

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“-ВАРНА
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО ПРОПЕДЕВТИКА НА ВЪТРЕШНИ
БОЛЕСТИ**

Биляна Илковска

**ХОМЕОСТАЗА НА ЖЕЛЯЗОТО ПРИ ЗДРАВИ
ХОРА И ПАЦИЕНТИ С МЕТАБОЛИТЕН
СИНДРОМ С ОСНОВЕН АКЦЕНТ ВЪРХУ
ХЕПСИДИНА - ХОРМОНА РЕГУЛАТОР НА
МЕТАБОЛИЗМА НА ЖЕЛЯЗОТО**

АВТОРЕФЕРАТ

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

Варна, 2016

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“-ВАРНА
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО ПРОПЕДЕВТИКА НА ВЪТРЕШНИ
БОЛЕСТИ**

Биляна Илковска

**ХОМЕОСТАЗА НА ЖЕЛЯЗОТО ПРИ ЗДРАВИ
ХОРА И ПАЦИЕНТИ С МЕТАБОЛИТЕН
СИНДРОМ С ОСНОВЕН АКЦЕНТ ВЪРХУ
ХЕПСИДИНА - ХОРМОНА РЕГУЛАТОР НА
МЕТАБОЛИЗМА НА ЖЕЛЯЗОТО**

АВТОРЕФЕРАТ

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

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ

Вътрешни болести

Научен ръководител

доц. д-р Бранимир Николов Каназирев

Варна, 2016

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита на заседание на Катедрата по пропедевтика на вътрешни болести при Медицинския университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна.

Дисертационният труд съдържа общо 188 страници и включва 71 фигури и 48 таблици. Книгописът включва 225 заглавия.

Членове на журито:

доц. д-р Бранимир Николов Каназирев, дм. – Варна, МБАЛ "Св. Марина", МУ- Варна

проф. д-р Нина Гочева, дмн – София, НКБ

проф. д-р Снежана Тишева, дмн – Плевен, УМБАЛ Плевен

доц. д-р Борислав Георгиев, дм – София, НКБ

доц. д-р Яна Бочева – Варна, МБАЛ "Св. Марина", МУ- Варна

Резервни членове:

проф. Жанета Георгиева, дм – Варна, МБАЛ "Св. Марина", МУ- Варна

проф. д-р Николай Пенков – Варна, СБАЛК Варна

Публичната защита ще се състои на 10. Януари 2017 год. от 13:00 часа в Аудитория „Проф. д-р Владимир Иванов“ на Медицинския университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна.

Материалите по защитата са на разположение на интересувашите се в Научния отдел на Медицинския университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна.

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

TfR - трансферин рецептор

DMT1- транспортер за двувалентен метал-1

HCP1 - протеин носител на Хем-1

WHR - Съотношение талия/ бедра

BMI - Индекс на телесното тегло

АЛАТ - Аланин аминотрансфераза

АСАТ - Аспартат аминотрансфераза

ГГТ – гама - глутамилтрансферазата

Апо А1 - Аполипопротеин А1

Апо Б - Аполипопротеин Б

CRP - С-реактивен протеин

NFG – нервен растежен фактор

СЪДЪРЖАНИЕ

| | | |
|------------|---|----|
| 1. | ВЪВЕДЕНИЕ | 1 |
| 2. | ХИПОТЕЗА | 4 |
| 3. | МОТИВ | 4 |
| 4. | ЦЕЛИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО | 5 |
| 5. | МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ | 6 |
| 6. | РЕЗУЛТАТИ | 16 |
| 7. | ОБСЪЖДАНЕ | 41 |
| 8. | ЗАКЛЮЧИТЕЛНО ОБСЪЖДАНЕ | 57 |
| 9. | ИЗВОДИ | 59 |
| 10.1. | ELISA метод за определяне на серумни нива на хепсидин | 59 |
| 10.2. | Хомеостаза на желязо при здрави хора | 59 |
| 10.3. | Хомеостаза на желязото при пациенти с метаболитен синдром | 60 |
| 11. | ПРИНОСИ | 62 |
| 11.1. | Приноси с оригинален научен и научно-приложен характер | 62 |
| 11.2. | Приноси с потвърдителен характер | 63 |
| 12. | СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД | 64 |
| 12.1. | ПУБЛИКАЦИИ В НАУЧНИ СПИСАНИЯ | 64 |
| 12.2. | ПУБЛИКУВАНИ РЕЗЮМЕТА НА СЪОБЩЕНИЯ, ПРЕДСТАВЕНИ НА МЕЖДУНАРОДНИ НАУЧНИ ФОРУМИ | 65 |

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Живеем във време на безпрецедентен "разцвет" на болестите на цивилизацията – затлъстяване, диабет, сърдечно-съдови заболявания, стрес и др. Метаболитният синдром като комплекс от предварително споменатите заболявания, се разпространява пандемично в света. Според някои научни изследвания метаболитният синдром има определена връзка с нарушения метаболизъм на желязото. Тази връзка представляваше предизвикателство за мен, затова минавайки по пътя на метаболизма на желязото и през метаболитния синдром, ще се опитам да разбера тяхната взаимна връзка.

Микроелементите са химически елементи, които се съдържат в организмите в една хилядна част от процента (желязо, мед, цинк, молибден, бром, флуор, йод). Те са необходими за нормалната жизнена функция, влизат в състава на ензими, витамини и хормони, и влияят на растежа, размножаването и кръвообразуването. Тяхната липса или излишък водят до нарушен метаболизъм на веществата.

Желязото е есенциален елемент за почти всички живи организми. Той е ключова, функционална част на кислородните транспортери (хемоглобин и миоглобин), много ензими, които катализират редокс реакцията, необходима за генерирането на

енергия (напр. цитохроми), параметрите на различни метаболитни интермедиери и за защита на организма.

Костният мозък е основен консуматор на желязо от кръвообращението. По-голямата част от желязото се използва за синтеза на хемоглобин в 200 милиарда нови червени кръвни клетки. За баланс макрофагите рециклират 10-20 пъти повече желязо от онова, което се абсорбира в червата (което се използва за задоволяване на ежедневните нужди от желязо). RES макрофагите в далака и други органи фагоцитират и лизират стари и повредени еритроцити. Хем оксигеназата (HO-1) разгражда хема, желязото се освобождава от протопорфирина и с помощта на феропортин се връща в плазмата, където се свързва с трансферина.

Ежедневно човешкият организъм губи около 1-2 mg желязо и също толкова се абсорбира в тънките черва, за да се осигури достатъчно, но не и прекалено много желязо, за да се пълни резервата на желязо. Според това системната хомеостаза на желязо регулира чревната абсорбция на желязо, неговото навлизане и мобилизиране на депата с цел да се отговори на нуждите на еритропоезата. Тя също така осигурява стабилна среда, където всяка клетка регулира усвояването на желязото в зависимост от собствените си нужди.

Проучванията показват, че основен регулатор в хомеостазата на желязото е хепсидинът и поставиха черния дроб като централен орган в системната хомеостаза на желязото.

Хепсидинът е отрицателен хормон регулатор на метаболизма на желязо. Генът за хепсидина е разположен в хромозома 19q13.1.

Човешкият хепсидин доминиращо се синтезира в черния дроб като 25 аминокиселинен пептид, който се секретира в кръвообращението. Хепсидинът се синтезира предварително като пропептид, съставен от 84 аминокиселини. С ензимно каталитично отделяне пропептидът преминава в прохепсидин, изграден от 64 аминокиселини. Зрелият и активен 25 аминокиселинен хормон хепсидин най-вероятно се получава чрез отделяне на прорегион (p=39 аминокиселини) под действието на пропротеин конвертазата - фурин.

В плазмата също циркулира като 20 и 22-аминокиселинен пептид и като про-хепсидин, който няма хормонално действие. Предполага се, че хепсидин-25 е основен регулатор за усвояването на желязото чрез храната и клетъчното му освобождаване. Хепсидинът играе ключова роля в хомеостазата на желязото. Той регулира депонирането и експортирането на желязото чрез свързване с феропортина-експортер на желязото.

2. ХИПОТЕЗА

Предполага се, че при пациенти с метаболитен синдром има нарушения на хомеостазата на желязото. Ще се опитаме да установим връзката на феритин и хепсидин, и появата на метаболитен синдром при лица от мъжки и женски пол.

3. МОТИВ

Метаболитният синдром е сред основните причини за заболяемост и смъртност на населението в света.

Желязото като микроелемент с есенциална важност за функционирането на множество ензими и жизнени процеси участва в появата на метаболитния синдром. Честотата на диабет, затлъстяване и хипертония има нарастваща тенденция в обществото и това бе предизвикателството за мен да започна с изследване на метаболизма на желязото при пациенти, които имат и трите компонента на метаболитния синдром.

При преглеждане на медицинската литература намерих много малко изследвания в тази област и затова реших да работя по тази тема.

В света до днес е публикувано само едно проучване, в което е проучвана връзката на хепсидин с параметрите на метаболитния синдром. Това беше допълнителен мотив и ние да допринесем за задълбочаване на познанията за плеотропните ефекти на хепсидина, които могат да влошат инсулиновата резистентност и с това да се допринесе за усложнения при пациенти с метаболитен синдром.

4. ЦЕЛИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

- Да въведем Елайза методът за определяне на концентрацията на хепсидин в серума.
- Да се определят границите на референтните стойности за хепсидин при здрави хора.
- Да се определи дали има връзка между хепсидин с останалите изследвани параметри, свързани с метаболизма на желязото (желязо, феритин, трансферин) при здрави лица.
- Да се определи връзката на хепсидин и феритин при пациенти с метаболитен синдром.
- Да се определи връзката на преносителите на желязо – трансферин и феритин, и хепсидин с останалите изследвани параметри при пациенти с метаболитен синдром.

5. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Докторската дисертация бе изработена в Клинична болница “Д-р Трифун Пановски”, Битоля, в сътрудничество с Центъра по обществено здраве в Битоля и Републиканския институт за кръвопреливане, сектор Битоля.

В изследването участваха 240 лица на възраст от 18 до 60 години, които бяха разделени в две групи (проучвана и контролна група).

Изследваната група обхваща 120 пациенти с метаболитен синдром, от които 60 лица от мъжки пол и 60 лица от женски пол, диагностицирани и лекувани в Центъра за диабет в Отделението по вътрешни болести в Клинична болница, Битоля.

Контролната група обхваща 120 клинични здрави доброволци, от които 60 лица от мъжки пол и 60 лица от женски пол, регистрирани доброволно да участват в проучването и здрави донори на кръв от Републиканския институт за кръвопреливане, сектор Битоля.

Кръвта за изследване бе взета след 12-часово гладуване, сутринта, между 7:00 и 10:00 часа. За целта се използваха игли и вакутейнери за еднократна употреба (Saarstedt, Becton Dickinson). За определяне на пълната кръвна картина се използваха вакутейнери от 3 ml с антикоагулант EDTA-K2, а за определяне на

биохимичните и имунните параметри – вакутейнери за серум от 7 ml.

Последователността на взимане на кръв бе следната: първо бе взета кръв за изработване на биохимичните показатели в серум и след това за хематологичните показатели.

Серумът бе отделен до 2 часа след венепункцията. Всички биохимични и хематологични параметри, с изключение на хепсидина, са изследвани същия ден. Серумът за определяне на хепсидина бе в отделна епруветка (тип Епендорф) в количество 500 ml, замразен и съхранен при температура от -40°C до момента на изследването.

Кръвта, взета във вакутейнер за серум, след 40 минутен престой при стайна температура (20°C), бе центрофугирана на 4000 обороти / 15 минути. След това серумът бе отделен в sample caps и поставен за обработка на биохимичните анализи.

Биохимичните, имунологичните и хематологичните параметри бяха определени с помощта на хематологичен аналйзер Sysmex KX21, биохимичен аналйзер Biosystems и ELISA аналйзер MINDREY.

За всеки пациент изчислихме:

- серумната концентрация на хепсидин;
- липиден статус: общ холестерол, HDL-холестерол, LDL-холестерол, триацилглицероли, апо A1, апо B;
- концентрация на глюкоза;
- концентрация на ензими: АЛАТ, АСАТ, ГГТ;

- пълна кръвна картина: общ брой на еритроцити, левкоцити, неутрофилни левкоцити, лимфоцити, тромбоцити, хемоглобин, хематокрит, MCV, MCH, MCHC;
- концентрация на феритин, трансферин, С-реактивен протеин;
- концентрация на деградационни продукти: урея, креатинин, пикочна киселина.

Методология за определяне на хепсидина

Определянето на концентрацията на хепсидина става с ELISA метод с DRG® Hepcidin 25 bioactive ELISA (EIA-5258) (DRG International, Inc., USA).

а) Принцип на Елайза метода

Елайза (англ. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA,) е имунен метод, при който реакцията антиген-антитяло се осъществява с белязано антитяло. Микротитарските ямки са покрити с моноклонално (мишка) антитяло, насочено към антиген мястото на молекулата на хепсидина. С добавянето на стрептавидин-пероксидаза ензимен комплекс и субстратен разтвор, се получава оцветяване. Интензивността на оцветяването е обратно пропорционално на концентрацията на хепсидина в пробата.

ELISA се провежда в плаки с 96 ямки (12 ленти x 8 ямки), които съдържат анти-хепсидин-25 антитела (моноклонални).

Плаките са от пластмаса, върху която протеините имат склонност да се абсорбират.



Фигура 1. ELISA се провежда в плаки с 96 ямки (12 ленти x 8 ямки), които съдържат анти-хепсидин-25 антитела (моноклонални).

ELISA "сандвич" метод се извършва в следната последователност:

1. Първо ямките са пълнят с разтвор от някакъв безразличен протеин, често говежди серумен албумин. Неговата роля е да блокира пластмасата, за да не може последващите реактиви да се абсорбират върху нея.

2. В следващата стъпка от процедурата се извършва блокиране на останалите свързващи места в ямките (неспецифични свързващи места). Процесът на блокиране се осъществява с цел да

се увеличи спецификата на ELISA техниката чрез превенция на неспецифични взаимодействия с: прохепсидин, α -фето протеин, човешки хорион гонадотропин, човешки плацентарен лактоген и фоликулостимулиращ хормон. Ако ямките не се блокират (след покритието), тогава антителата могат да се свържат с неспецифични протеини (протеини, които не са от интерес, т.е. протеини, за които използваното антитяло е специфично) или със свободния регион от самата ямка. В повече съвременни блокиращи агенти присъстват синтетични протеини, които не са от животински произход, с което се предотвратява всякаква кръстосана реакция с животински антитела.

3. След като бъдат блокирани, в ямките може да се добави разтвор на първото моноклонално антитяло от мишка, специфично за човешки протеини. Колкото повече първични антитела са свързани с дъното на ямките, толкова повече вторични антитела ще се свържат и съответно интензитетът на сигнала ще бъде по-голям (произведена светлина или оцветяване).

4. Серумът от пробата се пипетира в ямките и хепсидинът се свързва с имобилизирани антитела в ямките. Остава се известно време, през което серумът да реагира с антителата.

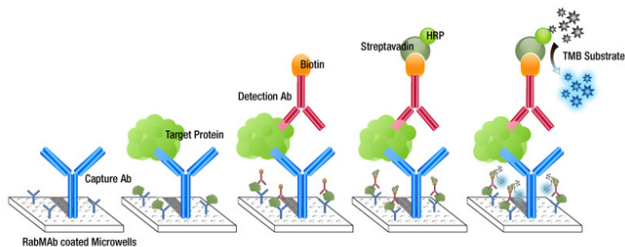
5. След това се добавят антитела за човешки хепсидин, свързани с биотин.

6. Добавя се ензима HRP, конюгиран със стрептавидин. HRP (пероксидазата от растението конска опашка) е протеин с маса от 40 kDa, който катализира окисляването на неговия субстрат в присъствието на водороден прекис, при което възниква оцветено съединение като продукт или пък се появява емисия на светлина като вторичен продукт на реакцията. HRP оптимално работи при неутрално рН на средата, а може да бъде инхибиран чрез добавяне на цианид, сулфиди и азид. Ензимът се свързва с постоянен регион от вторичното анти тяло (без да се наруши структурата на антиген-свързващия домейн).

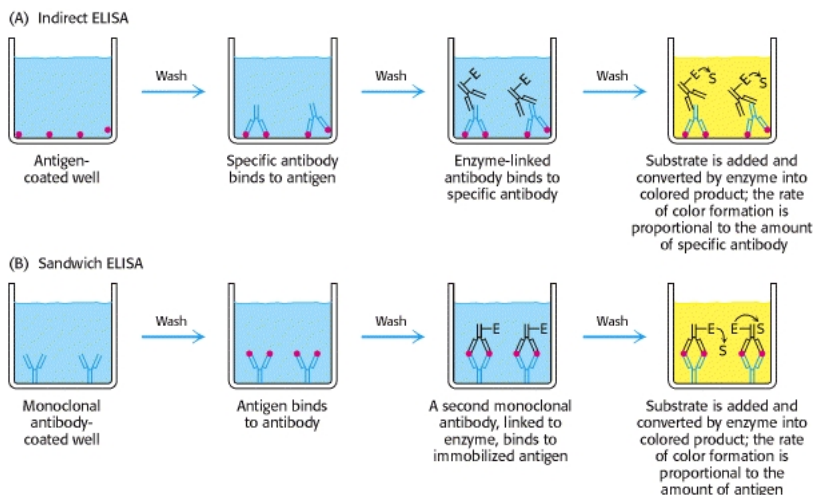
7. Два часа плаките се разбъркват, след което се извършва изплакване на несвързаните антитела.

8. След това се добавя тетра метил бензидин, ТМВ (3,3, 5,5 '-tetramethylbenzidine) субстрат, който произвежда цветни продукти, което показва количеството на свързания хепсидин. Конюгираните ензими катализират превръщането на субстрата в цветни продукти.

9. Накрая се добавя стопиращ разтвор на сярна киселина 0,5 М H_2SO_4 и същевременно цветът се променя от синьо в жълто. Интензивността на оцветяването се измерва чрез интензивността на емисията на светлина на 450 nm на спектрофотометри, предназначени за тази цел, наречени "четци на Елайза" , в които се поставя плаката.



Фигура 2. Схема на конкурентна ELISA метод за определяне на концентрацията на хепсидин в серум



Фигура 3. Схема на конкурентна ELISA метод за определяне на концентрацията на хепсидин в серум

б) Предварителната подготовка на реактивите включва следните етапи:

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

2. Изготвяне на стандарти: във флакончето с лиофилизиран стандарт се добавя 0.2 mL дейонизирана вода и се остава да престои поне 10 минути. Преди употреба се разбърква.

Концентрации на стандартите: 0 - 2 - 6.5 - 25 - 45 - 80 ng / mL

За преобразуване: 1 ng / mL = 0.358 nmol / L.

3. Изготвяне на контрола: във флаконите с лиофилизиран контрол (ниски и високи) се добавя 0.2 mL дейонизирана вода и се оставя да престои поне 10 минути. Преди употреба се разбърква.

4. Изготвяне на препарат: в 40X концентриран препарат се добавя дейонизирана вода. Разрежда се 30 mL от концентрирания препарат в 1170 mL дейонизирана вода до краен обем 1200 mL.

5. Останали реактиви: буферът за анализа, ензимният конюгат, ензимният комплекс, субстратният разтвор и стопирацията разтвор са фабрично подготвени за използване.

6. Серумите за количествено определяне на хепсидина се размразяват, вортексират и центрофугират при 4000 обороти / 10 минути.

в) Измервателен обхват на метода - 0.35 - 80 ng / mL.

г) Очаквани нормални стойности на хепсидина според производителя: 1 - 39,3 ng/mL средно 10,1 ng / mL.

д) Протоколът за количествено определяне на хепсидина в серума включва следните стъпки:

1) В микротитарните ямки слагаме 100 μ l на буфер за анализа.

2) В 6 ямки слагаме 20 μ l от всеки от шестте стандарти; в 2 ямки слагаме 20 μ l от контролните разтвори, а в останалите ямки слагаме 20 μ l от пробите от изследваните лица.

3) Слагаме 50 μ l на ензимен конюгат във всяка ямка.

4) Разбърква се 10 секунди.

5) Инкубира се 60 минути при стайна температура чрез завъртане (300-700 оборота в минута).

6) Премахва се съдържанието от ямките.

7) Ямките се изплакват 3 x 400 μ l с разреден разтвор за пране.

8) Ямките се обръщат върху абсорбираща хартия, за да премахнат остатъчните капки. Важна забележка: чувствителността и точността на този анализ зависи до голяма степен от правилното изпълнение на процедурата за приготвянето на разредения разтвор за пране!

9) Слагаме 100 μ l ензимен комплекс в съответните ямки.

10) Инкубира се 30 минути при стайна температура.

- 11) Разклаща се съдържанието на ямките.
- 12) Ямките се изплакват с разреден разтвор за пране 3 x 400 μ l.
- 13) Ямките се обръщат върху абсорбираща хартия, за да се премахнат остатъчните капки.
- 14) Във всяка ямка добавяме 100 μ l субстратен разтвор.
- 15) Инкубира се 20 минути при стайна температура.
- 16) Ензимната реакция се спира чрез добавяне на 100 μ l стоп разтвор във всяка ямка.

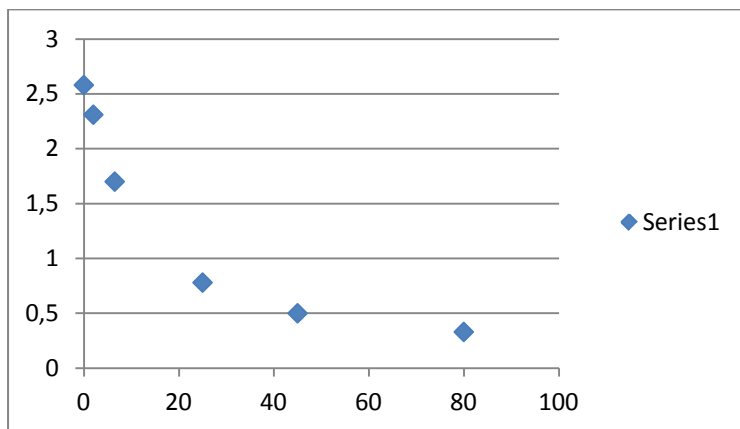
Определя се абсорбцията (OD) на всяка ямка на 450 ± 10 nm с микротитарски четец на плочки. Препоръчва се ямките да бъдат прочетени в рамките на 10 минути след добавянето на стоп разтвора.

6. РЕЗУЛТАТИ

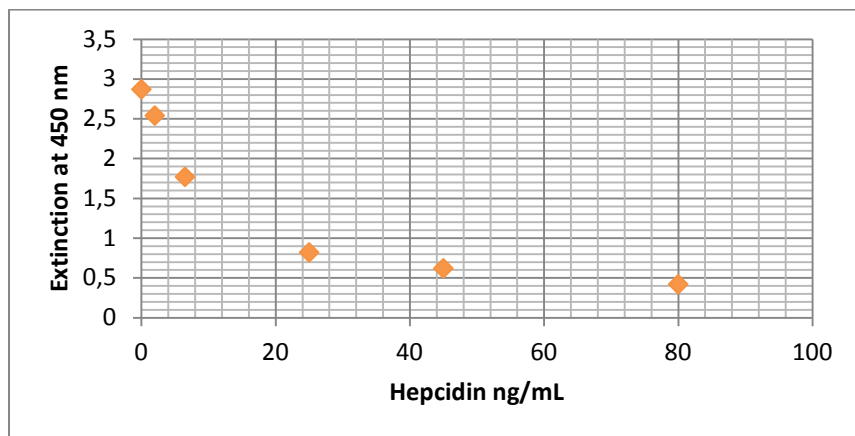
6.1. Определяне на аналитичния обхват на ELISA метода за определяне на концентрацията на хепсидина в серума чрез поставяне на калибрационна крива

Първият етап от процеса за валидиране на ELISA метода за определяне на концентрацията на хепсидина в серума е създаването на калибрационна крива.

Според инструкциите на производителя, с помощта на стандарти (концентрации на стандартите: 0 - 2 - 6.5 - 25 - 45 - 80 ng / mL) създадохме калибрационна крива (фиг. 4 и 5).



Фигура 4. Калибрационната крива на ELISA метода за определяне на концентрацията на хепсидин - очакваната крива



Фигура 5. Калибрационна крива на ELISA метода за определяне на концентрацията на хепсидин – нашата крива

На калибрационната крива (на фиг. 4 и на фиг. 5) на X-ос е хепсидинът (ng/mL), а на Y-ос е екстинкцията на 450 nm.

6.2. Определяне на границата на откриване на метода (Limit of Detection)

Според препоръките на производителя тя е 0.35 ng/mL, а ние открихме най-ниската стойност 1,24 ng / mL.

6.3. Определяне на точността на метода

За тази цел използвахме контроли: за ниския контрол получихме средна стойност 7,49 ng/mL (приемлив ранг 4,49-10,5 ng/mL), докато средната стойност за високия контрол при нас бе 29,4 ng/mL (приемлив ранг 19,1-39,7 ng/mL).

6.4. Определяне на границите на референтната област на хепсидина

Използвахме програмата Sigma plot за статистическа обработка на събраните данни и определихме границата на референтната област (табл. 1).

Таблица 1. Определяне на границите на референтната област на хепсидина

| Колона | Брой изследвани | Средна | Стандартно отклонение | Std. Error | C.I. of Mean | |
|--------|-----------------|----------|-----------------------|------------|--------------|--------|
| Жени | 60 | 6,164 | 3,203 | 0,413 | 0,827 | |
| Мъже | 60 | 12.338 | 7.370 | 0.952 | 1.904 | |
| Общо | 120 | 9,251 | 6,452 | 0,589 | 1,166 | |
| Колона | Ранк | Максимум | Минимум | Медиана | 5% | 95% |
| Жени | 13,510 | 14,750 | 1,240 | 5,605 | 2,740 | 13,208 |
| Мъже | 33.465 | 36.465 | 3.000 | 10.973 | 3.493 | 30.471 |
| Общо | 35,225 | 36,465 | 1,240 | 6,775 | 2,933 | 21,913 |

Резултатите от статистическия анализ на концентрацията на хепсидина в серума при клинично здрави лица са представени в таблица 1.

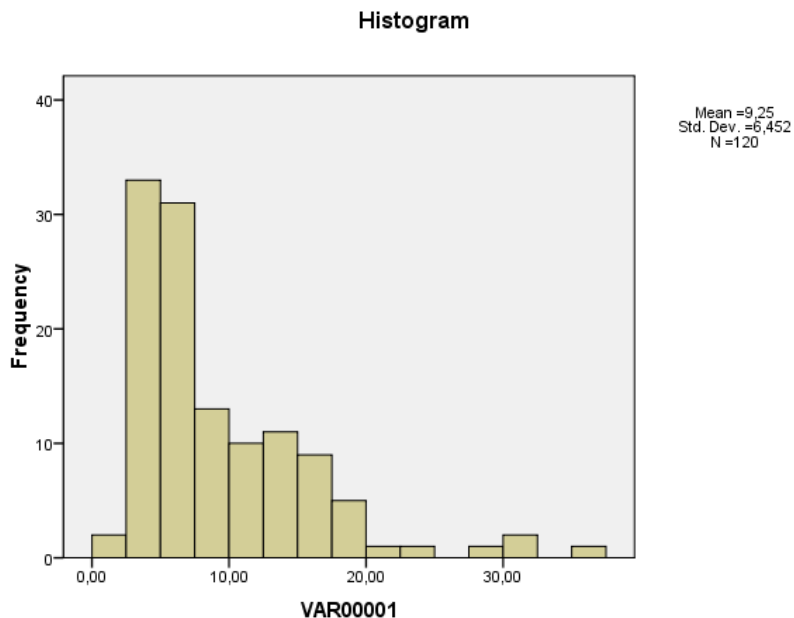
Таблица 2. Резултати от статистическия анализ на концентрацията на хепсидин в серума на клинично здрави лица

| Статистически тест* | Мъже | Жени | Общо |
|--|--------|--------|--------|
| Colmogorov-Smirnoff (Dmax) | 0,108 | 0,136 | 0,163 |
| Colmogorov-Smirnoff sig. | 0,080 | 0,008 | <0,001 |
| Коефициент на асиметрия (skewness, Gs) | 1,132 | 1,004 | 1,648 |
| Коефициент на сплеснатост (kurtosis, Gk) | 1,429 | 0,426 | 3,381 |
| Shapiro-Wilk | 0,904 | 0,910 | 0,846 |
| Shapiro-Wilk Sig | <0,001 | <0,001 | <0,001 |

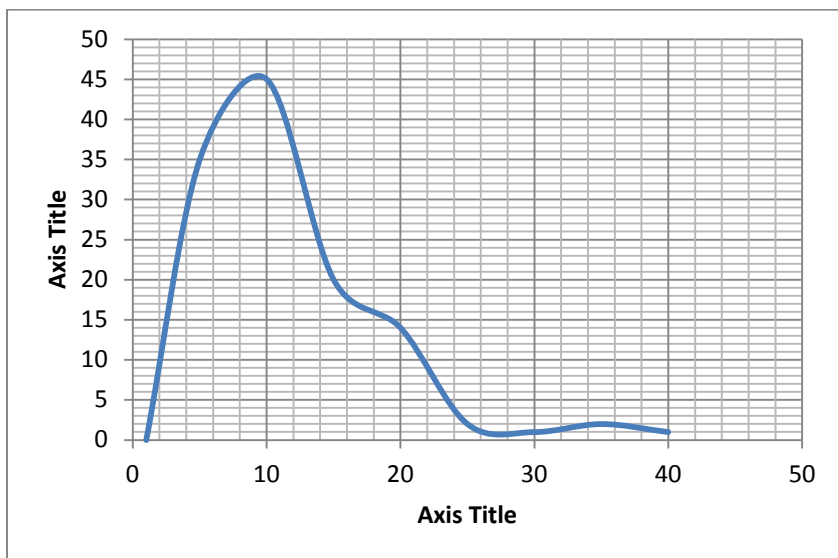
* посочена е значимостта на статистическите критерии при доверителна вероятност от $1-P \geq 0.95$.

Параметрична оценка на получените референтни интервали на хепсидина за общата група клинично здрави мъже и жени при 95% референтен интервал е **2,933 - 21,913 ng/ml**.

Разпредението на получените стойности за концентрацията на хепсидина в серума при клинично здрави лица е показано на фигура 6.



Фигура 6. Разпределението на получените стойности за концентрацията на хепсидин в серума при клинично здрави лица

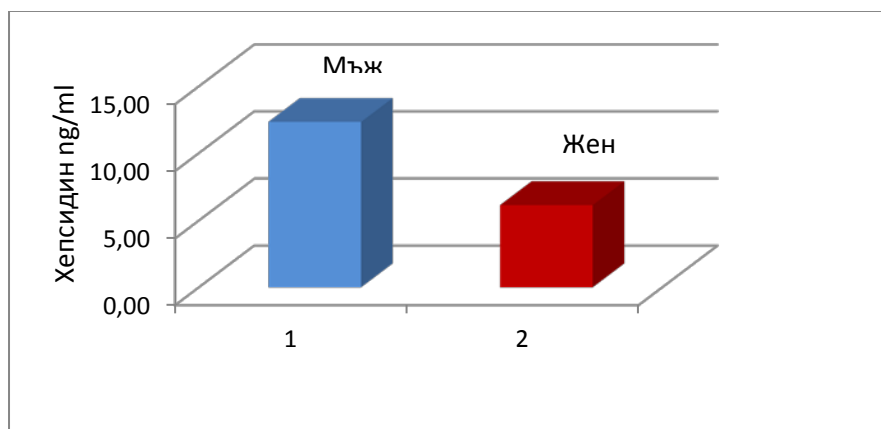


Фигура 7. Разпределение на честотата на концентрацията на хепсидин в серума при всички 120 здрави лица

Хистограмата (фиг. 7) показва неправилно гаусово разпределение, наклонено наляво поради големия процент на хора със стойност 10 ng/ml (45 изследвани), стойност под 10 ng/ml (35 изследвани) и стойност 15 ng/ml (20 изследвани). Само при 20 изследвани лица са наблюдавани стойности по-големи от 20 ng/ml. Неправилното гаусово разпределение статистически се потвърждава от получения Колмогоров-Смирнов тест за разпределение ($r = 0,163$, $p < 0,001$), от коефициента на асиметрия (skewness: $r = 1,648$; $p < 0,0001$) и от коефициента на сплеснатост (kurtosis: $r = 3,381$, $p < 0,0001$).

6.5. Разпределение на стойностите на концентрацията на хепсидин с имуносорбентна ELISA метод според пола

Получените резултати от концентрацията на хепсидин по пол при клинично здрави лица на средна възраст от 18 до 60 години е представено на фиг. 8.



Фигура 8. Разпределение на резултатите за определянето на концентрацията на хепсидин по пол при клинично здрави лица на средна възраст от 18 до 60 години

Бе открита статистически значима разлика между двата пола ($P < 0.001$).

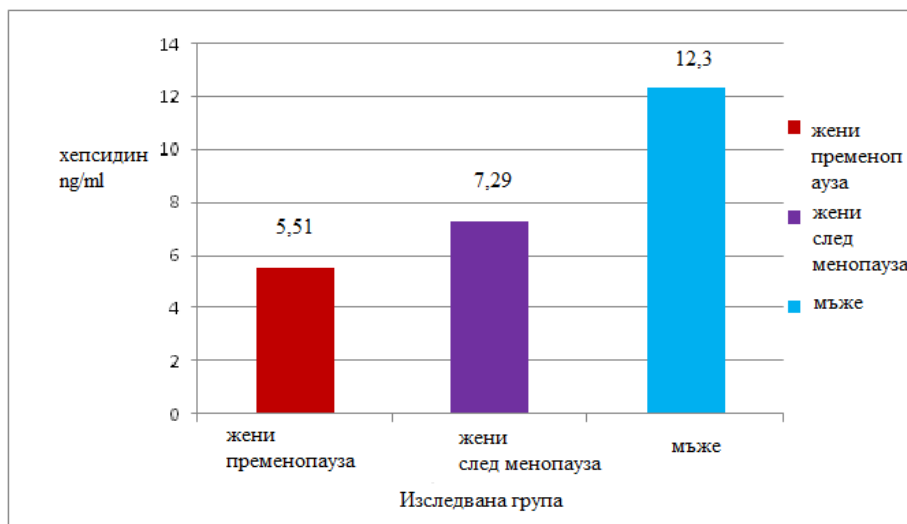
Таблица 3 представя концентрацията на хепсидин в серума при мъже и жени в контролната група.

Таблица 3. Концентрация на хепсидин в серума при мъже и жени в контролната група

| Мъже (n=60) | Жени (n=60) |
|--------------------|------------------|
| 12,34 ± 7,37 ng/ml | 6,16 ± 3,2 ng/ml |

Бе открита статистически значима разлика между жените в пременопауза и жените след менопауза; както и при групата на жените в пременопауза и след менопауза спрямо мъжете.

Получените резултати са представени на фигура 9.



Фигура 9. Резултати от определянето на концентрацията на хепсидин в серума в зависимост от пола и менструалния цикъл при жените

Концентрацията на хепсидин в серума при жените в пременопауза е $5,51 \pm 2,8$ ng/ml; при жените след менопауза е $7,29 \pm 3,5$ ng/ml 9; а при мъжете е $12,34 \pm 7,37$ ng/ml. Корелационните зависимости между отделните групи са:

- жени в пременопауза / жени в менопауза – $p = 0,042$ за $p < 0,05$;
- мъже / жени в пременопауза – $p = 0,0001$ за $p < 0,01$;
- мъже / жени в менопауза – $p = 0,002$ за $p < 0,01$.

Хепсидинът има значимо по-високи средни стойности в групата здрави мъже в сравнение със здравите жени в пременопауза и след менопауза, и разликата е статистически сигнификантна.

6.7. Резултати от сравнителните анализи на изследваните лица от контролната група (контролна група) и изследваната група (групата с метаболитен синдром)

В тази част от изследването са показани резултатите, получени чрез сравняване на здравите и болните лица с метаболитен синдром.

При това, за параметрите, за които не се потвърди сигнификантна разлика по пол, са тествани само разликите между контролната и изследваната група, докато за параметрите, за които се установи значима разлика по пол, са сравнени разликите между мъжете от контролната група и мъжете от изследваната група, както и при жените от двете групи.

6.7.1. Анализ на хематологичните параметри в контролната група и групата с метаболитен синдром

Мъжете без метаболитен синдром и с метаболитен синдром несигнификантно се различават по отношение на средните стойности на еритроцити ($t = 0,4$ $p = 0,69$), по отношение на средните стойности на хемоглобин ($t = 0,7$ $p = 0,48$) и по отношение на средните стойности на хематокрит ($t = 1,53$ $p = 0,13$) (табл. 4).

Средната стойност на еритроцитите в контролната и в проучваната група мъже е $5,05 \pm 0,4 \times 10^{12}/l$ и $5,02 \pm 0,37 \times 10^{12}/l$. Средната стойност на хемоглобина е $149,7 \pm 11,75$ g/l в групата на здравите мъже и $148,4 \pm 8,79$ g/l в групата на болните мъже. В групата на здравите мъже и в групата на мъжете с метаболитен синдром хематокритът има средна стойност от $0,43 \pm 0,03\%$ и $0,44 \pm 0,03\%$.

Жените в контролна група и в групата с метаболитен синдром имат несигнификантни разлики в средните стойности на еритроцити ($4,6 \pm 0,4 \times 10^{12}/l$ / $4,64 \pm 0,35 \times 10^{12}/l$; $t = 0,4$ $p = 0,69$) и хематокрит ($0,398 \pm 0,03\%$ / $0,4 \pm 0,03\%$; $t = 0,46$ $p = 0,64$).

В тази група жени, сред здравите и болните, се потвърди значима разлика в средните стойности на хемоглобина ($t = 1,98$ $p = 0,049$). Здравите жени имат значимо по-ниски средни стойности на

хемоглобин в сравнение с жените с метаболитен синдром ($129,82 \pm 9,3 \text{ g/l}$ / $133,3 \pm 10,14 \text{ g/l}$).

Таблица 4. Сравнителен анализ на хематологичните параметри на изследваните лица от контролната група (контролна група) и от изследваната група (групата с метаболитен синдром)

| Параметър (мерна единица) | КОНТРОЛНА ГРУПА N = 120 | | ГРУПА С МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ N = 120 | |
|---|----------------------------|---------------------------|--|--------------------------|
| | Мъже n=60 | Жени n= 60 | Мъже n=60 | Жени n=60 |
| Еритроцити ($\times 10^{12}/\text{л}$) mean \pm SD, median | 5,05 \pm 0,4 5,13 | 4,6 \pm 0,4 4,57 | 5,02 \pm 0,37 4,98 | 4,64 \pm 0,35 4,65 |
| Тествани разлики: мъже контролна група / мъже с метаболитен синдром t = 0,4 p=0,69 ns; жени контролна група/ жени с метаболитен синдром t = 0,57 p=0,56 ns | | | | |
| Хемоглобин (g/l) mean \pm SD, median | 149,7 \pm 11,7 150,5 | 129,82 \pm 9,3 130 | 148,4 \pm 8,79 149 | 133,3 \pm 10,14 133 |
| Тествани разлики: мъже контролна група / мъже с метаболитен синдром t = 0,7 p=0,48 ns; жени контролна група / жени с метаболитен синдром t = 1,98 p=0,049* | | | | |
| Хематокрит (%) mean \pm SD, median | 0,43 \pm 0,03 0,44 | 0,398 \pm 0,03 0,397 | 0,44 \pm 0,03 0,45 | 0,4 \pm 0,03 0,4 |

Тествани разлики: мъже контролна група / мъже с метаболитен синдром $t = 1,53$
 $p=0,13$ ns;
жени контролна група / жени с метаболитен синдром $t = 0,46$ $p=0,64$ ns

6.7.2. Анализ на деградационните параметри в контролната група и групата с метаболитен синдром

Мъжете от контролната група и от групата с метаболитен синдром имат несигнификантни различия в стойностите на уреята ($Z = 0,87$ $p = 0,38$) и креатинина ($Z = 0,81$ $p = 0,42$), а значима разлика в стойностите на пикочната киселина ($Z = 2,5$ $p = 0,038$). За $p < 0,05$ здравите мъже имат значително по-ниски стойности на пикочната киселина в сравнение с мъжете с метаболитен синдром (медиана $342,62 \mu\text{mol/l}$ и $355,4 \mu\text{mol/l}$) (табл. 5).

Жените от контролната група и от групата с метаболитен синдром несигнификантно се различават по отношение на стойностите на креатинин ($Z = 0,37$ $p = 0,7$). Жените без метаболитен синдром и с метаболитен синдром имат значително различни стойности на уреята ($Z = 2,76$ $p = 0,0059$) и пикочната киселина ($Z = 3,66$ $p = 0,00025$). Медианата на уреята и пикочната киселина в контролната и в изследваната група жени е $1,65 \text{ mmol/l} / 4,12 \text{ mmol/l}$ и $262,73 \mu\text{mol/l} / 316,9 \mu\text{mol/l}$). Жените от контролната група имат сигнификантно по-ниски стойности на уреята и пикочната киселина компарирано с жените от групата с метаболитен синдром

Таблица 5. Сравнителен анализ на деградационните параметри на изследваните лица от контролната група (контролна група) и от изследваната група (групата с метаболитен синдром)

| Параметър (мерна единица) | КОНТРОЛНА ГРУПА N = 120 | | ГРУПАТА МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ N = 120 | |
|---|----------------------------|---------------|---|-------------|
| | Мъже n= 60 | Жени n= 60 | Мъже n=60 | Жени n=60 |
| Урея (mmol/l) | | | | |
| mean±SD, | 4,89±1,75 | 3,52±1,45 | 4,58±1,74 | 4,54±2,1 |
| median | 4,66 | 3,165 | 4,4 | 4,12 |
| Тествани разлики: мъже контролна група / мъже с метаболитен синдром Z = 0,87 p=0,38 ns; жени контролна група / жени с метаболитен синдром Z = 2,76 p=0,0059** | | | | |
| Креатинин(μmol/l) | | | | |
| mean±SD, | 81,87±12,9 | 69,83±9,5 | 80,34±15,02 | 71,48±18,5 |
| median | 81,2 | 69,85 | 79,7 | 69,1 |
| Тествани разлики: мъже контролна група / мъже с метаболитен синдром Z = 0,81 p=0,42 ns; жени контролна група / жени с метаболитен синдром Z = 0,37 p=0,7 ns | | | | |
| Пикочна киселина (μmol/l) | | | | |
| mean±SD, | 339,5± 60,4 | 269,1± 55,6 | 363,8±71,96 | 322,1±74,07 |
| median | 342,62 | 262,73 | 355,4 | 316,9 |
| Тествани разлики: мъже контролна група / мъже с метаболитен синдром Z = 2,5 p=0,038*; жени контролна група / жени с метаболитен синдром Z = 3,66 p=0,00025** | | | | |

p <0.05 ** p <0,01

Резултатите от изследването показват, че контролната група и групата с метаболитен синдром имат сигнификантно различни средни стойности на кръвната захар ($t = 10,5$ $p < 0,001$). Средните стойности на кръвната захар са значително по-ниски в групата на здравите лица компарирано с лицата от групата с метаболитен синдром ($5,26 \pm 0,55$ mmol/l / $7,71 \pm 2,48$ mmol/l) (табл. 6).

Таблица 6. Сравнителен анализ на кръвната захар на изследваните лица от контролната група (контролна група) и от изследваната група (групата с метаболитен синдром)

| Параметър (мерна единица) | КОНТРОЛНА ГРУПА N = 120 | ГРУПАТА С МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ N = 120 |
|---|----------------------------|---|
| | Общо N = 120 | Общо N = 120 |
| Глюкоза (mmol/l) mean \pm SD, median | 5,26 \pm 0,55 5,3 | 7,71 \pm 2,48 7,05 |
| Тествани разлики: контролна група / група с метаболитен синдром $t = 10,5$ $p < 0,001$ ** | | |

** $p < 0,01$

6.7.3. Анализ на липидния статус в контролната група и групата с метаболитен синдром

Средната стойност на холестерола има стойност $5,05 \pm 0,8$ mmol/l в контролната група и $5,39 \pm 1,22$ mmol/l в групата с метаболитен синдром. Разликата в средната стойност от 0,3 mmol/l се потвърди като статистически значима ($t = 2,6$ $p = 0,01$), което се дължи на сигнификантно по-високите средни стойности на холестерола в групата с метаболитен синдром в сравнение с групата на здравите лица (табл. 7).

Табл. 7. Сравнителен анализ на серумните стойности на холестерола на изследваните лица от контролната група (контролна група) и от изследваната група (групата с метаболитен синдром)

| Параметър (мерна единица) | КОНТРОЛНА ГРУПА N = 120 | ГРУПАТА С МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ N = 120 |
|--|----------------------------|---|
| | Общо N = 120 | Общо N = 120 |
| Холестерол (mmol/l) mean±SD, median | $5,05 \pm 0,8$ 5,235 | $5,39 \pm 1,22$ 5,21 |
| Тествани разлики: контролна група / група с метаболитен синдром $t=2,6$ $p=0,01^*$ | | |

* $p < 0,05$

Резултатите от нашето изследване показват, че мъжете от контролната група и от групата с метаболитен синдром имат несигнификантно различни стойности на LDL-холестерола, а всички останали анализирани параметри на липидния статус като HDL-холестерол, триглицериди, ApoA и ApoB значимо се различават между мъжете от контролната група и групата с метаболитен синдром (табл. 8).

Мъжете от контролната група имат сигнификантно по-високи средни стойности на HDL-холестерола в сравнение с мъжете от изследваната група ($1,4 \pm 0,3$ mmol/l / $1,19 \pm 0,29$ mmol/l; $t = 3,8$ $p = 0,0002$).

Триглицеридите са със значимо по-ниски стойности в контролната група мъже в сравнение с групата болни мъже (медиана $1,44$ mmol/l / $2,33$ mmol/l; $Z = 5,98$ $p < 0,001$).

Стойностите на ApoA са значимо по-високи в групата на мъжете без метаболитен синдром в сравнение с групата на мъжете с метаболитен синдром (медиана 99 mg/dl / 78 mg/dl; $Z = 2,33$ $p = 0,02$).

В контролната група мъже са регистрирани значимо по-ниски средни стойности на ApoB компарирано с изследваната група мъже ($150,6 \pm 33,3$ mg/dl / $179,2 \pm 30,79$ mg/dl; $t = 4,89$ $p = 0,000003$).

Жените от контролната група и от групата с метаболитен синдром и мъжете несигнификантно се различават по отношение на стойностите на LDL-холестерола и значимо се различават по отношение на HDL-холестерола, триглицеридите, ApoA и ApoB.

Средните стойности на HDL-холестерола в групата на здравите жени и на болните жени възлиза на $1,58 \pm 0,4$ mmol/l и $1,32 \pm 0,28$ mmol/l. Установена е статистически значима разлика между двете групи ($t = 3,87$ $p = 0,00018$), в резултат на значимо по-високите средни стойности в контролната група жени.

Стойностите на триглицеридите са значимо по-ниски в групата на жените без метаболитен синдром (медиана $1,05$ mmol/l / $1,81$ mmol/l; $Z = 5,68$ $p < 0,001$).

Жените от контролна група са със значимо по-високи стойности на ApoA в сравнение с жените от групата с метаболитен синдром (медиана $133,5$ mg/dl / $82,5$ mg/dl; $Z = 4,47$ $p = 0,000008$).

В групата на здравите жени са регистрирани значимо по-ниски средни стойности на ApoB в сравнение с групата на жените с метаболитен синдром ($148,16$ mg/dl / $155,42$ mg/dl; $t = 2,03$ $p = 0,044$).

Таблица 8. Сравнителен анализ на липидния статус на изследваните лица от контролната група (контролна група) и от изследваната група (групата с метаболитен синдром)

| Параметър (мерна единица) | КОНТРОЛНА ГРУПА N = 120 | | ГРУПА С МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ N = 120 | |
|---|----------------------------|------------------------|---|-----------------------|
| | Мъже n=60 | Жени n= 60 | Мъже =60 | Жени n=60 |
| HDL-холес (mmol/l) mean±SD, median | 1,4 ± 0,3 1,39 | 1,58 ± 0,4 1,6 | 1,19 ± 0,29 1,11 | 1,32 ± 0,28 1,3 |
| Тествани разлики: мъже контролна група / мъже с метаболитен синдром t = 3,8 p=0,0002**; жени контролна група / жени с метаболитен синдром t = 3,87 p=0,00018** | | | | |
| LDL-хол. (mmol/l) mean±SD, median | 3,025±0,55 3,07 | 2,88 ± 0,7 2,86 | 2,95 ± 1,5 2,98 | 2,87 ± 1,09 2,94 |
| Тествани разлики: мъже контролна група / мъже с метаболитен синдром Z = 0,5 p=0,58 ns; жени контролна група / жени с метаболитен синдром Z = 0,07 p=0,09 ns | | | | |
| Триглицериди(mmol/l) mean±SD, median | 1,49 ± 0,5 1,44 | 1,185 ± 0,5 1,05 | 2,59 ± 1,26 2,33 | 1,97 ± 0,84 1,81 |
| Тествани разлики: мъже контролна група / мъже с метаболитен синдром Z = 5,98 p<0,001**; жени контролна група / жени с метаболитен синдром Z = 5,68 p<0,001** | | | | |
| АpoA (mg/dl) mean±SD, median | 112,62±57,6 99,0 | 136,47 ± 48,4 133,5 | 89,42± 30,7 78 | 99,93 ± 28,67 82,5 |
| Тествани разлики: мъже контролна група / мъже с метаболитен синдром Z = 2,33 p=0,02*; жени контролна група / жени с метаболитен синдром Z = 4,47 p=0,000008** | | | | |

| | | | | |
|--|--------------|--------------|-------------|--------------|
| АpoB (mg/dl) | | | | |
| mean±SD, | 150,6 ± 33,3 | 148,04±39,42 | 179,2±30,79 | 161,22±31,13 |
| median | 150,775 | 148,16 | 183,08 | 155,42 |
| Тествани разлики: мъже контролна група / мъже с метаболитен синдром t=4,89 p=0,000003**; | | | | |
| жени контролна група / жени с метаболитен синдром t=2,03 p=0,044* | | | | |

*p < 0,05 **p < 0,01

6.7.4. Анализ на ензимния статус в контролната група и групата с метаболитен синдром

Анализът на ензимния статус сред мъжете от контролната група и от групата с метаболитен синдром показва, че двете групи мъже имат несигнификантно различни стойности на АЛАТ и АСАТ ($Z = 0,97$ $p = 0,33$ и $Z = 0,42$ $p = 0,67$). Сред здравите и болните мъже е регистрирана значима разлика в стойностите на ГГТ ($Z = 4,49$ $p = 0,000007$). Медианата на ГГТ в контролната група мъже възлиза на 25,15 U/L и е значимо по-ниска от медианата в изследваната група мъже, която е на стойност 40 U/L (Табл.9).

Жените от контролната група и от групата с метаболитен синдром значимо се различават по отношение на стойностите на АЛАТ, АСАТ и ГГТ.

В контролната група жени се регистрират значимо по-ниски стойности на АЛАТ спрямо изследваната група жени (медиана 19.8 U/L / 23,7 U/L; $Z = 2,4$ $p = 0,016$).

Стойностите на АСАТ са значимо по-ниски в групата на здравите жени компарирано с групата на болните жени (медиана 23,1 U/L / 25,5 U/L; $Z = 2,14$ $p = 0,03$).

ГГТ ензимът има сигнификантно по-ниски стойности в групата на жените без метаболитен синдром в сравнение с групата на жените с метаболитен синдром (медиана 13,95 U/L / 22,6 U/L; $Z = 4,14$ $p = 0,000006$).

Таблица 9. Сравнителен анализ на ензимния статус на изследваните лица от контролната група (контролна група) и от изследваната група (групата с метаболитен синдром)

| Параметър (мерна единица) | КОНТРОЛНА ГРУПА N = 120 | | ГРУПА С МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ N = 120 | |
|--|----------------------------|--------------|--|---------------|
| | Мъже n= 60 | Жени n= 60 | Мъже n=60 | Жени n=60 |
| АЛАТ (U/L) | | | | |
| mean±SD, | 39,67 ± 19,8 | 24,28 ± 13,3 | 43,59 ± 20,97 | 28,27 ± 15,09 |
| median | 35,025 | 19,8 | 39,23 | 23,7 |
| Тествани разлики: мъже контролна група / мъже с метаболитен синдром $Z = 0,97$ $p=0,33$; жени контролна група / жени с метаболитен синдром $Z = 2,4$ $p=0,016^*$ | | | | |
| АСАТ (U/L) | | | | |
| mean±SD, | 31,26 ± 8,8 | 25,42 ± 7,9 | 33,55 ± 15,56 | 28,33 ± 10,84 |
| median | 27,8 | 23,1 | 28,3 | 25,55 |
| Тествани разлики: мъже контролна група / мъже с метаболитен синдром $Z=0,42$ $p=0,67$; жени контролна група / жени с метаболитен синдром $Z=2,14$ $p=0,03^*$ | | | | |

| ГГТ (U/L) | | | | |
|---|---------------|--------------|---------------|---------------|
| mean±SD, | 39,63 ± 20,05 | 18,09 ± 14,0 | 45,86 ± 22,66 | 27,41 ± 17,68 |
| median | 25,15 | 13,95 | 40,0 | 22,6 |
| Тествани разлики: мъже контролна група / мъже с метаболитен синдром Z = 4,49 p=0,000007**; | | | | |
| жени контролна група / жени с метаболитен синдром Z = 4,14 p=0,000006** | | | | |

*p < 0,05 **p < 0,01

6.7.5. Анализ на CRP в контролната група и групата с метаболитен синдром

Стойностите на С-реактивния протеин в групата пациенти с метаболитен синдром сигнификантно се различава между мъжете от контролната група и мъжете от групата с метаболитен синдром ($Z = 4,43$ $p = 0,000009$), както и сред жените от контролната група и групата с метаболитен синдром ($Z = 2,4$ $p = 0,016$), в резултат на значимо по-ниските стойности на този параметър в групата на здравите срещу болните мъже и в групата на здравите срещу болните жени.

Медианата на CRP в контролната и в проучваната група мъже възлиза на 1,96 mg/l и 2,63 mg/l, докато в контролната и проучваната група жени тя възлиза на 1,795 mg/l и 3,35 mg/l (табл. 10).

Таблица 10. Сравнителен анализ на серумните стойности на С-реактивния протеин на изследваните лица от контролната група (контролна група) и от изследваната група (групата с метаболитен синдром)

| Параметър (мерна единица) | КОНТРОЛНА ГРУПА N = 120 | | ГРУПА С МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ N = 120 | |
|---|----------------------------|------------|--|-------------|
| | Мъже n= 60 | Жени n= 60 | Мъже n=60 | Жени n=60 |
| CRP(mg/l) | | | | |
| mean±SD, | 2,69 ± 2,3 | 3,06 ± 3,2 | 4,34±5,06 | 5,56 ± 5,34 |
| median | 1,96 | 1,795 | 2,63 | 3,35 |
| Тествани разлики: мъже контролна група / мъже с метаболитен синдром Z = 4,43 p=0,000009**; | | | | |
| жени контролна група / жени с метаболитен синдром Z = 2,4 p=0,016* | | | | |

* p <0.05 ** p <0,01

6.7.6. Анализ на желязото, неговите транспортъори феритин, трансферин и хормона регулатор на желязото - хепсидин в контролната група и групата с метаболитен синдром

Сред мъжете от контролната и проучваната група съществува значима разлика в стойностите на серумното желязо, феритин и хепсидин, а несигнификантна разлика по отношение на стойностите на трансферин (табл. 11).

Средната стойност на серумното желязо в групата на здравите мъже е $15,03 \pm 5,77 \mu\text{mol/l}$ и е сигнификантно ($t = 2,18$ $p =$

0,03) по-ниска от средната стойност в групата на мъжете с метаболитен синдром, която възлиза на $17,23 \pm 5,22 \mu\text{mol/l}$.

Феритинът има значимо по-ниска стойност в контролната група мъже компарирано с групата на болните мъже (медиана 116 ng/ml / $149,5 \text{ ng/ml}$; $Z = 3,2$ $p = 0,01$).

За $p < 0,01$ се потвърждава значима разлика в средните стойности на хепсидина между мъжете от групата здрави лица и от групата с метаболитен синдром ($t = 5,18$ $p = 0,000001$). Средните стойности на хепсидина в контролната група и групата на мъжете с метаболитен синдром възлизат на $12,34 \pm 7,37 \text{ ng/mL}$ и $25,54 \pm 18,33 \text{ ng/mL}$, т.е. те са сигнификантно по-ниски в групата на здрави мъже.

Сред жените от контролната и изследваната група съществува значима разлика в стойностите на феритина и хепсидина и несигнификантна разлика по отношение на стойностите на серумното желязо и трансферина.

Жените в контролната група имат несигнификантно по-ниски средни нива на серумно желязо от жените в групата с метаболитен синдром ($12,91 \pm 6,1 \mu\text{mol/l}$ / $14,36 \pm 4,99 \mu\text{mol/l}$; $p > 0,05$). Несигнификантно по-ниски стойности на трансферин имат и жените от контролната група (медиана 238 mg/dl / 239 mg/dl ; $p > 0,05$).

В групата на здравите жени са регистрирани значимо по-ниски стойности на феритин в сравнение с жените от групата с метаболитен синдром (медиана 56 ng/ml / 111,5 ng/ml; $Z = 4,8$ $p = 0,000002$).

Стойностите на хепсидина в контролната група жени и групата жени с метаболитен синдром средно възлизат на $6,16 \pm 3,2$ ng/mL и $11,23 \pm 5,3$ ng/mL. Разликата в средните стойности между двете групи жени от 5,07 ng/mL се потвърди статистически като значима ($t = 6,3$ $p < 0,001$), т.е. здравите жени имат значително по-ниски стойности на хепсидин в сравнение с жените с метаболитен синдром.

Таблица 11. Сравнителен анализ на серумните стойности на желязото, феритина, трансферина, хепсидина на изследваните лица от контролната група (контролна група) и от изследваната група (групата с метаболитен синдром)

| Параметър (мерна единица) | КОНТРОЛНА ГРУПА N = 120 | | ГРУПАТА С МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ N = 120 | |
|---|----------------------------|-----------------|---|------------------|
| | Мъже n=60 | Жени n= 60 | Мъже n=60 | Жени n=60 |
| Желязо ($\mu\text{mol/l}$) | | | | |
| mean \pm SD, | 15,03 \pm 5,77 | 12,91 \pm 6,1 | 17,23 \pm 5,22 | 14,36 \pm 4,99 |
| median | 13,85 | 12,2 | 16,3 | 13,5 |
| Тествани разлики: мъже контролна група/мъже с метаболитен синдром $t = 2,18$ | | | | |

| | | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|
| p=0,03*; жени контролна група / жени с метаболитен синдром t = 1,4 p=0,16 ns | | | | |
| Феритин (ng/ml) | | | | |
| mean±SD, | 120,2± 70,67 | 69,01± 49,36 | 197,9± 42,57 | 118,98±70,31 |
| median | 116,0 | 56,0 | 149,5 | 111,5 |
| Тествани разлики: мъже контролна група/мъже с метаболитен синдром Z = 3,2 p=0,01**; жени контролна група / жени с метаболитен синдром Z = 4,8 p=0,000002** | | | | |
| Трансферин(mg/dl) | | | | |
| mean±SD, | 279,9±56,28 | 232,86±35,44 | 264,4±61,47 | 246,62±40,96 |
| median | 276,5 | 238 | 249 | 239 |
| Тествани разлики: мъже контролна група / мъже с метаболитен синдром t=1,4 p=0,15; жени контролна група / жени с метаболитен синдром t=1,96 p=0,053 ns | | | | |
| Хепсидин (ng/mL) | | | | |
| mean±SD, | 12,34 ± 7,37 | 6,16 ± 3,2 | 25,54± 18,33 | 11,23 ± 5,3 |
| median | 10,97 | 5,6 | 20,75 | 10,81 |
| Тествани разлики: мъже контролна група/мъже с метаболитен синдром t=5,18 p=0,000001**; жени контролна група / жени с метаболитен синдром t = 6,3 p<0,001** | | | | |

*p < 0,05 **p < 0,01

7. ОБСЪЖДАНЕ

С откриването на хепсидина преди 15 години започна и научно-изследователската дейност в посока на намирането на метод, с който най-точно ще се определи неговата стойност. До момента има четири основни начина за откриване на този пептид в биологични течности: RIA, ELISA, анализ на свързване на лиганд и MS. В идеалния случай всички методи трябва да отговарят на следните минимални критерии: специфичност, точност, прецизност, граница на откриване, граница на количествено определяне и линейност. В момента съществуват значителни различия в измерванията на хепсидина с помощта на различните методи, затова би било желателно всички методи да бъдат валидирани в съответствие с насоките, изготвени от Международната конференция за хармонизиране на процедурите за анализ.

7.1. Обсъждане на резултатите от контролната група

В настоящото проучване използвахме новоразработен ELISA тест от DRG (<http://www.drg-diagnostics.de>) с моноклонални антитела срещу биоактивен хепсидин-25, без да се открива кръстосана реактивност срещу прохепсидин, α -фетопротеин, човешки хорионгонадотропин, човешки плацентен лактоген и фоликулостимулиращ хормон. За първи път в Македония поставихме референтни стойности за хепсидина при здрава

популация и те бяха в границите 2,933-21,913 ng/ml. Тези резултати потвърждават данните от проучването на Geert et al., които използват същия кит и получават референтни стойности 20.5-66 ng/mL. Ashby et al. намират референтни стойности за хепсидина при здрави доброволци в границата 2-56 ng/ml, с медияна 11 ng/ml.

През 2014 год. в България Manolov VE et al. с ELISA сандвич метод от USCN Life Science inc. доказва, че концентрацията на хепсидина в българската популация е в границите 3.052 µg/L-37.750 µg/L.

В нашето проучване се установи статистически значима разлика между двата пола – именно хепсидинът има значимо по-високи стойности при мъжете в сравнение с жените. Тази разлика е почти двойна. Сходно проучване на Ganz T et al. показва, че мъжете имат по-високи концентрации на хепсидин в сравнение с жените.

Също така установихме значимо по-високи стойности на хепсидина при жените в периода след менопаузата в сравнение с жените в пременопауза. Това потвърждава влиянието на менструалния цикъл върху стойностите на желязото в организма. Тези резултати са в потвърждение и на литературните данни на Galesloot TE et al.

Установихме, че хепсидинът има значимо по-високи стойности в групата на мъжете в сравнение с групата на жените в пременопауза и след менопауза. Тези разлики са двойни между мъжете и жените в периода на след менопауза и тройни между мъжете и жените в периода преди менопауза.

При проведения корелационен анализ на концентрацията на хепсидин с всички изследвани биохимични и хематологични параметри при здравите хора установихме умерено изразена корелационна връзка на хепсидина с: червените кръвни клетки, хематокрита, уреята, креатинина, пикочнатата киселина и ГГТ, а с HDL-холестерола се установи умерено изразена обратна корелационна връзка. При изследване на корелационната зависимост между серумните нива на хепсидина и хемоглобина се установи значително изразена корелационна връзка, а тези резултати са в потвърждение на литературните данни на Manolov VE et al.

Установихме значително изразена корелационна връзка между абсорбцията на желязо, което се вижда в запасите на желязото (измерена чрез концентрацията на феритина) и хепсидина. Тези резултати са в потвърждение на литературните данни на Manolov VE et al, Galesloot TE et al и Roe MA et al.

При проведения корелационен анализ не се откри корелационна връзка между хепсидина и: гликемия, холестерол,

LDL – холестерол, триглицериди, желязо, ApoA, ApoB и АСАТ. Също така не установихме корелационна връзка между хепсидина и желязото, АЛАТ и CRP. Тези резултати са потвърдени и в проучването на Galesloot TE et al.

Не се откри корелационна връзка между хепсидина и трансферина, а тези резултати са сходни с резултатите от проучването в България на Manolov VE et al.

Научно е доказано, че преди появата на пубертета при хората няма големи разлики в стойностите на хемоглобина, червените кръвни клетки и феритина по отношение на пола. Веднага след началото на менструацията се забелязва разликата. Необходими са близо десет години след менопаузата, за да може концентрацията на хемоглобина при жените да стане такава, каквато е при мъжете на същата възраст. Менструацията и хормоналният статус са основните причини за загубата на желязо при жените и наблюдаваното различие в броя на червените кръвни клетки, хемоглобина и феритина на полов принцип спрямо мъжете. В нашето проучване установихме, че полът оказва влияние върху стойностите на еритроцитите, хемоглобина, хематокрита, серумното желязо, феритина и трансферина, които са със значително по-високи стойности при мъжете, отколкото при жените. В съгласие с нашите данни са и резултатите на Waalen J et al., който намира по-високи стойности на еритроцитите,

хемоглобина, хематокрита и феритина при мъжете в сравнение с жените.

В проучването не установихме връзка между менопаузалният статус и хематологичните параметри - еритроцити, хемоглобин и хематокрит. Тези резултати по отношение на хемоглобина и хематокрита са сходни с резултатите от изследването на Berge LN et al.

В потвърждение на предишните изводи доказахме, че менопаузалният статус се отразява значително върху стойностите на феритина с това, че жените в пременопауза имат значимо по-ниски стойности на феритин в сравнение с жените след менопауза. Тези резултати са в потвърждение на литературните данни на Galesloot TE et al.

Положителната корелация между серумния феритин и менопаузата се вписва добре в теорията за увеличаване на желязните запаси, когато редовното кървене е прекратено. Влиянието на възрастта върху стойностите на феритина е потвърдена в бройни проучвания: Kim C et al., Kato I et al., Berge L et al и Liu J et al. Тези автори откриват, че стойностите на феритина нарастват с увеличаването на запасите на желязо в периода след менопаузата.

Установихме, че феритинът има значимо по-високи стойности в групата на мъжете в сравнение с групата на жените в

пременопауза, докато разликата в стойностите между мъжете и жените след менопауза е статистически несигнификантна. Тези резултати са сходни с резултатите от изследването на Kim C et al.

По отношение на трансферина не установихме полови различия, а и менопаузалният статус не се отрази на стойностите на трансферина. При проведения корелационен анализ на трансферина с изследваните параметри установихме умерено изразена корелационна връзка с: хемоглобина, хематокрита, креатинина, холестерола, LDL-холестерола, АЛАТ, АСАТ, ГГТ и АроВ. Връзката на трансферина с пикочната киселина и триглицеридите беше значително изразена, а с АроА установихме умерено изразена обратна корелационна връзка.

Не се откри корелационна връзка между трансферина и: червените кръвни клетки, уреята, гликемията, HDL-холестерола, желязото, CRP, феритина и хепсидина.

При проведения корелационен анализ на феритина с всички изследвани показатели се установи умерено изразена корелационна връзка с: АроВ, желязото и креатинина, а връзката с червените кръвни клетки и уреята бе значително изразена.

При изследване на корелационната зависимост между серумните нива на феритина с хемоглобина и хематокрита се установи значително изразена корелационна връзка. Тези резултати са в потвърждение на литературните данни на Berge LN et al.

Корелационната зависимост между серумните нива на феритина с пикочната киселина и ГГТ е умерено изразена. Тези резултати са в потвърждение на литературните данни на Jung CH et al.

При изследване на корелационната зависимост между серумните нива на феритина и HDL-холестерола се установи умерено изразена обратна корелационна връзка, докато между феритина и LDL-холестерола се установи умерено изразена корелационна връзка. Тези резултати са в потвърждение на литературните данни на Berge LN et al.

Корелационният анализ не откри връзка между феритина и: глюкоза, холестерол, АЛТ, АСАТ, CRP, трансферин, ApoA.

Също така не се откри корелационна връзка между феритина и триглицеридите и тези резултати са в потвърждение на литературните данни на Berge LN et al.

7.2. Обсъждане на резултатите на пациентите, болни от метаболитен синдром

Метаболитният синдром е описан за първи път в първата половина на 20 век, а световната епидемия от повишено телесно тегло и затлъстяване са сред основните причини за неговото разпознаване. Централната адипозност е основната характеристика на синдрома, отразявайки факта, че силната връзка между обема на

талията и нарастващата адипозност влияе на разпространението на метаболитния синдром.

Разпространението на метаболитния синдром по света е различно и частично отразява възрастта и етническата принадлежност на лицата и използваните диагностични критерии. Като цяло разпространението на метаболитния синдром се увеличава с нарастване на възрастта на населението. По данни от проведено изследване на националното здраве и хранене в САЩ, разпространението на метаболитния синдром нараства от 7% при изследваните на възраст от 20 до 29 год. лица, през 44% при лицата на възраст от 60 до 69 год. до 42% при лицата на възраст над 70 год. Във Франция разпространението на метаболитния синдром е <5,6% във възрастовия диапазон 30-39 год. при всеки пол, а на възраст 60-64 год. е 17,5%. Нарастащата индустриализация в света се свързва с по-голям процент на затлъстяване, за която се предвижда, че драстично ще увеличи разпространението на метаболитния синдром със застаряването на населението. В 2000 год. в САЩ при 47 милиони хора е диагностициран метаболитен синдром, което означава че е застъпен при 40% от възрастното население на страната.

До момента в България са проведени много проучвания за метаболитния синдром. Проучването на Bouapov MA et al включва 444 жени на възраст от 30 до 75 год., които се изследват за костна плътност в период от 2 години. При тях е намерена висока честота

на метаболитния синдром - 34.91% според критериите на NCEP-ATP III и 37.16% според дефиницията за метаболитен синдром на WHO или общо 89% от всички изследвани. Rayanova GN et al в проучването на 153 пациенти (103 жени и 50 мъже) с метаболитен синдром намират по-високи стойности на ресистин и висфатин при пациенти с метаболитен синдром в сравнение с контролната група, а Atanassova P et al в изследването на жени с метаболитен синдром говори за увеличени стойности на лептин и NGF (nerve growth factor) и намалени стойности на адипонектин при жени с метаболитен синдром в сравнение със здравите жени и предлага лептинът, адипонектинът и NGF да бъдат ползвани като предикторни биомаркери за метаболитен синдром.

Метаболитният синдром до момента е много малко изследван в Македония. При претърсване на литературата намерихме само две публикации, които говорят за честотата на метаболитния синдром при пациенти със захарен диабет и коронарна болест на сърцето.

В България и Македония не намерихме проучване за връзката на метаболитния синдром с желязото, неговите транспортери – феритин, трансферин и хепсидин – хормонът, който регулира целокупния метаболизъм на желязото.

През последните години интересът към последствията от повишеното натрупване на желязо върху здравето на хората все повече нараства. Въпреки че механизмите за потенциалния ефект на желязото върху риска от метаболитен синдром са неясни, има две основни хипотези. Според първата хипотеза повишението на желязо, което се дължи на прекомерното натрупване (вродено или придобито), може да доведе до увреждане на черния дроб, сърцето и други органи. Панкреасните бета-клетки също са важен таргет на токсичното желязо, което предизвиква непоносимост към глюкоза и диабет. Когато концентрацията на желязо в организма расте, чернодробната и периферната резистентност към инсулина се увеличават, а панкреасната секреция на инсулина намалява. Излишното желязо е опасно, тъй като иницира атеросклероза, карциногенеза, диабет и други заболявания, свързани с начина на живот. Отлагането на желязото в макрофагите на артериалната стена се увеличава при атеросклеротични лезии и въпреки че доказателствата са спорни, повишеното желязо е било предложено като маркер за сърдечно-съдовия риск. Непряко потвърждение на "желязната хипотеза" идва от проучванията за лечение на атеросклероза. Всъщност изчерпването на желязото намалява атерогенезата в експериментални модели и това може да се обясни с намаляването на нивата на хепсидин, който ще намали изнасянето на желязото от макрофагите и ще осигури по-бърз клирънс за отделяне на желязото от артериалните лезии. Всъщност, освен от натрупването на желязо, хепсидинът също е

индуциран от възпалението и затлъстяването, и местното производство определя навлизането на желязото в макрофагите. По този начин прекомерното натрупване на желязо в макрофагите ще увеличи оксидативния стрес и трансформацията в пенести клетки и хепсидинът може да бъде отговорен за атерогенезата, предизвикана от желязото.

Втората хипотеза за влиянието на желязото за появата на метаболитния синдром е свързана със способността на желязото да формира реактивни кислородни радикали. Счита се, че увеличаването на оксидативния стрес е ключов механизъм в основата на желязо-индуцираната инсулинова резистентност, въпреки че все още няма преки доказателства за тази хипотеза. Оксидативният стрес влияе на метаболизма на глюкозата и желязото и предизвиква резистентност към инсулина, с намалено навлизане на инсулин в клетките и с повишена синтеза на феритин. Способността на желязото да се превръща в две стабилни оксидативни форми е потенциална за създаването на реактивни кислородни и аминокислородни видове като хидроксил радикали чрез Fenton и Haber-Weiss реакция. Оксидативният стрес може да причини смъртта на бета клетките на панкреаса и да доведе до диабет и хроничен оксидативен стрес на черния дроб, мускулите и мастната тъкан, причинявайки възпалителна реакция и резистентност към инсулина в тези органи.

Запасите на желязо, изразени чрез концентрацията на феритина в серума се предлага да бъдат неразделна част от метаболитния синдром. Феритинът е клиничен показател за нивото на желязо в организма. Потенциална причина за увеличаването на феритина в β -клетката на панкреаса са антиоксидантните свойства на феритина, а β -клетките на панкреаса са особено чувствителни към ефектите на кислородните радикали. Нивото на феритин корелира с няколко компонента на метаболитния синдром: повишени триглицериди, намален HDL-холестерол, затлъстяване. Тези открития показват, че концентрацията на феритин може да се използва като биомаркер за метаболитен синдром.

В нашето проучване се потвърди, че при пациентите с метаболитен синдром има увеличени стойности на феритин в сравнение с контролната група. Редица изследвания показват увеличени стойности на феритина при пациентите с метаболитен синдром. Високата концентрация на серумния феритин може потенциално да бъде използвана като скринингов биомаркер за откриването на хора, които са изложени на риск от развитието на метаболитен синдром и тези в ранните стадии на заболяването, които все още могат да бъдат лекувани чрез целенасочени превантивни мерки.

При проведения корелационен анализ се установи умерено изразена корелационна връзка между феритина и хемоглобина,

хематокрита и АСАТ. Умерено изразена обратна корелационна връзка се установи между феритин и HDL-холестерола, а значително изразена корелационна връзка се установи между феритина и желязото, АЛАТ и ГГТ. Vari IS et al намират сигнификантна връзка на АЛАТ и ГГТ с феритина, което потвърждава нашите наблюдения.

Ние не установихме корелационна връзка между феритина и еритроцитите, уреята, креатинина, глюкозата, пикочната киселина, холестерола, LDL-холестерола, триглицеридита, CRP, трансферина, ApoA и ApoB. За разлика от нашите наблюдения, Vari IS et al и Li J et al намират корелационна връзка на триглицеридите и феритина, а Li J et al намират корелационна връзка на глюкозата и феритина, а между феритина и трансферина намират негативна корелация. Vari IS et al, подобно на нас, не намират връзка на феритина с CRP.

За първ път през 2012 год. Martinelli N et al. обявиха, че нивото на хепсидин расте прогресивно в отговор на повишеното ниво на феритин в серума при пациентите с метаболитен синдром, и забелязват, че лицата с метаболитен синдром имат сигнификантно по-високи стойности на феритин и хепсидин в сравнение с лицата без метаболитен синдром, което е идва дапотвърди нашите наблюдения.

Ние установихме, че сред мъжете от контролната и проучваната група съществува значима разлика в стойностите на серумното желязо и хепсидина. В нашето проучване се потвърди, че при пациентите с метаболитен синдром от мъжки пол има увеличени стойности на серумното желязо и хепсидина в сравнение със здравите мъже.

Сред жените от контролната и изследваната група установихме значима разлика в стойностите на хепсидин. В групата на здравите жени са регистрирани значимо по-ниски стойности на хепсидин в сравнение с жените от групата с метаболитен синдром.

Установихме, че полът оказва значително влияние върху стойностите на серумното желязо, феритина и хепсидина, в резултат на значимо по-високите стойности при мъжете, отколкото при жените, което се дължи на загубата на желязо с менструалния цикъл при жените. Мъжете с метаболитен синдром имат значимо по-високи стойности на хепсидина в сравнение с жените в пременопауза и жените след менопауза. И менопаузалният статус оказва влияние върху концентрацията на хепсидина със значимо по-ниски стойности на хепсидин в групата на жените с метаболитен синдром в периода преди менопаузата.

При проведения корелационен анализ на концентрацията на хепсидина се установи умерено изразена корелационна връзка с

червените кръвни клетки, креатинина, пикочната киселина, АЛАТ и ГГТ. Значително изразена корелационна връзка бе установена между хепсидина и хемоглобина, хематокрита и серумното желязо, а между хепсидина и HDL-холестерола се установи умерено изразена обратна корелационна връзка.

При изследване на корелационната зависимост между серумните нива на хепсидин и феритин се установи значително изразена корелационна връзка. Тези резултати потвърждават резултатите, публикувани от Martinelli N et al.

Не се откри корелационна връзка между хепсидина и уреята, гликемията, холестерола, LDL-холестерола, триглицеридите, АСАТ, СРР, трансферина, ApoA и ApoB.

В нашето проучване полът и менопаузалният статус не се отразиха върху стойностите на трансферина. При направения корелационен анализ на концентрацията на трансферин установихме умерено изразена корелационна връзка с холестерола и ApoB, значително изразена корелационна връзка на трансферина с триглицеридите и умерено изразена обратна корелационна връзка на трансферина с желязото и ГГТ.

Не се откри корелационна връзка между трансферина и червените кръвни клетки, хемоглобина, хематокрита, уреята, креатинина, глюкозата, пикочната киселина, HDL-холестерола, LDL-холестерола, АЛАТ, АСАТ, СРР, феритина, ApoA и

хепсидина. За разлика от нас, Vari IS et al намират корелация между трансферина с CRP и АЛАТ.

В световната литература редица изследвания показват, че еритроцитните параметри, които включват еритроцити, хемоглобин и хематокрит, са свързани с метаболитния синдром и се предлага те да бъдат изследвани като възможни предиктори на метаболитния синдром. Въпреки че все повече доказателства предполагат наличието на връзка между хематологичните параметри и риска от развитието на метаболитния синдром, биологичните механизми за тези асоциации все още трябва да бъдат изяснени. В нашето проучване установихме по-високи стойности на хемоглобина при жените с метаболитен синдром в сравнение с тези при здравите жени. Тези резултати са в потвърждение на литературните данни на Hamalainen P et al.

В нашето проучване установихме, че полът се отразява значително на стойностите на хематологичните параметри при пациентите с метаболитен синдром. Мъжете с метаболитен синдром имат сигнификантно по-високи стойности на хематологичните параметри – еритроцити, хемоглобин, хематокрит в сравнение с жените с метаболитен синдром. В проучването на Nebeck K et al. са намерени по-високи стойности на еритроцитите и хематокрита при мъжете в сравнение с тези при жените, което потвърждава нашето наблюдение.

8. ЗАКЛЮЧИТЕЛНО ОБСЪЖДАНЕ

Години наред метаболитният синдром се свързваше предимно с инсулиновата резистентност. Фактът, че увеличените запаси на желязо увеличават риска от развитието на метаболитен синдром, доведоха до разкриването на нови схващания върху това заболяване. Това обуслови и нарасналият интерес сред научната общност през последните две десетилетия към проблемите, свързани с метаболитния синдром сред населението. Особено смущаващ е фактът, че в световен мащаб се регистрира все по-нарастваща честота на болните с метаболитен синдром и тази тенденция се определя като пандемия. Започнаха да се трупат данни за голям брой хронични заболявания като сърдечно-съдови заболявания, диабет и много други, чиято прогресия би могла да се обвърже с увеличените запаси на желязо, измерени чрез концентрацията на феритин в серума. У нас все още липсват системни проучвания за хомеостазата на желязото както сред здравото население, така и сред болните с метаболитен синдром. Разработеният от нас ELISA метод за определяне на хепсидина, считан за основен хормон регулатор на хомеостазата на желязото, се характеризира с висока аналитична надеждност. Получените от нас данни за връзката между феритина и хепсидина с метаболитния синдром биха могли да бъдат началото на едно проспективно бъдещо изследване в по-големи мащаби. Клиничният ефект за намаляване на желязото при пациентите с

метаболическият синдром ще трябва да бъде проверено в големи проучвания.

Резултатите от първото за България и Македония проучване за хомеостазата на желязото при пациентите с метаболическият синдром поставят основите за бъдещи проучвания, проследяващи нивата на хепсидина и феритина в динамика. Настоящият труд създава база за изработване на ръководства и препоръки за хомеостазата на желязото при здрави хора и при лица с метаболическият синдром. Необходими са допълнителни перспективни изследвания за потвърждаване дали високият серумен феритин е валиден биомаркер за риска за развитието на метаболическият синдром, за да се оцени влиянието на възпалението и да се идентифицират патологичните гранични стойности. Необходима е строга стандартизация в измерването на хепсидина.

9. ИЗВОДИ

9.1. ELISA метод за определяне на серумните нива на хепсидин

- Разработеният от нас ELISA метод се характеризира с висока аналитична надеждност и селективност за точно количествено определяне на хепсидина.
- Относително краткото време за анализ осигурява възможността за въвеждането и използването на предложението от нас ELISA метод в лабораторната практика.

9.2. Хомеостаза на желязото при здрави хора:

- Първото системно за нашата страна проучване за хомеостазата на желязото на представителна извадка (120 души) от здрави лица доказва, че референтните стойности за хепсидина при здрава популация са в границите на 2,933 - 21,913 ng/ml.
- Серумните нива на хепсидина са зависими от възрастта, пола и менопаузалния статус.
- Серумните нива на хепсидина са в корелационна връзка с феритина, червените кръвни клетки, хемоглобина, хематокрита, уреята, креатинина, пикочната киселина и ГГТ.
- Нивата на еритроцитите, хемоглобина, хематокрита, серумното желязо, феритина и трансферина са зависими от пола.

- Менопаузалният статус се отразява значително върху стойностите на феритина.
- Серумните нива на трансферина не са зависими от пола и менопаузалния статус.
- Серумните нива на трансферина са в корелационна връзка с хемоглобина, хематокрита, креатинина, холестерола, LDL-холестерола, АЛАТ, АСАТ, ГГТ, АроВ, пикочната киселина и триглицеридите.
- Позитивна корелационна връзка има между серумните нива на феритина с АроВ, желязото, креатинина, червените кръвни клетки, уреята, пикочната киселина, HDL-холестерола, LDL-холестерола, ГГТ, хемоглобина и хематокрита.

9.3. Хомеостаза на желязото при пациенти с метаболитен синдром

- Първото за нашата страна проучване на хепсидина и феритина сред пациентите с метаболитен синдром показва, че те са увеличени и между тях има силно изразена корелационна връзка.
- Установихме, че полът има значително влияние върху стойностите на серумното желязо, феритина и хепсидина.
- Менопаузалният статус оказва влияние върху концентрацията на хепсидина.

- Установена е статистически значима корелация между феритина и хемоглобина, хематокрита, АСАТ, HDL-холестерола, желязото, АЛАТ и ГГТ.
- Серумните нива на хепсидина са в корелационна връзка с червените кръвни клетки, креатинина, пикочната киселина, HDL-холестерола, АЛАТ, ГГТ, хемоглобина, хематокрита и серумното желязо.
- Установихме, че полът и менопаузалният статус не се отразяват върху стойностите на трансферина.
- Позитивна корелационна връзка има между серумните нива на трансферина и холестерола, ApoB, триглицеридите, желязото и ГГТ.
- Установихме, че полът значимо се отразява на стойностите на хематологичните параметри при пациентите с метаболитен синдром.

10. ПРИНОСИ

10.1. Приноси с оригинален научен и научно-приложен характер:

- За първи път в Македония е разработен ELISA метод за определяне на серумните нива на хепсидина при здрави хора, който може да намери приложение в рутинната лабораторна практика.
- За първи път в България и Македония е изследвана концентрацията на хепсидин в серума на болни с метаболитен синдром и неговата връзка с всички изследвани клиничко-лабораторни параметри.
- За първи път в България и Македония е изследвана хомеостазата на желязото при пациенти с метаболитен синдром.
- Доказани са значимо по-високи нива на хепсидин и феритин при пациентите с метаболитен синдром в сравнение с контролната група сред македонската популация.
- Поставени са основите за бъдещи изследвания, с помощта на които би могъл да се промени алгоритъмът за диагностика на метаболитния синдром (чрез въвеждане на изследването на серумните нива на феритин към други, вече утвърдени и използвани в практиката биомаркери) и лечение (чрез кръвопускане).

10.2. Приноси с потвърдителен характер:

- Доказано е, че ELISA методът за определяне на концентрацията на хепсидин е с по-висока аналитична надеждност от останалите методи, които са широко разпространени в рутинната клинично-лабораторна практика.
- Доказано е, че феритинът и хепсидинът са увеличени при пациентите с метаболитен синдром.
- Доказано е, че полът и менопаузалният статус оказват влияние върху концентрацията на феритина и хепсидина в серума на здравите лица и при пациентите с метаболитен синдром.

11. СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

11.1. ПУБЛИКАЦИИ В НАУЧНИ СПИСАНИЯ

1. **Илковска.В**, Kotevska.В., Trifunov. D., Trajkovska M. Correlation between serum levels of hepcidin and ferritin in patients with metabolic syndrome in R.Macedonia. Scientific Journal of Review. 2014;3(11):965-972

2. **Илковска Б**, Котевска Б, Трифунов Ѓ. Съвременен вид на хомеостазата на желязо с основен акцент върху хепсидинот - новият хормон, регулатор на метаболизма на желязо. Македонско медицинско електронно списание. Vol 2015

3. **Илковска В**, Kotevska В, Trifunov G.Elevated serum hepcidin and ferritin levels in patients with metabolic syndrome in Macedonian population. Indian journal of applied research. 2015.05 (08): 61-64. **IF = 3,6241**

4. **Илковска В**, Kotevska В, Trifunov G. Hcpidin levels in patients with metabolic syndrome and healthy subjects in R. Macedonia. Paripex - Indian journal of research. 2015.04 (08): 1-3. **IF = 3,4163**

5. **Илковска.В**, Kotevska.В., Trifunov. D.,Kanazirev. В. Impact of Lipid Status, Liver Enzymes and Iron Homeostasis on

Metabolic Syndrome Among Adult People. Paripex - Indian journal of research.2016.5;6;12-18.**IF = 5.215**

6. **Илковска В, Котеvsка В, Trifunov G, Kanazirev В.** Serum hepcidin reference range, gender differences, menopausal dependence and biochemical correlates in healthy subjects. J of IMAV. 2016 Apr-Jun;22(2):1127-1131. SJIF. **IF= 5,548, Global Impact Factor = 0,787**

11.2. ПУБЛИКУВАНИ РЕЗЮМЕТА НА СЪОБЩЕНИЯ, ПРЕДСТАВЕНИ НА МЕЖДУНАРОДНИ НАУЧНИ ФОРУМИ

1. **Илковска В.,**"The role of adipokines and gut hormones in pathogenesis of obesity, and recent findings for the future treatment of obesity". IFCC Wordlab Istanbul 2014; 22-nd International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC Worldlab 2014); 22-nd Balkan Clinical Laboratory Federation Meeting (BCLF 2014); 26-th National Congress of the Turkish Biochemical Society (TBS 2014) 22-26.06.2014,Istanbul, Turkey **IF =3,009**

2. **Илковска В, Котеvsка В, Trifunov G. ,** Определяне на концентрацията на хепсидин в серум с Елайза метод "на 15-ти семинар за контрол на качеството по информатика и защита в медицинската лабораторна диагностика 17-21.06.2015 Охрид Р. Македония

3. **Илковска В, Котеvsка В, Trifunov G, M. Trajkovska.** „Hepcidin levels in patients with metabolic syndrom" 21-nd European congress of clinical chemistry and laboratory medicine 21-25.06.2015 Paris, France **IF = 2.955**

4. **Илковска Б, Котеvsка Б, Трајковска М, Бошковски Т, Трифунов Г.** „Искуства од имплементацијата на системот за квалитет во одделот за лабораториска дијагностика при ЈЗУ Клиничка болница Битола" Втора меѓународна конференција за квалитет и компетентност 17-19.09.2015 Охрид Р. Македонија

5. **Илковска В, Котеvsка В, Trifunov G, M. Trajkovska.** „Hepcidin levels in healthy subjects in Bitola, R. Macedonia" 19 конгрес на лекарите на Р.Македонија с меѓународно учество 1-3.10.2015 Скопие Р. Македонија

6. **Илковска В, Котеvsка В, Trifunov G, Boskovski Т.** „Регулиране на системната хомеостаза на желязо с помошта на хепсидин" - Дани лабораторни дијагностика Република Србије с меѓународно учество 05-07.11.2015 Тара Р. Србије.