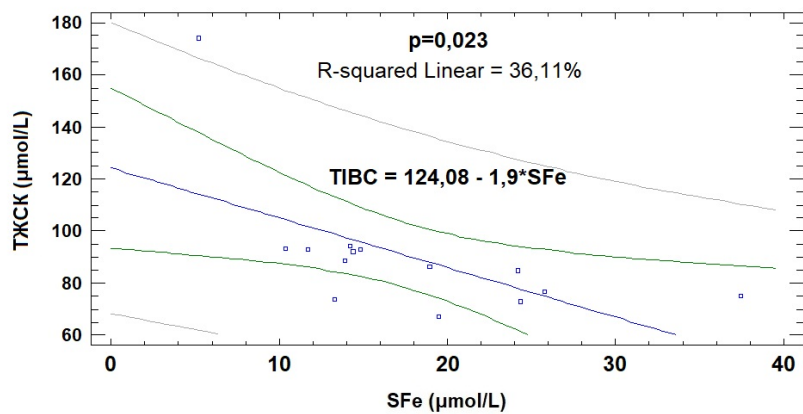


Фиг. 37. Регресионен модел на корелационна зависимост между серумни нива на Ferr (SFerr) и SatTf при жени с нормално протичаща бременност в 30-32^{па} г.с.



Фиг. 38. Регресионен модел на корелационна зависимост между серумни нива на Ferr (SFerr) и Fe (SFe) при жени с проблемна бременност в 30-32^{па} г.с.

При жените с проблемна бременност в същия гестационен срок към тези зависимости се добави и значителна по сила отрицателна корелация между серумното Fe и ТЖСК ($r=-0,601$; $p=0,023$; Фиг. 39). Нашите резултати показват, че резервите от Fe в организма определят серумната концентрация на Fe и насищането с Fe на транспортния белтък Tf, а с нарастване на серумното Fe намалява серумният Fe-свързващ потенциал.



Фиг. 39. Регресионен модел на корелационна зависимост между серумно Fe (SFe) и ТЖСК при жени с проблемна бременност в 30-32^{ра} г.с.

Обсъждане на резултатите

Микроелементът желязо играе важна роля в редица клетъчни, метаболитни и физиологични процеси (Rishi et al., 2015). Поради повишените потребности от микронутриенти и често срещаните ограничения в храненето момичетата в юношеска възраст и жените в репродуктивна възраст са рискови групи за развитие на микронутриентни дефицити, в това число и ЖД. С особено висок риск се отличава периодът на бременността (Fayet-Moore et al., 2014). В България железният дефицит е много разпространен, най-вече при деца и бременни жени (Петрова и съавт., 2009; Рангелова и съавт., 2011; Йорданова, 2017). Желязодефицитната анемия е крайният стадий на един относително продължителен процес на влошаване в железния статус на индивида. Тя е само върхът на айсберга в желязодефицитните състояния. При деца ЖДА най-често се среща във възрастовите групи 6 месеца – 3 години и 11-17 години (Lokeshwar & Shah, 2021). Наличието на ЖД в детска и юношеска възраст се свързва с нарушения на познавателните способности и поведенчески разстройства, които могат да бъдат необратими и дълготрайни въпреки проведеното лечение и корекция на ЖД (WHO, 2001; Zlotkin, 2003; Black et al., 2011; Pasricha et al., 2013). Желязодефицитната анемия е свързана и с нарушения на растежа и физическото развитие, за което свидетелстват данни от редица проучвания (Tatala et al., 1998; Петрова и съавт., 2009; Рангелова и съавт., 2011; Zhao et al., 2012). Недостигът на Fe по време на бременността води до преждевременно раждане, ниско тегло при раждането, нарастване на майчината и детска заболеваемост и смъртност и дългосрочни неблагоприятни ефекти върху познавателните способности на децата (WHO, 2001; Stoltzfus et al., 2004; Gleason & Scrimshaw, 2007; Pasricha et al., 2010).

От друга страна, именно свойствата, които определят есенциалната роля на желязото в човешкия организъм, са в основата на неговите токсични ефекти. При излишък от Fe свободните Fe²⁺ йони участват в реакциите на Fenton и Haber-Weiss, водещи до образуване на ROS (Arredondo & Nunez, 2005; Петков и съавт., 2008; Loreal et al., 2014). Следователно е необходима прецизна регулация на желязната хомеостаза с оглед както задоволяване на потребностите от Fe на организма, така и за предотвратяване на неговите токсични ефекти.

В последните години все повече нарастват данните за водещата роля на пептидният хормон хепсидин в регулацията на желязната хомеостаза и за факторите, регулиращи хепсидиновия синтез и секреция. По-голяма част от резултатите са от проучвания,

проведени *in vitro* или при миши модели. Проучванията, проведени *in vivo* при хора, са предимно при пациенти с хемохроматоза (Ganz et al., 2008; Kemna, Kartikasari, et al., 2008), хемоглобинопатии (Kearney et al., 2007; Origa et al., 2007), хронична бъбречна недостатъчност (Ganz et al., 2008) и инфекциозни или възпалителни заболявания (Nemeth et al., 2003; Ganz et al., 2008; Theurl et al., 2009). Получените данни не могат да бъдат директно приложени по отношение на детската и юношеска възраст, ЖДА или периода на бременността.

Установено е, че експресията на хепсидин се стимулира от тъканните резерви на Fe, насищането на трансферина с Fe (SatTf) и при възпаление, а се потиска в условия на хипоксия и повишена активност на еритропоезата (Rishi et al., 2015). Все още остава неизяснен механизмът, чрез който активността на еритропоезата регулира синтеза на хепсидин. Тъй като еритропоезата е процесът в организма, който консумира най-много Fe, се допуска, че повишената еритропоетична активност може да влияе върху експресията на хепсидин чрез спад в нивото на циркулиращото Tf-свързано Fe и последващо понижение на тъканното Fe в резултат на повишеното му усвояване (Pak et al., 2006).

При сравняване на резултатите за серумните концентрации на хепсидин между групите деца в юношеска възраст установихме, че децата с ЖДА имат значимо по-ниско серумно ниво на хепсидин спрямо контролната група. Подобни на нашите резултати се съобщават и от други автори в проучвания на серумните и уринни нива на хепсидин при лица, включително и в юношеска възраст, с ЖД, ЖДА и здрави контроли (Cherian et al., 2008; Ganz et al., 2008; Rehu et al., 2010; Pasricha et al., 2011; Sanad & Gharib, 2011; Choi et al., 2012; Basu et al., 2016; Йорданова, 2017). Получените данни отразяват, от една страна, повишените потребности от Fe при лицата с ЖДА, а от друга, повишения капацитет за чревна резорбция на Fe при ЖДА (Mupfudze et al., 2015). Намаляването на хепсидиновите нива, водещо до нарастване на чревната резорбция на Fe и освобождаване на Fe от макрофагите, осигурява повишена доставка на Fe за еритропоезата (Nicolas, Chauvet, et al., 2002; Pak et al., 2006; Nemeth & Ganz, 2009). В друго проучване при момичета в юношеска възраст с и без ЖД разликата в серумните концентрации на хепсидин между двете групи не достига статистическа значимост, което вероятно се свързва с наличие на субклинично възпаление, установено при значителна част от изследваните лица (Htet et al., 2014).

Сравнителният анализ на изследваните биохимични показатели на желязния метаболизъм между двете групи бременни жени показва статистически значимо по-

висока стойност на медианата на серумен Ferr при жените с проблемна бременност в сравнение с контролите в началото на втория триместър. Този резултат би могъл да се обясни с по-големите резерви от Fe, асоциирани с хроничните възпалителни процеси при жените с проблемна бременност. Установено е, че възпалителните стимули водят до значително нарастване на хепсидиновия синтез, медирано от проинфламаторния цитокин IL-6 (Nemeth et al., 2003; Nemeth, Rivera et al., 2004). Стимулираното от IL-6 нарастване на плазмената концентрация на хепсидин потиска освобождаването на Fe от макрофагите, рециклиращи застаряващите еритроцити, и води до секвестрация и натрупване на Fe в тях (Nemeth, Rivera et al., 2004; McGrath Jr & Rigby, 2004). Получените от нас резултати не установиха статистически значими различия в серумните концентрации на хепсидин и IL-6 между двете групи бременни жени в двата изследвани срока на бременността. По-вероятно обяснение за сигнификантно по-високите серумни концентрации на Ferr при жените с проблемна бременност спрямо контролите е повишението им като острофазов реактант. Съобщава се, че серумните нива на Ferr нарастват независимо от количеството на желязните резерви в условия на хронични възпалителни процеси, инфекции, хипертиреозидизъм, чернодробни заболявания, хронична бъбречна недостатъчност (Zimmermann, 2008; Baker et al., 2010). Феритинът се синтезира от макрофагите, хепатоцитите и адипоцитите под регулаторния контрол на инфламаторните цитокини IL-1 β и TNF (Тумор-некротизиращ фактор)- α (Sanad et al., 2011). При интерпретиране на получените от нас резултати е необходимо да се има предвид и че серумният Ferr показва добър отговор при приложение на Fe-съдържащи препарати, който е по-голям и по-адекватен в сравнение с този на други биохимични показатели за оценка на желязния статус (Zimmermann, 2008). Сравнително малкият брой бременни жени, за които са налице данни, че са приемали желязни препарати през периода на проучването, не позволява достоверни заключения за ефекта им върху серумните концентрации на Ferr.

Статистически значимо по-ниската стойност на медианата на ТЖСК в групата с проблемна бременност спрямо групата с нормално протичаща бременност в началото на втория триместър насочва към по-голямо насищане с Fe на транспортния белтък Tf и по-нисък серумен Fe-свързващ потенциал. По-ниските стойности на ТЖСК, едновременно с по-високите серумни нива на Ferr при жените с проблемна бременност спрямо контролите в началото на втория триместър са в съответствие с литературните данни за обратнопропорционална зависимост между ТЖСК и резервите от Fe (Andrews et al., 2009). Установено е, че стойностите на ТЖСК намаляват при хронични

възпалителни заболявания (Wu et al., 2002; Andrews et al., 2009), какъвто е случаят при жените с проблемна бременност в проведеното от нас проучване.

Статистически значимо по-високите стойности на серумен Ferr и по-ниският серумен Fe-свързващ потенциал при жените с проблемна бременност спрямо контроли с нормално протичаща бременност в началото на втория триместър поставят въпроса за целесъобразността на суплементацията с Fe при пациентки с проблемна бременност, асоциирана с хронични възпалителни заболявания. В тези случаи железният дефицит е често „функционален“, т. е. относителен ЖД, поради абнормно натрупване на резерви от Fe под форма на феритин (Gangopadhyay et al., 2011). Съществува хипотеза, че желязната суплементация в условия на хронично възпаление и нормални или изобилни желязни резерви води до формиране на свободно Fe, което е мощен прооксидант и индуцира обостряне на оксидативния стрес (Gangopadhyay et al., 2011; Dao et al., 2013; Clénin, 2017). Като се има предвид фактът, че желязната хомеостаза е прецизно регулирана чрез резорбцията на Fe в стомашно-чревния тракт и липсват механизми за елиминиране на желязото в случаи на желязно претоварване, Clénin (2017 г.) препоръчва суплементацията с Fe винаги да се прилага предпазливо.

При проследяване динамиката на изследваните биохимични показатели на желязния метаболизъм установихме отчетливо понижение в стойностите на серумен Ferr и SatTf и повишение на ТЖСК с нарастване срока на бременността. Тези резултати са подобни на установените от други изследователи, които доказват намаляване на серумния Ferr, серумното Fe и SatTf и нарастване на серумния Tf, ТЖСК и разтворим трансферинов рецептор (sTfR) в хода на бременността (WHO & CDC, 2007; Finkenstedt et al., 2012; Биволарска, 2014; Flores-Quijano et al., 2016; Welke et al., 2017). Статистически значимата промяна в стойностите на SatTf, наблюдавана от нас при жени с нормално протичаща бременност, не беше потвърдена при проследяване динамиката на показателя в хода на проблемна бременност. Този резултат би могъл да се обясни с отговора на серумните концентрации на Fe като острофазов реактант (Wu et al., 2002; Andrews et al., 2009) към хроничните възпалителни процеси, наблюдавани при жените с проблемна бременност. Възможно обяснение може да бъде и отговорът на SatTf към Fe-съдържащи препарати, приемани от значителна част от изследваните жени с проблемна бременност в началото на третия триместър. Известно е, че стойностите на SatTf съществено нарастват при суплементиране с Fe (Rettmer et al., 1999).

Получените от нас данни показват, че при изразяване стойностите на биохимичните показатели на желязния метаболизъм като категорийни променливи, с напредване на

гестационния срок се наблюдава отчетливо нарастване на относителните дялове на жените със стойности на серумен Ferr_g, свидетелстващи за ниски и изчерпани резерви от Fe, и стойности на ТЖСК, отразяващи повишения серумен Fe-свързващ потенциал при ЖД. Наблюдаваните промени в стойностите на биохимичните показатели на желязния метаболизъм отразяват повишените потребности от Fe във връзка с нарастването на кръвния обем и еритроцитната маса и интензивния растеж на плода и плацентата, най-силно изявени в последните месеци на бременността (WHO & CDC, 2007; Koenig et al., 2014; Welke et al., 2017). В проучване при здрави жени, без наличие на ЖД, се установява, че разрастването на еритропоезата намира израз в двукратно нарастване на серумните концентрации на sTfR в хода на бременността (WHO & CDC, 2007). Но, от друга страна, съществуват данни, че в късните гестационни срокове серумните нива на Ferr_g намаляват, дори при налични костномозъчни резерви от Fe (WHO, 2001).

Въпреки наблюдаваните отчетливи промени в стойностите на изследваните биохимични показатели на желязния метаболизъм в хода на бременността, получените от нас резултати не установиха статистически значими промени в серумните концентрации на хепсидин с нарастване на гестационния срок при двете изследвани групи бременни жени. Нашите резултати се различават от тези, установени от други изследователи, които показват прогресивно намаляване на хепсидиновите нива с напредване на бременността и най-ниски стойности на показателя в последния триместър (Finkenstedt et al., 2012; Van Santen et al., 2013; Flores-Quijano et al., 2016; Йорданова, 2017). Много вероятно е значимо намаляване на серумния хепсидин да е налице в последните четири седмици от бременността, но за целия период на проследяване в нашето изследване в рамките на 16-32 г.с. не установихме отчетливи промени в средните стойности на показателя. Подобни на нашите резултати се съобщават от Welke и съавт. (2017 г.) в лонгитудинално проучване на серумните нива на хепсидин през втория и третия триместър при жени с високорискова бременност.

Фактът, че стойностите на серумния хепсидин в проведеното от нас проучване при бременни жени не следват динамиката на биохимичните показатели на желязния метаболизъм, говори в полза на доминиращото въздействие на други хепсидин-регулирущи фактори над сигналите от статуса на Fe в регулацията на хепсидиновата секреция през бременността.

В проведеното от нас изследване не бяха установени отчетливи промени в стойностите на Hb концентрация и Hct с нарастване на гестационния срок. Съобщава се, че при здрави бременни жени, без наличие на ЖД, се наблюдава специфична

динамика на Hb концентрация и Hct в хода на бременността. Концентрацията на Hb започва да намалява в началото на първия триместър, достига своята най-ниска стойност към края на втория триместър и започва отново да нараства през третия триместър (CDC, 1998; WHO, 2011). Тези промени се свързват с нарастване на кръвния обем на майката и на потребностите от Fe на плода и плацентата (WHO, 2011; Йорданова, 2017). Данните от лонгитудинални, проспективни проучвания, обхващащи трите тримесечия на бременността, показват статистически значима разлика в стойностите на Hb концентрация преди и след 16^{та} г.с., но не и между второ и трето тримесечие на бременността (Finkenstedt et al., 2012; Йорданова, 2017). Тези резултати биха могли да обяснят липсата на отчетливи промени в стойностите на Hb концентрация в нашето проучване, тъй като то включва двукратно изследване на показателя в периода 16-32 г.с.

Получените от нас резултати показват, че при децата с ЖДА намалението в стойностите на серумния хепсидин е в пряка зависимост с нарастване на общия брой RBC, но не бяха установени значими взаимовръзки на серумния хепсидин с концентрацията на Hb, биохимични показатели на желязната обмяна и маркери на възпалението. Тези данни показват, че анемията не влияе пряко върху нивото на хепсидин, но вероятно оказва индиректно въздействие върху него чрез все още неизяснен сигнал, възникващ в резултат на разрастването на еритропоезата, което е израз на нейните компенсаторни възможности в отговор на повишените нужди от Fe. Според Рак и съавт. (2006 г.) анемията упражнява своето въздействие върху хепсидиновия синтез и секреция чрез все още неизяснено вещество, освобождавано при стимулиране на еритропоезата. Резултатите, получени в други проучвания, за взаимовръзката между нивата на хепсидин и лабораторни показатели, характеризиращи обмяната на желязото, са противоречиви. От една страна, подобно на получените от нас данни, проучвания при момичета в юношеска възраст и бременни жени с нормално протичаща и усложнена бременност не показват наличие на взаимовръзка между серумния хепсидин и показатели на желязния метаболизъм, но при жени с усложнена бременност серумните концентрации на хепсидин корелират положително с възпалителния маркер С-реактивен протеин (CRP; Htet et al., 2014; Gyarmati et al., 2011; Brunacci et al., 2018). В други проучвания се установява наличие на статистически значими корелационни зависимости между хепсидиновите нива и биохимични маркери на желязната обмяна, като прави впечатление, че силата на връзката между хепсидина и серумния Ferrt е по-голяма при по-добър желязен статус на изследваните лица (Cherian

et al., 2008; Ganz et al., 2008; Pasricha et al., 2011; Choi et al., 2012; Finkenstedt et al., 2012; Young et al., 2012; Basu et al., 2016; Welke et al., 2017). Htet и съавт. (2014 г.) формулират хипотезата, че взаимовръзката между хепсидиновите нива и статуса на Fe е по-добре изразена при лица без дефицит в депата на Fe и по-слабо изразена при лица с ЖД. Отслабване на връзката между хепсидиновите концентрации и биохимичните показатели на желязната обмяна предполага, че статусът на Fe, включително желязните резерви, има по-слабо изразено въздействие върху хепсидиновата регулация. Липсата на статистически значими корелационни зависимости между серумния хепсидин и изследваните биохимични показатели на желязния метаболизъм в проведеното от нас проучване ни дава основание да предположим, че повишената еритропоетична активност доминира над сигналите от статуса на Fe в регулацията на хепсидиновата секреция при ЖДА. В допълнение, активността на еритропоезата вероятно въздейства върху хепсидиновите концентрации чрез сигнал различен от промени в насищането на трансферина с Fe в резултат на повишеното му усвояване.

Нашите резултати показват, че с нарастване на серумните нива на IL-6 при жените с проблемна бременност се понижават стойностите на серумно Fe и SatTf. Тази зависимост се регистрира в пробите от 16-18^{та} г.с. Наблюдаваната отрицателна взаимовръзка би могла да отразява нарушеното освобождаване на Fe от макрофагите при възпалителни процеси, в резултат на което постъпването на Fe в плазмата е намалено. Nemeth, Rivera и съавт. (2004 г.) съобщават, че инфузия на рекомбинантен човешки IL-6 при здрави доброволци води до значимо понижаване на серумното Fe и SatTf. Същите автори установяват, че този ефект е медиран от Fe-регулаторния хормон хепсидин, но получените от нас данни за жените с проблемна бременност не доказват определена зависимост между серумните концентрации на IL-6 и хепсидин, както и между серумните нива на Fe и хепсидин.

При пробите от 30-32^{ра} г.с. на жените от същата група установихме, че с нарастване на серумния хепсидин се понижават стойностите на Hb концентрация и Hct. Тези отрицателни взаимовръзки са в съответствие с данните, че повишените нива на хепсидин водят до потискане резорбцията на Fe в стомашно-чревния тракт и до секвестрация на Fe в макрофагите, в резултат на което намалява снабдяването с Fe за синтеза на Hb и производството на еритроцити (Nemeth & Ganz, 2009; Kroot et al., 2011; Tussing-Humphreys et al., 2012). Установените от нас зависимости поставят въпроса за необходимостта от определяне на серумния хепсидин в случаи на анемия при жени с проблемна бременност с оглед отдиференциране на тези с АХЗ от случаите с

подлежаща ЖДА. Данни от редица проучвания показват, че при наличие на анемия и активен възпалителен процес серумният хепсидин способства за разграничаване на АХЗ и комбинираните ЖДА/АХЗ (Ganz et al., 2008; Theurl et al., 2009; Ganz, 2011; Йорданова, 2017). Повишените нива на хепсидин при лица с АХЗ биха довели до риск от неефективност на пероралното суплементиране с Fe в резултат на потискане резорбцията му през чревната лигавица (WHO & CDC, 2007; Манолов и съавт., 2012; Tussing-Humphreys et al., 2012; Koenig et al., 2014; Welke et al., 2017). В тези случаи не се налага Fe-заместително лечение, а лечение на подлежащото възпалително заболяване (Tussing-Humphreys et al., 2012; Koenig et al., 2014; Йорданова, 2017). От друга страна, при ЖДА и комбинираните ЖДА/АХЗ, които се асоциират с намалени серумни концентрации на хепсидин, чревната резорбция на перорално приетото Fe би била ефективна и приложението на перорални Fe-съдържащи препарати в тези случаи е необходимо (Theurl et al., 2009; Pasricha et al., 2011; Йорданова, 2017). Според Koenig и съавт. (2014 г.) определянето и проследяването на серумните концентрации на хепсидин в хода на нормална и проблемна бременност е съвременен биомаркер за ранна оценка и мониториране на желязната бионаличност. Съобщава се, че серумните стойности на хепсидин дават възможност за определяне на необходимостта от приложение на Fe-съдържащи препарати за лечение на анемия при бременни жени (Йорданова, 2017). Получените от нас данни са в подкрепа на приложението на серумния хепсидин като полезен маркер за оптимизиране на желязната суплементация при жени с проблемна бременност.

Положителната взаимовръзка между серумните концентрации на хепсидин и IL-6, наблюдавана при жените с нормално протичаща бременност в пробите от 30-32^{ра} г.с., би могла да се обясни с регулаторното влияние на IL-6, мощен стимул за синтеза на хепсидин (Nemeth et al., 2003; Nemeth, Rivera et al., 2004). Индукция на хепсидиновата експресия от IL-6 е доказана както в проучвания на клетъчни култури, така и *in vivo* (Nemeth et al., 2003; Nemeth, Rivera et al., 2004). Nemeth и съавт. (2003 г.) установяват, че експресията на хепсидин драстично се увеличава под въздействие на IL-6, но не и от IL-1 или TNF- α . Механизмът, чрез който IL-6 индуцира експресията на хепсидин, все още не е напълно изяснен. Данни от редица проучвания показват, че в IL-6-зависимата регулация на хепсидин в хепатоцитите участва Janus-киназа (JAK)/Сигнален трансдюсер и активатор на транскрипция-3 (STAT3)-сигналният път. Взаимодействието на IL-6 с мембранно-свързан рецепторен комплекс води до включване на сигналната каскада. Активираният транскрипционен фактор STAT3

навлиза в ядрото на клетката, където се свързва с регулаторен елемент в промотора на хепсидиновия ген и индуцира неговата транскрипция (Wrighting & Andrews, 2006; Pietrangelo et al., 2007; Verga Falzacappa et al., 2007; Huang et al., 2009). Въпреки че най-добре проученият и вероятно главен стимул на хепсидиновата секреция във възпалителния регулаторен път е IL-6 (Nemeth et al., 2003; Nemeth, Rivera et al., 2004), други цитокини и не-IL-6-зависими пътища също биха могли да играят роля в тази регулация (Means Jr, 2013). В подкрепа на това предположение са данните, получени от Lee и съавт. (2005 г.), които доказват, че както IL-6, така и IL-1 α и IL-1 β силно стимулират хепсидиновата транскрипция.

Повечето цитирани в литературата проучвания при бременни жени с неусложнена бременност не установяват корелационна зависимост между нивата на хепсидин и възпалителните маркери IL-6 (Gyarmati et al., 2011) и CRP (Schulze et al., 2008; Van Santen et al., 2013). От друга страна, резултати от голямо проучване, включващо главно жени с неусложнена бременност, показват положителна корелация между серумния хепсидин и CRP (Rehu et al., 2010).

За разлика от групата с нормално протичаща бременност, в групата с проблемна бременност не беше доказана определена зависимост между серумните нива на IL-6 и хепсидин в двата изследвани срока на бременността. Резултатите от проучвания, изследващи взаимовръзките между серумните нива на хепсидин и маркери за оценка на възпалителната активност при бременни жени с рискова бременност, са противоречиви. В някои проучвания се доказват положителни корелационни зависимости между серумните концентрации на хепсидин и CRP (Garcia-Valdes et al., 2015; Brunacci et al., 2018), докато в други не се установяват статистически значими корелации на серумния хепсидин с IL-6 и CRP по време на бременността (Cao et al., 2016; Welke et al., 2017). Тези резултати дават основание да се направи предположение, че вероятно други хепсидин-регулирущи фактори, в това число активността на еритропоезата, доминират над възпалението в регулацията на хепсидиновия синтез и секреция през бременността (Welke et al., 2017). Тази особеност би могла да обясни факта, че между двете изследвани групи бременни жени с нормално протичаща и проблемна бременност не бяха установени статистически значими различия в серумните концентрации на хепсидин.

Въпросът за серумните концентрации на Se като показател за селеновия статус при рискови популационни групи за развитие на селенов дефицит, каквито са децата и бременните жени, е от особен интерес за нашата страна. Установено е, че някои райони

на Източна Европа се характеризират с ниско съдържание на Se в почвата, което определя и по-ниския му прием чрез храната и питейната вода (Oldfield, 2002). Експресията на селенопротеините в тъканите е в пряка връзка със селеновия прием (Combs, 2001; Daniels, 2004). Наличие на умерен селенов дефицит е установено при деца от 7 до 10 годишна възраст в Смолянски ендемичен район (Лозанов и съавт., 2006). Данните, които получихме в проведеното от нас проучване, показват статистически значимо по-ниски стойности на серумен Se при изследваните деца с ЖДА спрямо здрави деца. Тези резултати са в съответствие с установените от други изследователи в проучвания при лица с ЖДА (Yetgin et al., 1992; Gürgöze et al., 2004, 2006; Van Nhien, et al., 2006). При изразяване стойностите на серумен Se като категорична променлива в групата деца в юношеска възраст с ЖДА отчетохме статистически значимо по-висок относителен дял (75,0%) на деца с подпрагови серумни концентрации на Se ($< 886,5 \text{ nmol/L}$) спрямо контролната група.

Резултатите от проучването поставят въпроса за взаимовръзката между подпраговите серумни концентрации на Se и развитието на ЖДА при деца в юношеска възраст. Gropper и съавт. (2009 г.) съобщават, че железният дефицит се асоциира с понижени нива на Se в организма, както и с намален синтез и активност на Se-съдържащите ензими глутатион пероксидази. Все още не е изяснен механизмът, обуславящ тази взаимовръзка, но се счита, че вероятно той се свързва с участие на желязото в претранслационната регулация на GPx (Gropper et al., 2009).

Установено е, че оксидативният стрес, чрез повишено производство на водороден пероксид и липидни пероксиди, стимулира генната експресия на проинфламаторния цитокин IL-6 (Zhang et al., 2001). Тези данни биха могли да обяснят факта, че в групата деца в юношеска възраст с ЖДА, при значителна част от които се наблюдава недостиг на Se, серумните концентрации на IL-6 са значимо по-високи, отколкото при контролите.

С особено висок риск от селенов дефицит се отличава периодът на бременността поради повишените потребности от Se за растежа на плода и повишения тъканен метаболизъм на майчиния организъм (Биволарска, 2014). Редица автори отчитат понижени серумни концентрации на Se при бременни жени, както и прогресивно намаляване на серумните селенови нива в хода на бременността (Kantola et al., 2004; Gladyshev, 2006; Izquierdo Alvarez et al., 2007). В нашата страна Лозанов и съавт. (2008 г.) и Биволарска (2014 г.) установяват наличие на селенов дефицит (ниски стойности на Se $< 800 \text{ nmol/L}$ в серума) при 40% от изследваните бременни жени в гр. Девин, 35% от

тези в гр. Асеновград (Родопски ендемичен район) и 47% от тези в гр. Пловдив. Недостигът на Se се асоциира с нарушена антиоксидантна защита и повишен риск от усложнения в хода на бременността, в това число и репродуктивни неудачи (Rayman, 2000; Combs, 2001; Zachara, 2016). В проведеното от нас проучване отчетохме статистически значимо по-висок относителен дял (72,73%) на бременни жени с подпрагови серумни концентрации на Se ($< 886,5 \text{ nmol/L}$) в групата с проблемна бременност спрямо контролната група в началото на втория триместър.

С нарастване на гестационната възраст при изследваните бременни жени разликата в относителните дялове на жените с подпрагови стойности на серумен Se между работната и контролната група загуби статистическа значимост. Този резултат би могъл да се обясни с факта, че голяма част от изследваните жени с проблемна бременност са приемали комбинирани препарати, съдържащи витамини и микроелементи, включително Se, в хода на бременността.

Получените от нас данни поставят въпроса за необходимостта от отчитане на селеновия статус и целесъобразността от суплементация с умерени дози Se-съдържащи препарати, които са мощни антиоксидантни средства, при пациенти с ЖДА в юношеска възраст и в хода на бременността при жени с проблемна бременност.

Данни от редица проучвания показват, че селенът стимулира синтеза на Hb и еритропоезата. Oster и съавт. (1988 г.) установяват положителни корелационни зависимости между съдържанието на Se в еритроцитите и хематологичните показатели брой RBC, концентрация на Hb и Hct. Съобщава се, че суплементацията със Se предизвиква мощен ретикулоцитен отговор (Oster et al., 1988) и нарастване на стойностите на Hb концентрация и Hct (Morris et al., 1984). В подкрепа на значимостта на селена за еритропоезата са и високите нива на GPx в плазмата и еритроцитите (Kaushal et al., 2011). По-разнопосочни резултати са получени в проучвания, изследващи взаимовръзката на хематологични показатели със серумните концентрации на Se. Докато в някои проучвания при възрастни лица и пациенти с белодробна туберкулоза се доказват положителни корелации и асоциации на серумния Se с концентрацията на Hb (Bates et al., 2002; Van Lettow et al., 2005; Semba et al., 2009), в други при лица с нормален железен статус и пациенти с ЖДА не се наблюдава значима взаимовръзка между тези показатели (Yetgin et al., 1992; Gürgöze et al., 2004).

Съвременното схващане за есенциалната роля на селенопротеините в еритропоезата е представено в проучванията на Kaushal и съавт. (2009 г., 2011 г.). Тези автори установяват, че адекватният клетъчен селенов статус регулира повишената в отговор на

оксидативен стрес активация на два транскрипционни фактора в еритроидните клетки – хипоксия-индуцируем фактор (HIF)-1 α и Forkhead box O3 (FoxO3a). Счита се, че FoxO3a участва във физиологичния отговор към оксидативен стрес в процеса на еритропоезата чрез индуциране на генната експресия на антиоксидантни ензими, включително GPx-1, в еритроидните прекурсори (Marinkovic et al., 2007).

Редица проучвания сочат, че селенът участва в регулацията на биосинтеза и метаболизма на хема (Oster et al., 1988; Padmaja & Prasad, 1993; Padmaja et al., 1996; Maciel et al., 2000). Установено е, че селенът индуцира експресията на митохондриалния ензим синтаза на δ -аминолевулиновата киселина (δ -ALA) и микрозомалния ензим хем оксигеназа-1. Последното е вероятно индиректен ефект поради повишеното производство на „свободен“ хем в клетката. Други ензими, включени в биосинтеза на протетичната група на хемоглобина, като дехидратаза на δ -ALA и ферохелатаза, се инхибират от Se.

Данните за ролята на селена в еритропоезата и функционирането на еритроцитите са в съответствие с установената пряка зависимост между серумните концентрации на Se и еритроцитния индекс MCV при жените с нормално протичаща бременност, която се регистрира в пробите от 16-18^{та} г.с. Нарастването на серумния Se е паралелно с това на показателя MCV, който отразява разрастване на еритропоезата, с наличие на млади, поголеми по обем форми на еритроцитите в периферната кръв. В групата с проблемна бременност корелационната връзка между серумната концентрация на Se и MCV е нарушена и отслабена, вероятно поради високия относителен дял на жени с подпрагови стойности на серумен Se.

Различни от получените при бременни жени резултати отчетохме при децата в юношеска възраст с ЖДА. В условия на ЖД, съчетан с недостиг на Se при значителна част от включените в тази група деца, се наблюдават отрицателни корелационни зависимости на серумния Se с еритроцитните индекси MCV и MCH, серумното ниво на Fe, SatTf и положителна корелация с ТЖСК. Подобни на нашите резултати са получени от Oster и съавт. (1988 г.), които установяват отрицателна корелационна зависимост на серумния Se с MCV, докато други изследователи не наблюдават значима взаимовръзка между серумното ниво на Se и показатели на желязния метаболизъм при пациенти с ЖДА и лица с нормален желязен статус (Viita et al., 1989; Yetgin et al., 1992; Gürgöze et al., 2004). Според Oster и съавт. (1988 г.) извънклетъчният Se в кръвта оказва влияние върху обема на еритроцита чрез участието си в защита на еритроцитната мембрана от липидна пероксидация.

Микроелементът Си играе ролята на кофактор в голям брой окислителни ензими, участващи в реакции на електронен транспорт и антиоксидантната защита, и жизненоважни за нормалното функциониране на редица тъкани, в това число и за нормалната еритропоеза. Мед-съдържащи ензими, участващи в процеса на еритропоезата, са ферооксидазите хефестин и церулоплазмин, и антиоксидантния ензим цитохром-С оксидаза, необходим за синтеза на Hb (Lazarchick, 2012). Установено е, че по време на бременността серумните концентрации на Си са повишени с оглед обезпечаване на повишените потребности от Си на плода (Alebic-Juretic & Frkovic, 2005; Izquierdo Alvarez et al., 2007). Освен това редица автори съобщават, че при проследяване динамиката на серумната Си в хода на бременността се наблюдава статистически значимо нарастване, достигащо своя максимум през третия триместър (Alebic-Juretic & Frkovic, 2005; Izquierdo Alvarez et al., 2007; Vukelić et al., 2012). Счита се, че промените в серумните нива на Си по време на бременността биха могли да се дължат на повишаване концентрацията на церулоплазмин в резултат на повишената секреция на естрогени (Baig et al., 2003). От друга страна, някои автори съобщават, че високите серумни концентрации на Си по време на бременността се асоциират с мозъчни увреждания на плода и повишен риск от спонтанни аборти (Izquierdo Alvarez et al., 2007).

В проведеното от нас проучване при всички изследвани бременни жени в двата проучвани срока на бременността се установиха стойности на серумната Си над горната граница на референтната област без статистически значима разлика между групите с нормално протичаща и проблемна бременност. Не бяха потвърдени статистически значимите промени в серумните концентрации на Си с нарастване на гестационния срок в двете изследвани групи. При жените с проблемна бременност се доказва наличие на силно изразена пряка зависимост между серумните концентрации на Си и еритроцитния индекс МСН, регистрирана в пробите от 30-32^{ра} г.с. Вероятно установената от нас положителна взаимовръзка отразява участието на медта в усвояването на желязото в процеса на еритропоезата. В други проучвания при деца, юноши и бременни жени с ЖД, анемия и здрави контроли се установяват отрицателни корелационни зависимости на серумната Си с концентрацията на Hb, хематокрита и еритроцитния индекс MCV, но те се обясняват с реципрочни взаимодействия между Fe и Си в процеса на тяхната резорбция в стомашно-чревния тракт (Ese et al., 1997; Ma et al., 2004; Turgut et al., 2007).

Изводи

1. Серумните концентрации на хепсидин и Se при деца в юношеска възраст с ЖДА са значимо по-ниски, а серумните нива на IL-6 – значимо по-високи в сравнение с тези при здрави деца.
2. При жените с проблемна бременност се наблюдават значимо по-високи стойности на серумен Ferr и по-нисък серумен Fe-свързващ потенциал спрямо контроли с нормално протичаща бременност в началото на втория триместър. С нарастване на гестационния срок се наблюдава отчетливо понижение в стойностите на серумния Ferr и повишение на ТЖСК при двете изследвани групи бременни жени, както и намаляване на насищането с Fe на трансферина при жените с нормално протичаща бременност.
3. Срокът на бременността оказва съществено влияние върху развитието на ЖД, определен въз основа на показателите серумен Ferr и ТЖСК, при двете изследвани групи бременни жени.
4. Серумните концентрации на Cu са над горната граница на референтната област при всички изследвани бременни жени в двата проучвани срока на бременността.
5. В групите деца в юношеска възраст с ЖДА и бременни жени с проблемна бременност в началото на втория триместър се наблюдават значимо по-високи относителни дялове на лица с подпрагови стойности на серумен Se в сравнение със съответните контролни групи.
6. Установиха се статистически значими зависимости между серумните концентрации на хепсидин, IL-6, Cu и Se, хематологичните показатели и биохимичните маркери на желязната обмяна при изследваните лица от работните и контролните групи:
 - При децата в юношеска възраст с ЖДА серумният хепсидин намалява с нарастване на общия брой RBC;
 - С нарастване на серумните концентрации на IL-6 при жените с проблемна бременност в началото на втория триместър се понижават стойностите на серумно Fe и SatTf;

- При жените с нормално протичаща бременност в началото на третия триместър се наблюдава значителна по сила пряка зависимост между серумните концентрации на хепсидин и IL-6;
 - С нарастване на серумния хепсидин при жените с проблемна бременност в началото на третия триместър се понижават концентрацията на Hb и хематокрита;
 - Серумните концентрации на Se показват значителни по сила отрицателни зависимости с еритроцитните индекси MCV и MCH, серумното Fe, SatTf и положителна зависимост с ТЖСК при деца в юношеска възраст с ЖДА;
 - При жените с нормално протичаща бременност в началото на втория триместър серумните концентрации на Se показват значителна по сила положителна взаимовръзка с еритроцитния индекс MCV;
 - При жените с проблемна бременност в началото на третия триместър серумните концентрации на Cu показват силно изразена пряка зависимост с еритроцитния индекс MCH.
7. Установиха се статистически значими зависимости между отделните биохимични маркери на желязната обмяна при изследваните лица от работните и контролните групи:
- Резервите от Fe в организма, определени въз основа на серумния Ferr, показват положителна взаимовръзка с насищането с Fe на трансферина при здрави деца в юношеска възраст, със серумното Fe и насищането с Fe на трансферина при бременните жени от двете изследвани групи в началото на третия триместър, както и отрицателна зависимост със серумния Fe-свързващ потенциал при бременни жени с нормално протичаща бременност в началото на втория триместър;
 - Серумната концентрация на Fe показва отрицателна зависимост със серумния Fe-свързващ потенциал при деца в юношеска възраст с ЖДА и при бременни жени с проблемна бременност в началото на третия триместър.

Препоръки

Алгоритъм за мониториране на желязния метаболизъм и селеновия статус при бременни жени с проблемна бременност, предшествана от репродуктивни неудачи или асоциирана с хронични възпалителни заболявания, в т. ч. автоимунни

В първи триместър: концентрация на Hb, RBC, Hct, MCV, MCH

В V лунарен месец: концентрация на Hb, RBC, Hct, MCV, MCH, серумно Fe (SFe), ТЖСК [изчисление на SatTf (%) = (SFe/ТЖСК) x 100], CRP, серумна концентрация на Se (SSe)

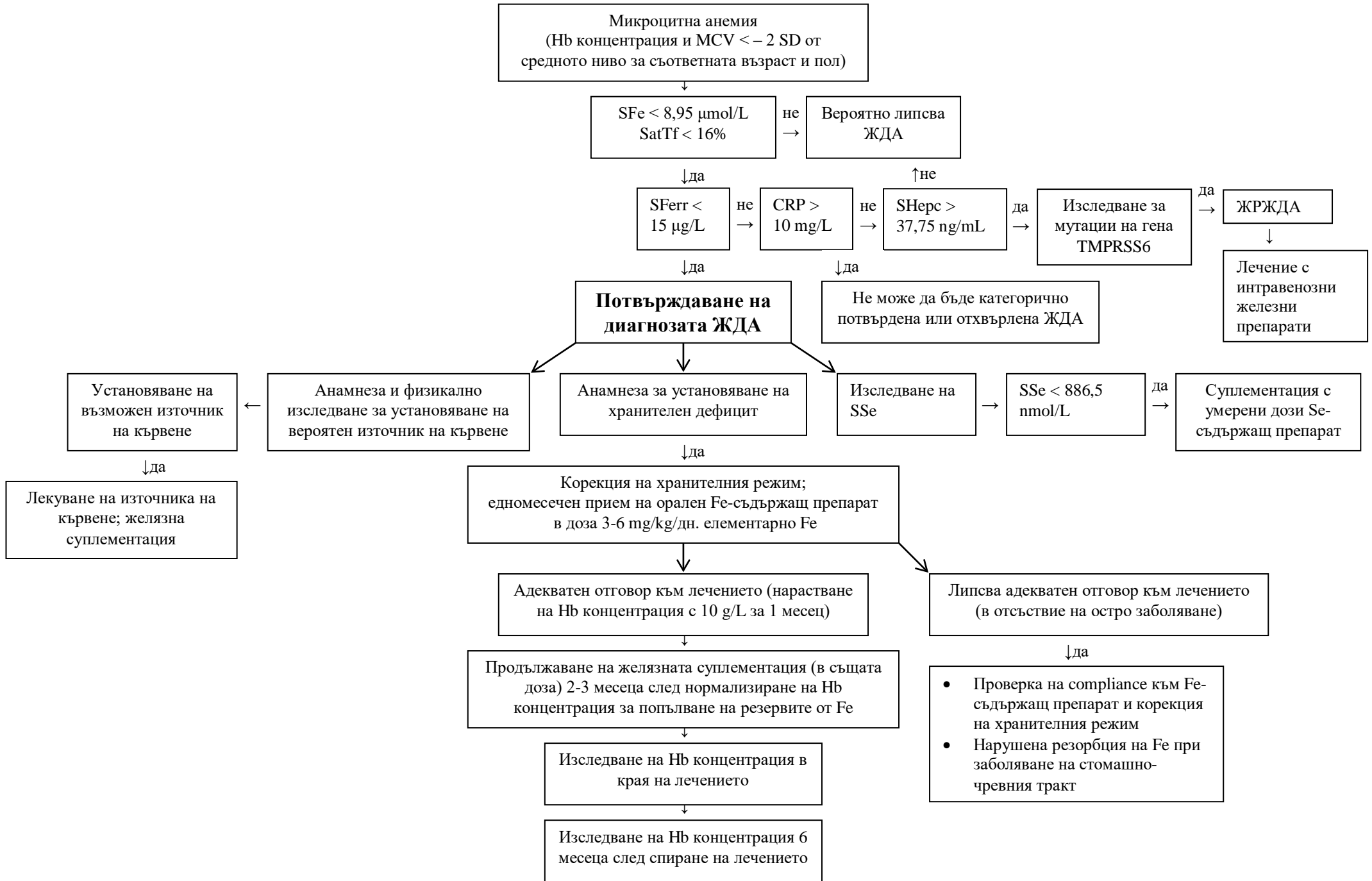
- При SFe < 8,95 µmol/L, SatTf < 16% и CRP < 10 mg/L – ЖД – прием на орален Fe-съдържащ препарат; проследяване на Hb концентрация, RBC, Hct, MCV, MCH, серумно Fe, ТЖСК [изчисление на SatTf]
- При SFe < 8,95 µmol/L, SatTf < 16% и CRP > 10 mg/L – функционален ЖД – лечение на подлежащото заболяване; проследяване на Hb концентрация, RBC, Hct, MCV, MCH, серумно Fe, ТЖСК [изчисление на SatTf]
- При SSe < 886,5 nmol/L – суплементация с умерени дози Se-съдържащ препарат

В VIII лунарен месец: концентрация на Hb, RBC, Hct, MCV, MCH, серумно Fe, ТЖСК [изчисление на SatTf]

- При концентрация на Hb < 110 g/L и SFe < 8,95 µmol/L – изследване на серумен хепсидин (SHepc) и CRP:
 - При SHepc < 3,052 ng/mL, ТЖСК > 71,6 µmol/L и SatTf < 16% – ЖДА – прием на орален Fe-съдържащ препарат; проследяване на Hb концентрация, RBC, Hct, MCV, MCH, серумно Fe, ТЖСК [изчисление на SatTf]
 - При SHepc > 37,75 ng/mL, SatTf < 10% и CRP < 10 mg/L – изследване за мутации на гена TMPRSS6 при ЖРЖДА, която се повлиява частично от лечение с интравенозни, но не и перорални желязни препарати
 - При SHepc > 37,75 ng/mL, ТЖСК ≤ 71,6 µmol/L и CRP > 10 mg/L – АХЗ – лечение на подлежащото заболяване

В X лунарен месец: концентрация на Hb, RBC, Hct, MCV, MCH

Алгоритъм за диагноза и поведение при деца в юношеска възраст с ЖДА



Приноси на дисертационния труд

Приноси с оригинален характер

1. Получени са доказателства, че в регулацията на хепсидиновия синтез и секреция при ЖДА повишената активност на еритропоезата доминира над сигналите от желязния статус;
2. Установи се, че повишаването на серумните концентрации на IL-6 е свързано с намаляване на стойностите на серумно Fe и SatTf при жените с проблемна бременност в началото на втория триместър;
3. Доказа се, че повишаването на серумните концентрации на хепсидин е свързано с намаляване на стойностите на Hb концентрация и Hct при жените с проблемна бременност в началото на третия триместър;
4. Разработен е алгоритъм за диагноза и поведение при деца в юношеска възраст с ЖДА;
5. Разработен е алгоритъм за мониториране на желязния метаболизъм и селеновия статус при бременни жени с проблемна бременност, предшествана от репродуктивни неудачи или асоциирана с хронични възпалителни заболявания, в т. ч. автоимунни.

Приноси с потвърдителен характер

1. Бяха потвърдени данните, че серумните концентрации на хепсидин при момичета в юношеска възраст с ЖДА са понижени;
2. Установиха се подпрагови стойности на серумния Se при момичета в юношеска възраст с ЖДА и при жени с проблемна бременност в началото на втория триместър;
3. Подкрепят се данните за промени в стойностите на биохимични показатели на желязния метаболизъм в посока на ЖД в хода на бременността;
4. Получени са доказателства в подкрепа на доминиращата роля на други хепсидин-регулирущи фактори, в това число активността на еритропоезата, над възпалителните стимули и сигналите от желязния статус в регулацията на хепсидиновия синтез и секреция през бременността.

Списък на публикации и участия в научни прояви, свързани с дисертационния труд

Публикации в пълен текст

В чуждестранни научни списания с импакт фактор (IF) в Web of Science и/или с импакт ранг (SJR) в Scopus

- **Petkova-Marinova T**, Ruseva B. Relationship of hepcidin levels to parameters of iron metabolism during pregnancy. Arch Balk Med Union. 2015;50(2):258-61. ISSN 1584-9244. **SJR: 0.1**
- **Petkova-Marinova TV**, Ruseva BK, Paneva-Barzashka B, Atanasova MA, Dragomirova PV, Laleva PD. Relationships between hepcidin, interleukin-6 and parameters of iron metabolism in pregnant women. Arch Balk Med Union. 2020;55(4):564-72. ISSN 1584-9244. **SJR: 0.15**

В български научни списания с импакт фактор (IF) в Web of Science и/или с импакт ранг (SJR) в Scopus

- **Petkova-Marinova T**, Nedkova V, Angelova M. Essential micronutrient copper and iron deficiency anemia. Pediatriya. 2013;53(4):39-43. ISSN: 0479-7876. **SJR: 0.101**
- **Petkova-Marinova T**, Ruseva B, Atanasova B. Selenium deficiency as a risk factor for development of anemia. J Biomed Clin Res. 2017;10(1):9-17. ISSN:1313-6917

Участия в научни прояви с доклад/постер

Участия в научни форуми в чужбина

- **Petkova-Marinova T**, Ruseva B, Atanasova M, Dragomirova P, Laleva P, Petrov V. Investigation of serum concentrations of hepcidin and parameters of iron metabolism in women with normal pregnancies. The 34th Balkan Medical Week; 2016 Oct 7-8; Bucharest, Romania. Arch Balk Med Union. 2016;(Suppl. 1):A74-5. ISSN 1584-9244

- **Petkova-Marinova T**, Ruseva B, Paneva-Barzashka B, Atanasova M, Dragomirova P, Laleva P. Investigation of serum concentrations of hepcidin and parameters of iron metabolism in women with problem pregnancies. The 34th Balkan Medical Week; 2016 Oct 7-8; Bucharest, Romania. Arch Balk Med Union. 2016;(Suppl. 1):A75-6. ISSN 1584-9244

Участия в научни форуми в България

- **Petkova-Marinova T**, Ruseva B. Regulation of hepcidin secretion and its significance for iron metabolic disorders. XI Congress of Bulgarian Society of Physiological Sciences with International Participation; 2015 Oct 9-11; Plovdiv, Bulgaria. Folia Med (Plovdiv). 2015;57(Suppl. 3):49-50. ISSN: 0204-8043
- **Petkova-Marinova T**, Ruseva B, Atanasova B. Interrelations between hepcidin and homeostasis of copper and iron. 10th workshop on biological activity of metals, synthetic compounds and natural products; 2015 Nov 17-19; Sofia, Bulgaria.
- **Petkova-Marinova TV**, Ruseva BK, Paneva-Barzashka B, Atanasova BD, Laleva PD. Influence of trace elements copper and selenium on parameters assessing the iron status in pregnant women with low-risk and high-risk pregnancies. Jubilee 30-th Annual Assembly of IMAB; 2020 Oct 18-21; Online forum, Varna, Bulgaria.

Участия в научни проекти, свързани с дисертационния труд

1. Изследователски проект № 4/2015 г. Тема „Определяне промените в секрецията на хепсидин и връзката им със серумна концентрация на желязо, мед и селен при жени с нормална и проблемна бременност“
2. Изследователски проект № 10/2016 г. Тема „Проучване зависимостта между хепсидин, мед, селен и показатели на желязния метаболизъм у деца с желязодефицитна анемия в юношеска възраст“

Резюме

Някои възрастни периоди и физиологични състояния, като юношеската възраст и периодът на бременността, се характеризират с повишени потребности от желязо (Fe). През последните десетилетия значително нараства интересът към участието на нови молекули в поддържане на желязната хомеостаза. През 2000 г. е открит пептидът хепсидин, за който впоследствие се установява, че представлява хормон с ключова роля в регулацията на желязната хомеостаза. Желязната хомеостаза е тясно свързана и с тази на други микроелементи, като мед (Cu) и селен (Se). Взаимодействията и свързващите звена между тях са обект на задълбочени проучвания.

Целта на изследването е да се проучи участието на хепсидин, Cu и Se в поддържане на желязната хомеостаза при момичета в юношеска възраст и бременни жени.

Изследвани са 23 деца в юношеска възраст с желязодефицитна анемия (ЖДА) и здрави контроли, и 40 бременни жени с проблемна и нормално протичаща бременност в началото на втория и началото на третия триместър. Нашите резултати показват:

- Наличие на статистически значими различия в серумните концентрации на хепсидин, интерлевкин-6 (IL-6) и Se между деца с ЖДА и здрави контроли;
- Статистически значими различия в стойностите на серумен феритин и тотален желязо-свързващ капацитет между жени с проблемна и нормално протичаща бременност в началото на втория триместър;
- Отчетливи промени в стойностите на биохимични показатели на желязния метаболизъм в посока развитие на желязен дефицит с нарастване на гестационния срок при двете изследвани групи бременни жени;
- Статистически значимо по-високи относителни дялове на лица с подпрагови серумни концентрации на Se при деца с ЖДА и бременни жени с проблемна бременност в началото на втория триместър спрямо контролните групи;
- Статистически значими зависимости между серумните концентрации на хепсидин, IL-6, Cu и Se, хематологичните показатели и биохимичните маркери на желязната обмяна, както и статистически значими зависимости между отделните биохимични маркери на желязната обмяна при изследваните лица от работните и контролните групи.

За разлика от други изследвания на тази тема, в настоящото проучване не се доказват статистически значими промени в серумните концентрации на хепсидин с нарастване на гестационния срок. В проведеното от нас изследване е установена пряка връзка между серумните концентрации на хепсидин и IL-6 при жени с нормално протичаща бременност, за разлика от повечето цитирани в литературата проучвания при жени с неусложнена бременност.

Предлагаме алгоритми за диагноза и поведение при деца в юношеска възраст с ЖДА, както и за мониториране на желязния метаболизъм и селеновия статус при бременни жени с проблемна бременност, предшествана от репродуктивни неудачи или асоциирана с хронични възпалителни заболявания, в т. ч. автоимунни. Те биха допринесли за по-ефективно справяне с желязодефицитните състояния и биха дали възможност за оптимизиране на приема и срока на приложение на микроелементите Fe и Se при жени с проблемна бременност.

Получените в нашето проучване резултати биха могли да допринесат за по-категорично изясняване на факторите, регулиращи синтеза и секрецията на хепсидин. Необходимо е разширяване на клиничните проучвания за изследване участието на хепсидин, мед и селен в поддържане на желязната хомеостаза.

Ключови думи: хепсидин, желязна хомеостаза, мед, селен, юношеска възраст, бременност

Summary

Some age periods and physiological conditions like the adolescence and pregnancy period are characterized with increased iron (Fe) necessities. In the last decades there is increased interest in the new molecules' participation to maintain the iron homeostasis. In 2000 the peptide hepcidin was discovered and lately it was found that it is a hormone playing key role in the regulation of iron homeostasis. The iron homeostasis is closely connected as well with the regulation of other trace elements as copper (Cu) and selenium (Se). Their interactions and their bounding inter-links are the focus of extensive studies.

The aim of this study was to survey the hepcidin, Cu and Se participation for the maintenance of iron homeostasis in adolescent girls and pregnant women.

Twenty three (23) adolescent children with iron deficiency anemia (IDA) and healthy controls were studied, as well as, forty (40) pregnant women having problem and normal pregnancy in the beginning of second and third trimester. Our results demonstrate:

- Statistically significant differences are present in the serum concentrations of hepcidin, interleukin-6 (IL-6) and Se between IDA children and the healthy controls;
- Statistically significant differences in the serum ferritin values and the total iron-binding capacity between women with problem and normal pregnancy in the beginning of second trimester;
- Noticeable changes in the values of biochemical indicators of iron metabolism towards the development of iron deficiency along with the increase of gestation term in both studied groups of pregnant women;
- Statistically significant higher proportions of persons having below-threshold serum Se concentrations in IDA children and pregnant women with problem pregnancy in the beginning of second trimester compared to the control groups;
- Statistically significant correlations between the hepcidin, IL-6, Cu and Se serum concentrations, the haematologic indicators and biochemical markers of iron metabolism; as well as statistically significant correlations between the separate biochemical markers of iron metabolism in the studied persons from the work and control groups.

Compared to other studies on this theme, the current study does not demonstrate statistically significant changes in the serum hepcidin concentrations along with the gestation term increase. Our study found direct connection between serum hepcidin and IL-6 concentrations in women with normal pregnancy; this is the difference from the already cited prevailing studies of women with uncomplicated pregnancy.

Herewith we propose algorithms for diagnosis and treatment of IDA in adolescent children, as well as for monitoring of iron metabolism and Se status in pregnant women having problem pregnancy following either reproductive failures or associated with chronic inflammatory diseases, including the autoimmune ones. These algorithms could contribute to the better management of iron deficiency conditions; they would allow optimization of the intake and application term of the trace elements Cu and Se in women with problem pregnancy.

The results achieved in our study would contribute to define more clearly the factors that regulate hepcidin synthesis and secretion. The clinic studies investigating the hepcidin, Cu and Se participation in the iron homeostasis maintenance should be extended.

Key words: hepcidin, iron homeostasis, copper, selenium, adolescence, pregnancy