

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ
ФАРМАЦЕВТИЧЕН ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „БИОХИМИЯ“



ПОСВЕТЕНИ НА
ХУМАННОСТТА

Катя Иванова Стефанова

**ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ПАТОБИОХИМИЧНИ МЕХАНИЗМИ,
СВЪРЗВАЩИ ХОМЕОСТАЗАТА НА ЖЕЛЯЗОТО
С ПОКАЗАТЕЛИ ЗА ВЪЗПАЛИТЕЛНИ И АВТОИМУННИ
НАРУШЕНИЯ ПРИ РЕВМАТОИДЕН АРТРИТ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

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

Област на висше образование:

4. „Природни науки, математика и информатика“

Професионално направление:

4.3. „Биологически науки“

Научна специалност:

„Медицинска биохимия“

Научни ръководители:

проф. Ана Манева, дб, дбн
проф. д-р Анастас Баталов, дм

Пловдив, 2020 г.

Дисертационният труд е написан на 140 страници, съдържа 15 фигури и 19 таблици. Цитирани са 301 литературни източника.

Част от изследванията са реализирани при изпълнение на Вътреуниверситетски проект НО-11/2013, финансиран от Медицински университет – Пловдив.

Изследванията са проведени в катедра „Биохимия“, катедра „Пропедевтика на вътрешните болести“ и катедра „Клинична лаборатория“ на Медицински университет – Пловдив.

Дисертационният труд е обсъден от разширен катедрен съвет на катедра „Биохимия“ към Фармацевтичен факултет на Медицински университет – Пловдив, състоял се на 05.02.2020 г. и насрочен за официална защита пред научно жури в състав:

Проф. Ана Иванова Манева, дбн

Проф. Татяна Иванова Влайкова, дб

Доц. Йоана Димитрова Киселова-Кънева, дб

Проф. Илия Николов Илиев, дб

Проф. Диана Георгиева Иванова, дбн

Резервни членове:

Доц. д-р Анелия Веселинова Биволарска, дб

Доц. Милка Аспарухова Нашар, дф

Защитата на дисертационния труд ще се състои на2020 г. отч. в Аудиторен комплекс –аудитория, на Медицински университет – Пловдив.

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел и са публикувани на интернет страницата на Медицински университет – Пловдив.

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ	4
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	6
III. ПАЦИЕНТИ И МЕТОДИ	7
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	8
IV.1. РЕЗУЛТАТИ	9
1.1. Показатели за оценка на хомеостазата на желязо и възпалителната активност	9
1.2. Разтворими рецептори – sTfR, sRAGE, sRANKL и OPG.....	18
1.3. Ултрасонографски параметри	31
1.4. Сравнителна оценка на някои показатели на желязна хомеостаза и възпаление при ревматоиден артрит и диабет	32
IV.2. ОБСЪЖДАНЕ	38
IV.3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	52
V. ИЗВОДИ	53
VI. ПРИНОСИ	54
НАУЧНИ ТРУДОВЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА	55

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ И СИМВОЛИ

АнтиССР антитела	антитела срещу цикличен цитрулиниран пептид
РА	ревматоиден артрит
ACD	анемия на хроничното заболяване
AGEs	продукти с напреднало гликиране
CRP	С-реактивен протеин
DAS28	индекс на болестната активност 28 (disease activity score)
DMARD	болест-модифициращи антиревматични лекарства
Hb	хемоглобин
IDA	желязодефицитна анемия
IL-6	интерлевкин-6
NF-κB	ядрен фактор-капа В
NS	липса на статистическа значимост
OPG	остеопротегерин
p	ниво на значимост
RAGE	рецептор за продукти с напреднало гликиране
RANK	рецептор активатор на ядрения фактор-κB
RANKL	рецептор активатор на ядрения фактор-κB лиганд
RF	ревматоиден фактор
sRAGE	разтворим рецептор за продукти с напреднало гликиране
sRANKL	разтворим рецептор активатор на ядрения фактор-κB лиганд
sTfR	серумен трансферинов рецептор
sTfR/Log феритин	sTfR-F индекс
TIBC	общ желязосвързващ капацитет
UIBC	ненаситен желязосвързващ капацитет
US-PD	Power Dopler
US-SE	ставен излив
US-SP	синовиална пролиферация

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Ревматоидният артрит (РА) засяга близо 1% от възрастното население в света. Характеризира се със синовиална хиперплазия, подуване, болка и богати на неутрофили инфилтрати и може да доведе до ерозия на костите, разрушаване на хрущяла и пълна загуба целостта на ставата. Класифициран е като автоимунно заболяване, защото се свързва с образуването на антитела срещу собствени антигени, което води до натрупване на имунни депозити в синовиалната тъкан на пациентите.

Ревматоидният артрит е хронично възпалително заболяване на ставите с различни системни прояви, като нарушенията в хомеостазата на желязото и настъпващата анемия са сред най-честите. Анемията на РА се развива поради патологича адаптивна реакция на отклоняване на желязото в неговите депа, следствие хроничния възпалителен процес. През последното десетилетие е установено, че молекулярните механизми на недостига на желязо се концентрират върху стимулираната от цитокини свръхпродукция на желязо-регулаторния хормон хепсидин. Възпалителният цитокин интерлевкин-6 е основният индуктор на синтеза на хепсидин. Излишъкът на хепсидин блокира действието на транспортния белтък феропортин, който изнася желязо към серума. Доставка на желязо за тъканите и биосинтеза на хемоглобин се ограничават и това в крайна сметка води до анемия.

В литературата има противоречиви становища за информативността на използваните показатели за преценка на желязния дефицит, който може да възникне при РА. Известно е, че анемията може да бъде повлияна, когато има ефективно лечение на основното заболяване, което се характеризира с хронично възпаление, автоимунни прояви и костна деструкция, протичащи в условия на окислителен стрес. Мотивация за настоящото проучване е фактът, че анемията на хроничните възпалителни процеси незаслужено остава на заден план, въпреки високата честота на проявата ѝ, а тя отключва други патогенетични звена и затруднява терапията на основното автоимунно заболяване. Интересът ни се движи в две посоки – да проверим информативността на възприети параметри за оценка на хомеостазата на желязото и да потърсим взаимни връзки между тях и показатели за оценка на възпалителния процес, автоимунните, окислителни и костни нарушения при РА. Вниманието ни беше привлечено от посттранслационно променени белтъци в серума, каквито са разтворимите рецептори. В литературата има противоречиви данни за промените в серумните нива на разтворимите рецептори и патобиохимичното им значение при РА (Chen et al., 2009, Pullerits et al., 2005, Ziolkowska et al., 2002, Ghorbanihaghjo et al., 2014, Kolarz et al., 2003, Skoumal et al., 2008). Не е изяснена връзката на разтворимите

рецептори с желязната хомеостаза, въпреки че анемията е системна проява на заболяването. Насочихме вниманието си към разтворимия рецептор за трансферин - sTfR, отразяващ експресията на мембранната форма и изискванията за желязо на клетката, sRAGE - разтворим рецептор за гликирани белтъци, който свързва окислителните, възпалителни и костни деструктивни промени, sRANKL и OPG - балансиращ фактор между костната резорбция и образуване. Освен тях в изследването обхванахме и показателите на желязна хомеостаза (серумен феритин, серумно желязо, лактоферин, прохепсидин, общ и ненаситен желязосвързващ капацитет), възпаление (CRP, IL-6, СУЕ), активност на заболяването и автоимунни нарушения (DAS28, RF, антиССР антитела) при болни от РА и здрави доброволци. Хипотезата ни беше, че съществуват взаимни връзки между параметрите за оценка на желязен дефицит и показателите, характеризиращи основното заболяване и усложнения при РА. Тяхното изследване би могло да допринесе както за допълнително изясняване на механизмите на дефицита на желязо при ревматоидния артрит, така и да предостави чувствителни показатели за клиничната практика, които да разширят възможностите за ранно улавяне и проследяване на системните усложнения при заболяването.

Един страничен изследователски проект беше сравнението на показатели на хомеостаза на желязо и възпаление при РА и диабет, за да потърсим характерни различия при двете заболявания, при които се установява анемия и възпалителен процес. Подобно проучване би предоставило информация за промени в хомеостазата на желязото при слаб възпалителен процес, какъвто има при диабет и при хроничен автоимуен възпалителен процес, характерен за ревматоидния артрит.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата работа е да се изяснят патобиохимични механизми, свързващи хомеостазата на желязото с възпалителните и автоимунни нарушения при ревматоиден артрит.

За изпълнението на целта са поставени следните **задачи**:

1. Оценка на желязния статус чрез изследване на прохепсидин, серумно желязо, общ и ненаситен желязосвързващ капацитет, серумен феритин, sTfR, хемоглобин и еритроцити при пациенти с ревматоиден артрит и контролна група.
2. Оценка на възпалителната активност и окислителния стрес чрез изследване на IL-6, CRP, СУЕ, sRAGE и лактоферин при здрави доброволци и болни от ревматоиден артрит.
3. Оценка на костните и автоимунни нарушения на пациентите с ревматоиден артрит чрез изследване на sRANKL, OPG, DAS28, RF и антиССР антитела.
4. Изследване на взаимовръзките между показателите на желязна хомеостаза, възпалителна активност, костни и автоимунни нарушения.
5. Сравнителна оценка на показатели на желязна хомеостаза и възпаление (sTfR, лактоферин, sRAGE) при пациенти с ревматоиден артрит и диабет.

III. ПАЦИЕНТИ И МЕТОДИ

1. Пациенти и здрави доброволци

Проучването обхваща 114 болни от РА от Пловдив и областта. Всички пациенти са диагностицирани според критериите EULAR 2010 (Aletaha et al., 2010), по време на престоя им в Катедра по пропедевтика на вътрешните болести, МУ – Пловдив. Характеризирани са по пол, възраст, DAS28, RF и антиССР антитела (табл. 1). Пациентите, включени в изследването, са с умерена ($3,2 < DAS28 \leq 5,1$) и висока ($DAS28 > 5,1$) активност на заболяването.

При лечението на пациентите са прилагани НСПВС и допълнителна терапия, както следва: DMARDs (n=83), DMARDs и кортикостероиди (n=10), биологични агенти, DMARDs и кортикостероиди (n=4), кортикостероиди (n=2), биологични агенти и DMARDs (n=11), биологични агенти и кортикостероиди (n=3).

Таблица 1. Характеристика на болните от РА.

	Mean \pm SD и медиана (25 ^{-та} и 75 ^{-та} перцентил)
Възраст	58 \pm 10, n = 114
Пол (мъже/жени)	16 / 98
DAS28	5,7 \pm 1,7, n = 114
RF (U/ml)	56 (20 – 198), n = 107
АнтиССР антитела (U/ml)	140 (54 – 246), n = 67

Пациентите с РА са разпределени в групи според нивото на DAS28, CRP, хемоглобина (Hb) и sTfR-F индекс. Според нивото на болестната активност (DAS28) се оформят две групи: с умерена - $DAS28 \leq 5,1$ и висока - $DAS28 > 5,1$ активност на заболяването. За отсъствие и наличие на възпалителен процес се съди по серумната концентрация на CRP, като 8 $\mu\text{g/ml}$ се използва като горна граница за отсъствие на възпаление. Въз основа на този критерий пациентите са разпределени в две групи: с $CRP \leq 8$ и $CRP > 8$. Спрямо нивото на хемоглобина болните от РА са разделени на две групи: с нормално и ниско ниво на хемоглобин. Групата с ниско ниво на хемоглобин обхваща болните с нива на $Hb < 12 \text{ g/dl}$ за жени и $Hb < 13 \text{ g/dl}$ за мъже (n=35), според предписанията на Световната здравна организация. Групата пациенти с нормално ниво на Hb се състои от 79 болни от РА. По данни от литературата пациенти с РА, при които sTfR-F индекс $< 1,5$, са класифицирани с анемия на хроничното заболяване - ACD, а пациентите със sTfR-F индекс $> 1,5$ - с комбинация от анемия на хроничното заболяване и желязодефицитна анемия - ACD+IDA (Margetic et al., 2005; Goyal et al., 2008; Abdel-Khalek et al., 2011). Според тази стойност на sTfR-F индекс, 87,7% от пациентите с РА (n=100) имат ACD, а 12,3% (n=14) - ACD+IDA.

Настоящото проучване включва и 81 пациенти с диабет, диагностицирани по време на престоя им в клиниката по Ендокринология

към Медицински университет – Пловдив, от които 32 мъже и 49 жени. Средната възраст на болните от диабет е 58 ± 15 години, а средната продължителност на заболяването е 13 ± 10 години.

Изследвани са 42 здрави доброволци, от които 11 мъже и 31 жени, на средна възраст 34 ± 14 години.

2. Материали и методи

На приелите да участват в изследването се взима допълнително венозна кръв (до 5 ml) заедно с кръвта за рутинните клинично-лабораторни изследвания при постъпване за лечение. Кръвта се събира в моновети без антикоагулант. Тридесет минути след вземането на кръв епруветките се центрофугират при 3000 g в продължение на 10 минути. Серумът се съхранява при -20°C преди анализа.

2.1. Имуноензимен метод

Количественото определяне на sRAGE, sRANKL, OPG, RF, антиCCP антитела, CRP, IL-6, лактоферин, прохепсидин, sTfR и феритин в кръвен серум се извърши с имуноензимен метод ELISA. Измерванията са направени на апарат ELISA - HumaReader HS, HUMAN (Wiesbaden, Germany).

Количественото определяне на RF и антиCCP антитела в кръвен серум се извърши с имуноензимен метод ELISA на фирма Nova Tec Immundiagnostica, GmbH, Германия и Eurodiagnostica, Швеция, съответно.

2.2. Клинично-лабораторни методи

- Определяне на серумно желязо
- Определяне на ненаситен и общ желязосвързващ капацитет
- Определяне на хемоглобин и еритроцити
- Определяне на фибриноген
- Определяне на СУЕ

2.3. Ултрасонографски методи

Синовият може да бъде оценен чрез използване на: GSUS (Gray Scale ултрасонография) – като се оценяват синовиалната пролиферация (SH) и наличието на вътреставен излив (SE); PDUS (Power Doppler ултрасонография) – чувствителен метод за оценка на кръвотока в малките кръвоносни съдове на синовията.

2.4. Статистически методи

- Дескриптивен анализ;
- Вариационен анализ;
- Непараметрични анализи;
- Корелационни анализи.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

IV.1. РЕЗУЛТАТИ

1.1. Показатели за оценка на хомеостазата на желязо и възпалителната активност

Оценка на желязния статус и възпалителната активност се направи чрез изследване съдържанието на sTfR, серумен феритин, серумно желязо, TIBC, UIBC, прохепсидин, лактоферин, CRP и IL-6 при пациенти с РА и здрави доброволци.

За да оценим дали съществуват взаимовръзки между избраните показатели на желязна хомеостаза и възпалителна активност при болните от РА се извърши корелационен анализ, като съпоставихме корелационните зависимости със съответните в контролната група.

1.1.1. Съдържание и корелационни зависимости на показатели на желязна хомеостаза и възпаление при болни от РА и контролна група

Установява се, че съдържанието на sTfR, прохепсидин и очаквано на CRP и IL-6 при пациентите с РА е статистически значимо по-високо в сравнение с контролната група. Единствено при серумното желязо се наблюдава достоверно по-ниско ниво при болните от РА здравите доброволци. Не се отчита статистически значима разлика в концентрацията на серумен феритин, TIBC, UIBC и лактоферин между пациентите с РА и здравите доброволци (табл. 2).

Феритин

Съдържанието на серумния феритин е по-високо при болните в сравнение с контролната група, но разликата не преминава статистическия праг на значимост (табл. 2). При пациентите с РА се губи положителната корелационна зависимост на феритин със серумно желязо, която е достоверна при здрави (табл. 3). Обратно, наблюдава се отрицателна корелация между TIBC и феритин при болните от РА, каквато отсъства при контролната група. Не се установява достоверна корелационна връзка на феритин с sTfR и IL-6 както при здравите доброволци, така и при пациентите с РА (табл. 3).

Таблица 2. Сравнение на съдържанието на показателите на желязна хомеостаза и възпаление при болни от РА и контролна група.

Показатели	Контролна група Mean ± SD и медиана (25 ^{-ти} и 75 ^{-ти} перцентил)	РА Mean ± SD и медиана (25 ^{-ти} и 75 ^{-ти} перцентил)	p
sTfR, µg/ml	0,77 (0,58 – 0,91) n = 42	1,05 (0,67 – 1,50) n = 114	<0,001*
Феритин, ng/ml	31,37 (18,04 – 59,83) n = 42	40,46 (22,32 – 78,73) n = 114	NS
Серумно желязо, µmol/l	18,76 ± 6,12 n = 21	14,60 ± 6,84 n = 57	0,014*
TIBC, µmol/l	63,72 ± 8,94 n = 21	59,31 ± 9,95 n = 57	NS
UIBC, µmol/l	43,10 ± 11,59 n = 21	44,77 ± 11,85 n = 57	NS
Лактоферин, ng/ml	519 (263 – 928) n = 39	580 (313 – 948) n = 114	NS
CRP, µg/ml	1,99 (1,91 – 2,47) n = 42	2,66 (1,93 – 10,29) n = 114	0,003*
IL-6, pg/ml	1,51 (0,76 – 2,31) n = 21	4,00 (1,17 – 11,95) n = 59	0,002*
Прохепсидин, ng/ml	997 ± 478 n = 42	1262 ± 796 n = 114	0,013*

* статистическа значимост

Таблица 3. Корелационни зависимости между показателите на желязна хомеостаза и възпалителна активност при болни от РА и контролна група.

Показатели	РА			Контролна група		
	п	г	р	п	г	р
Феритин/ТІВС	57	-0,606	<0,001	21	-0,415	NS
Феритин/Серумно желязо	57	0,152	NS	21	0,437	0,048
Феритин/ІЛ-6	59	0,083	NS	21	-0,213	NS
sTfR/Серумно желязо	57	-0,306	0,020	21	-0,110	NS
sTfR/Феритин	114	-0,124	NS	42	-0,001	NS
sTfR/ТІВС	57	0,045	NS	21	0,202	NS
sTfR/Прохепсидин	114	0,338	<0,001	42	0,070	NS
sTfR/CRP	114	0,451	<0,001	42	0,441	0,003
sTfR/ІЛ-6	59	0,456	<0,001	21	-0,127	NS
Прохепсидин/CRP	114	0,265	0,004	42	0,253	NS
Серумно желязо/CRP	57	-0,416	0,001	21	-0,099	NS
Серумно желязо/ІЛ-6	57	-0,378	0,004	21	-0,460	0,036
CRP/ІЛ-6	59	0,553	<0,001	21	0,049	NS
ТІВС/CRP	57	-0,297	0,025	21	-0,247	NS

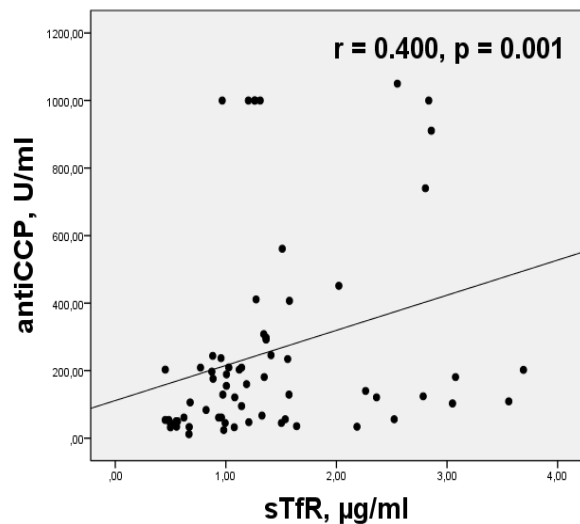
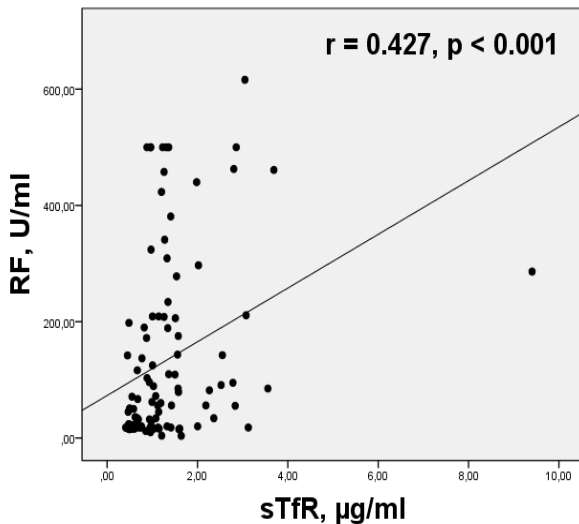
Серумен трансферинов рецептор

Достоверно по-високо (с около 35%, $p < 0,001$) е нивото на sTfR при болните от РА спрямо контролната група (табл. 2). При пациентите с РА, за разлика от групата здрави, се проявява статистически значима положителна корелация на sTfR с показателите ІЛ-6 и прохепсидин и отрицателна корелация със серумното желязо (табл. 3). Прави впечатление наличието на положителна корелационна зависимост между sTfR и CRP и в двете групи - на здрави доброволци и болни от РА (табл. 3). Наблюдава се положителна корелация между sTfR и СУЕ при пациентите с РА (табл. 4).

Таблица 4. Корелационни зависимости между показателите за желязна хомеостаза и тези за възпаление и автоимунни нарушения при болни от РА.

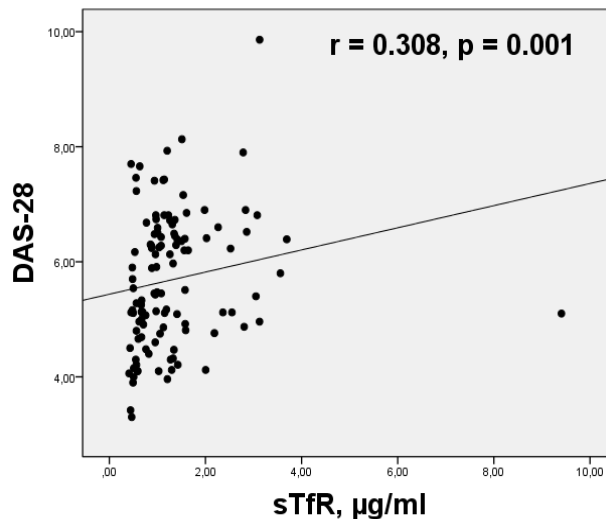
Показатели	РА		
	п	г	р
sTfR/СУЕ	114	0,252	0,007
Серумно желязо/DAS28	57	-0,375	0,004
Серумно желязо/СУЕ	57	-0,545	<0,001
ТIBC/DAS28	57	-0,374	0,004
ТIBC/АнтиССР антитела	24	-0,424	0,039
Lf/RF	107	-0,238	0,014
CRP/Нб	114	-0,303	0,001
IL-6/Нб	59	-0,343	0,008
СУЕ/Нб	114	-0,430	<0,001
СУЕ/Еритроцити	106	-0,302	0,002
Нб/Фибриноген	108	-0,401	<0,001
Еритроцити/Фибриноген	101	-0,275	0,005

Установяват се корелационни зависимости на sTfR с показатели за специфични нарушения, характерни за автоимунния отговор и активността на заболяването РА: достоверна положителна корелация с DAS28, RF и антиССР антитела (фиг. 1).



a)

б)



в)

Фигура 1. Корелационни зависимости между sTfR и RF (а), антиCCP антитела (б) и DAS28 (в) при пациенти с РА.

Серумно желязо

Съдържанието на серумно желязо е статистически значимо по-високо при контролната група в сравнение с болните от РА (с около 28,5%, $p=0,014$) (табл. 2). Установява се отрицателна корелационна зависимост между серумното желязо и IL-6 както в контролната група, така и при пациенти с РА (табл. 3). Достоверна отрицателна корелация между серумно желязо и CRP се открива при болните от РА, но не и при здравите доброволци (табл. 3). И в двете групи не се наблюдава статистически значима взаимовръзка в промените на серумното желязо и феритина (табл. 2). При пациентите с РА се намира отрицателна корелационна зависимост на серумното желязо със СУЕ и DAS28 (табл. 4).

ТІВС

Стойностите на общия желязосвързващ капацитет не се различават статистически достоверно при здрави и болни (табл. 2). Не се открива корелационна зависимост между ТІВС и sTfR в нито една от групите. Обаче само при пациентите с РА се установява отрицателна корелация на ТІВС със серумния феритин и CRP (табл. 3). Наблюдават се достоверни отрицателни корелации между ТІВС и показателите за специфични нарушения при РА - DAS28 и антиCCP антителя (табл. 4).

Хемоглобин и еритроцити

При болните от РА се изследват и съдържание на хемоглобин и брой еритроцити, съответно стойностите за Hb (g/L) са $126,45 \pm 13,05$, $n=114$, а за еритроцити – $4,44$ ($4,16-4,72$), $n=106$. Установяват се положителни корелационни зависимости между серумно желязо и Hb ($n=57$, $r=0,457$, $p<0,001$), серумно желязо и еритроцити ($n=53$, $r=0,450$, $p=0,001$), както и между Hb и еритроцити ($n=106$, $r=0,628$, $p<0,001$). И двата показателя са в достоверна отрицателна корелация с фибриноген и СУЕ (табл. 4). Hb е в отрицателна корелация и със CRP и IL-6 (табл. 3).

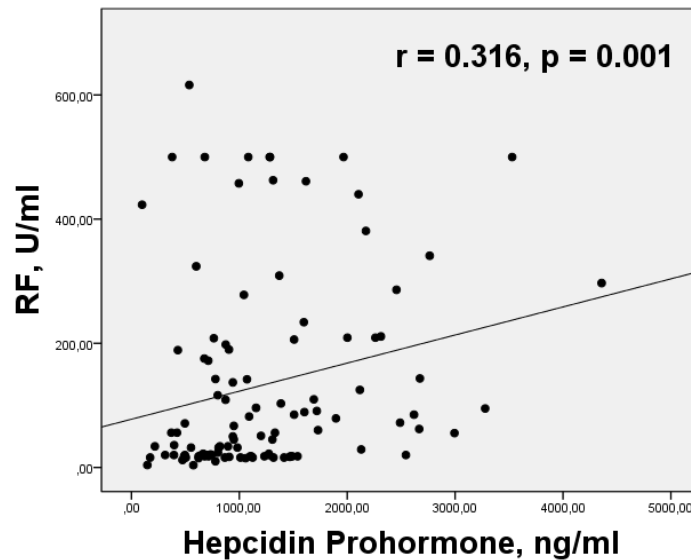
Прохепсидин

Нивото на прохепсидин се повишава статистически значимо при пациентите с РА спрямо контролната група (с около 27%, $p=0,013$) (табл. 2). Наблюдават се статистически достоверни положителни корелационни зависимости на прохепсидин с sTfR, CRP и СУЕ само при болните от РА (табл. 3 и 5).

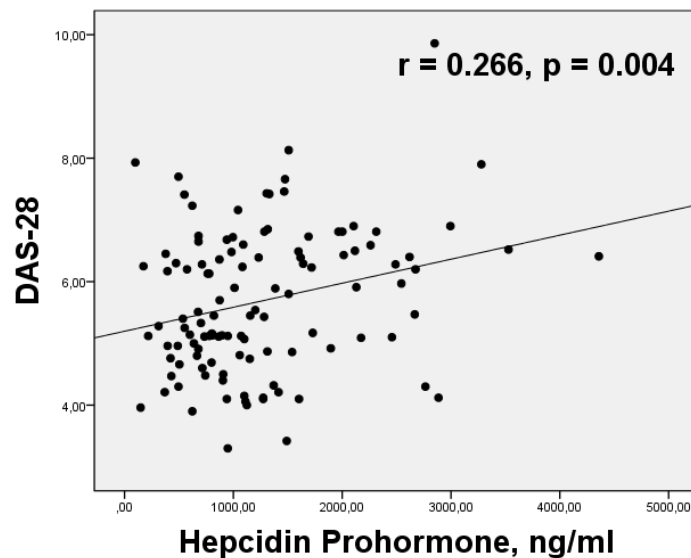
Таблица 5. Корелационни зависимости между показателите за възпаление и аутоимунни нарушения при болни от РА.

Показатели	РА		
	n	r	p
Прохепсидин/СУЕ	114	0,232	0,013
CRP/DAS28	114	0,435	<0,001
CRP/RF	107	0,232	0,016
CRP/АнтиCCP антителя	67	0,266	0,029
CRP/СУЕ	114	0,450	<0,001
IL-6/DAS28	59	0,335	0,009
IL-6/СУЕ	59	0,344	0,008
СУЕ/DAS28	114	0,396	<0,001
СУЕ/Фибриноген	108	0,436	<0,001
Фибриноген/RF	102	0,511	<0,001
DAS28/RF	107	0,304	0,001
DAS28/АнтиCCP антителя	67	0,341	0,005
RF/АнтиCCP антителя	66	0,623	<0,001

Фибриноген: $4,25 \pm 1,38$, $n = 108$, **СУЕ:** 36 (28 – 58), $n = 114$



а)



б)

Фигура 2. Корелационни зависимости между прохепсидин и RF (а), и прохепсидин и DAS28 (б) при пациенти с РА.

Установяват се статистически достоверни положителни корелационни връзки на прохепсидин с RF и DAS28 при пациентите с РА (фиг. 2).

Интерлевкин-6

Съдържанието на IL-6 е достоверно по-високо при пациентите с РА в сравнение с контролната група ($p=0,002$), (табл. 2). Не се установява корелационна връзка на IL-6 с феритин както при здрави, така и при болни от РА, но и в двете групи се проявява достоверна отрицателна зависимост със серумното желязо (табл. 3). Единствено в групата с РА се намира положителна корелация на IL-6 с sTfR и CRP (както при прохепсидина) (табл. 3). Също така при болните с РА се наблюдават положителни корелации на IL-6 със СУЕ, CRP и DAS28 (табл. 5), а отрицателна с Hb (табл. 4).

1.1.2. Сравнение между показатели на хомеостаза на желязо и възпаление при болни от РА според нивото на хемоглобин

Таблица 6. Сравнение между показателите на хомеостазата на желязо и възпаление при болни от РА според нивото на Нв.

Показатели	Нв в норма Mean ± SD и медиана (25 ^{-ти} и 75 ^{-ти} персентил)	Нисък Нв Mean ± SD и медиана (25 ^{-ти} и 75 ^{-ти} персентил)	р
sTfR, µg/ml	0,99 (0,59 – 1,39) n = 79	1,14 (0,88 – 1,61) n = 35	0,052
Феритин, ng/ml	39,9 (22,4 – 77,9) n = 79	43,7 (21,8 – 84,3) n = 35	NS
Серумно желязо, µmol/l	16,1 ± 6,5 n = 41	10,8 ± 6,4 n = 16	0,007*
ТВС, µmol/l	59,5 ± 7,6 n = 41	58,8 ± 14,7 n = 16	NS
CRP, µg/ml	2,2 (1,9 – 5,8) n = 79	10,3 (2,3 – 53,5) n = 35	<0,001*
IL-6, pg/ml	2,96 (0,96 – 6,79) n = 43	9,42 (2,26 – 22,42) n = 16	0,022*
Прохепсидин, ng/ml	1189 ± 711 n = 79	1427 ± 952 n = 35	NS

* статистическа значимост

Направи се сравнение между показателите на хомеостаза на желязо и възпалителна активност при болните от РА според нивото на Нв. На базата на този критерий пациентите се разделят на две групи: с нормално и ниско ниво на Нв. Съдържанието на CRP и IL-6 статистически достоверно се повишава в групата болни с ниско ниво на Нв спрямо тази с нормално ниво на Нв, докато при sTfR има тенденция затова (p=0,052) (табл. 6). Серумното желязо се понижава в групата пациенти с ниско ниво на Нв в сравнение с тази с нормално ниво на Нв (табл. 6).

1.1.3. Сравнение между показатели на хомеостаза на желязо и възпаление при болни от РА според нивото на болестна активност

За да изследваме дали нивото на болестна активност (DAS28) влияе достоверно върху изследваните параметри на хомеостаза на желязо и възпаление при болните от РА се извърши сравнителен анализ.

Таблица 7. Сравнение между показателите на хомеостаза на желязо и възпаление при болни от РА според нивото на болестна активност.

Показатели	DAS28≤5,1 Mean ± SD и медиана (25 ^{-ти} и 75 ^{-ти} перцентил)	DAS28>5,1 Mean ± SD и медиана (25 ^{-ти} и 75 ^{-ти} перцентил)	p
sTfR, µg/ml	0,79 (0,56 – 1,36) n = 38	1,10 (0,86 – 1,55) n = 76	0,062
Феритин, ng/ml	38,1 (21,6 – 82,9) n = 38	43,4 (22,4 – 75,4) n = 76	NS
Серумно желязо, µmol/l	16,6 ± 6,9 n = 25	13,1 ± 6,5 n = 32	0,051
TIBC, µmol/l	64,5 ± 9,7 n = 25	55,2 ± 8,2 n = 32	<0,0001*
CRP, µg/ml	2,0 (1,7 – 3,0) n = 38	3,4 (2,2 – 22,4) n = 76	<0,0001*
IL-6, pg/ml	2,44 (1,15 – 5,10) n = 26	4,77 (1,20 – 14,74) n = 33	0,078
Прохепсидин, ng/ml	1103 ± 651 n = 38	1341 ± 852 n = 76	NS

* статистическа значимост

Показателят DAS28 корелира със степента на активност на заболяването, както следва: <2,6 - ремисия на заболяването; >2,6 и <3,2 - ниска активност на заболяването; >3,2 и <5,1 - умерена активност на заболяването; >5,1 - висока активност на заболяването (Dougados et al., 2007). В нашето проучване се оформят две групи с: умерена - DAS28≤5,1 и висока - DAS28>5,1 активност на заболяването (табл. 7).

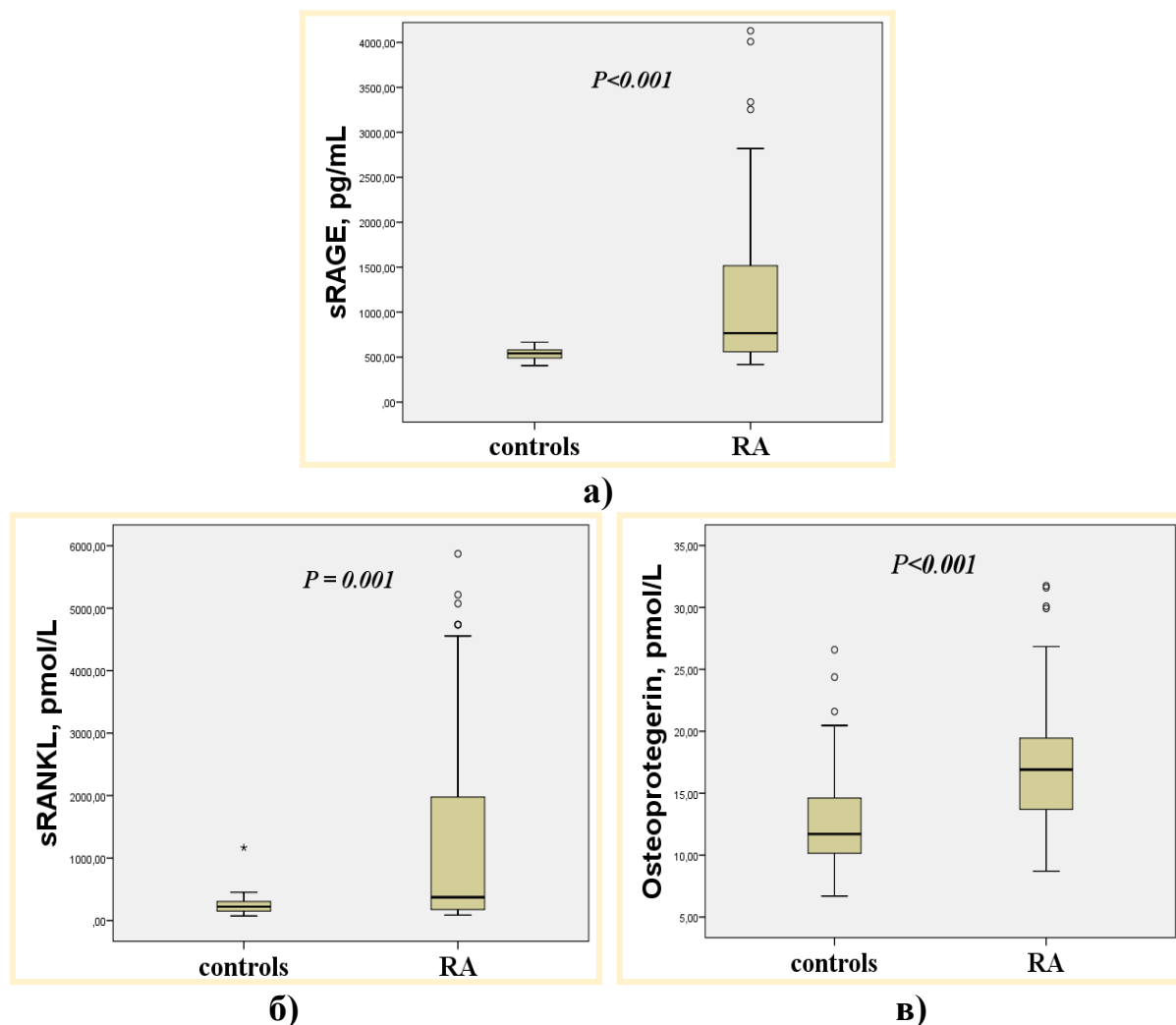
Между двете групи, с DAS28≤5,1 и DAS28>5,1, се установява статистически значима разлика при следните показатели: TIBC и CRP. Нивото на TIBC е достоверно по-ниско при DAS28>5,1, докато съдържанието на CRP е по-високо в тази група. Наблюдава се тенденция за понижаване на серумното желязо при DAS28>5,1 (p=0,051) и вероятно за повишаване на sTfR в тази група (p=0,062), докато при останалите показатели такава липсва (табл. 7).

1.2. Разтворими рецептори – sTfR, sRAGE, sRANKL и OPG

Оценка на разтворимите рецептори се направи чрез измерване на серумното им съдържание при пациенти с РА и здрави доброволци и последващо извършване на корелационен анализ. Потърсихме взаимовръзки между sTfR, sRAGE, sRANKL, OPG и показателите на хомеостазата на желязо, възпалителна активност и автоимунни нарушения при пациентите с РА.

1.2.1. Съдържание на разтворимите рецептори при болни от РА и контролна група

Освен нивото на sTfR, (табл. 2) и съдържанието на останалите изследвани в серума разтворими рецептори, sRAGE, sRANKL и OPG, при пациентите с РА е статистически значимо по-високо [766 (560-1567) pg/ml, 372 (171-1998) pmol/l и $17,06 \pm 4,75$ pmol/l] в сравнение със здравите доброволци [543 (489-584) pg/ml, 222 (147-312) pmol/l и $12,81 \pm 4,40$ pmol/l] (фиг. 3).



Фигура 3. Серумни нива на sRAGE (а), sRANKL (б) и OPG (в) при контролна група и пациенти с РА.

1.2.2. Корелационни зависимости между разтворимите рецептори и показателите за оценка хомеостазата на желязо и възпалителната активност при болни от РА и контролна група

Корелационни зависимости на sTfR при контролна група и пациенти с РА

Информацията е представена в таблици 2, 3 и 4.

Корелационни зависимости на sRAGE при контролна група и пациенти с РА

При здравите доброволци се наблюдава отрицателна корелация между sRAGE и sTfR, каквато не се установява при пациентите с РА. При болните от РА има достоверна положителна корелационна зависимост между sRAGE и sTfR. При другите изследвани показатели на желязната хомеостаза (серумно желязо, TIBC, UIBC, феритин) не се намират достоверни взаимовръзки с sRAGE (табл. 8).

При пациентите с РА се откриват и статистически достоверни положителни корелационни връзки между sRAGE и прохепсидин, sRANKL, CRP, IL-6 (табл. 8).

Таблица 8. Корелационни зависимости на sRAGE при контролна група и пациенти с РА.

Показатели	Контролна група			РА		
	n	r	p	n	r	p
sRAGE/sTfR	42	-0,419	0,006*	114	0,493	<0,0001*
sRAGE/Прохепсидин	42	-0,218	NS	114	0,297	0,001*
sRAGE/Феритин	42	-0,237	NS	114	0,007	NS
sRAGE/Серумно желязо	21	-0,060	NS	57	-0,237	0,077
sRAGE/TIBC	21	-0,108	NS	57	-0,136	NS
sRAGE/UIBC	21	-0,317	NS	57	0,041	NS
sRAGE/sRANKL	42	-0,007	NS	114	0,678	<0,0001*
sRAGE/OPG	42	-0,017	NS	114	0,021	NS
sRAGE/CRP	42	-0,157	NS	114	0,219	0,019*
sRAGE/IL-6	21	-0,231	NS	59	0,370	0,004*

* статистическа значимост

Корелационни зависимости на sRANKL при контролна група и пациенти с РА

При здравите доброволци се наблюдава статистически достоверна отрицателна корелационна зависимост между sRANKL и OPG, каквато отсъства при пациентите с РА (табл. 9).

При болните от РА се установяват достоверни положителни корелационни връзки между sRANKL и sTfR, прохепсидин, CRP, IL-6 (табл. 9) и вече посочената между sRANKL и sRAGE (табл. 8).

Таблица 9. Корелационни зависимости на sRANKL при контролна група и пациенти с РА.

Показатели	Контролна група			РА		
	п	г	р	п	г	р
sRANKL/sTfR	42	-0,055	NS	114	0,659	<0,0001*
sRANKL/Прохепсидин	42	-0,183	NS	114	0,295	0,001*
sRANKL/Феритин	42	-0,303	0,051	114	0,038	NS
sRANKL/Серумно желязо	21	0,356	NS	57	-0,207	NS
sRANKL/TIBC	21	0,075	NS	57	-0,193	NS
sRANKL/UIBC	21	-0,046	NS	57	-0,047	NS
sRANKL/OPG	42	-0,322	0,037*	114	0,110	NS
sRANKL/CRP	42	-0,260	0,096	114	0,416	<0,0001*
sRANKL/IL-6	21	-0,227	NS	59	0,343	0,008*

* статистическа значимост

Корелационни зависимости на OPG при контролна група и пациенти с РА

При контролната група освен отрицателната корелационна връзка между OPG и sRANKL (табл. 9) се открива и положителна - между OPG и лактоферин (табл. 10).

При болните от РА се проявява статистически достоверна положителна корелационна зависимост на OPG с CRP и IL-6, също така отрицателна - между OPG и серумно желязо (табл. 10).

В нашето изследване се установява положителна взаимовръзка между OPG и феритин, обща за двете изследвани групи. Наблюдава се достоверна положителна корелация и между нивото на OPG и възрастта както при пациентите с РА, така и при здравите доброволци (табл. 10).

Таблица 10. Корелационни зависимости на OPG при контролна група и пациенти с РА.

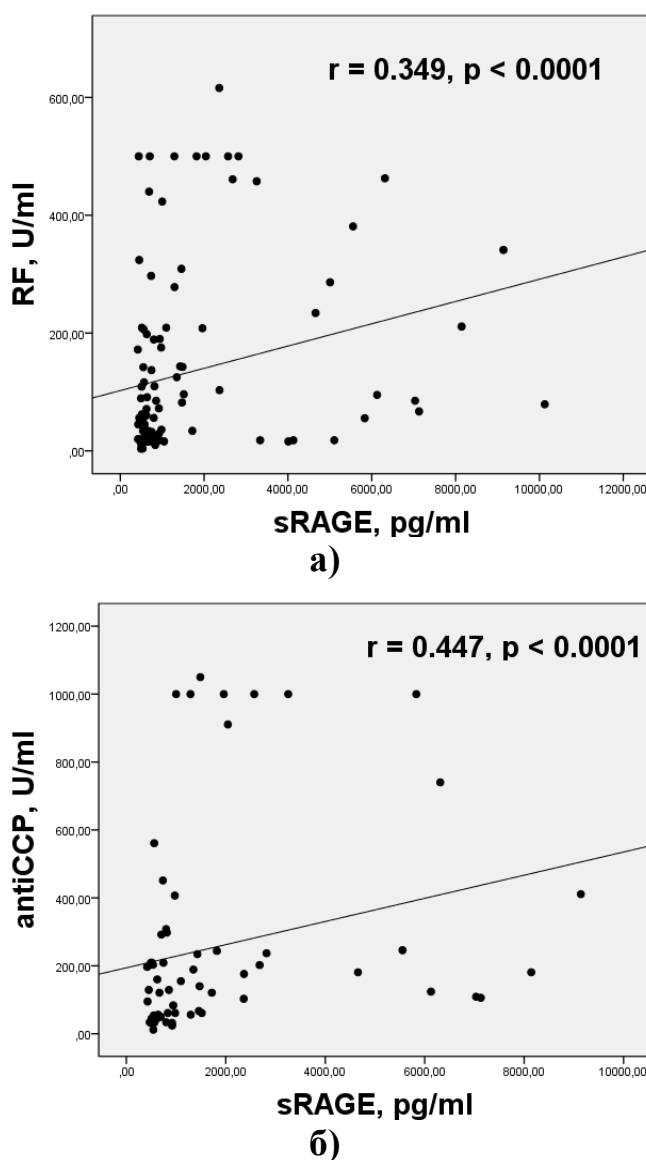
Показатели	Контролна група			РА		
	п	г	р	п	г	р
OPG/sTfR	42	0,163	NS	114	0,087	NS
OPG/Прохепсидин	42	0,124	NS	114	-0,031	NS
OPG/Феритин	42	0,340	0,028*	114	0,272	0,003*
OPG/Серумно желязо	21	-0,234	NS	57	-0,271	0,042*
OPG/TIBC	21	-0,086	NS	57	-0,182	NS
OPG/UIBC	21	-0,016	NS	57	0,005	NS
OPG/CRP	42	0,260	NS	114	0,229	0,014*
OPG/IL-6	21	-0,112	NS	59	0,278	0,033*
OPG/Възраст	42	0,475	0,001*	114	0,507	<0,0001*
OPG/Лактоферин	39	0,409	0,001*	114	-0,016	NS

* статистическа значимост

1.2.3. Корелационни зависимости между разтворимите рецептори и показателите за активност на заболяването и автоимунни нарушения при болни от РА

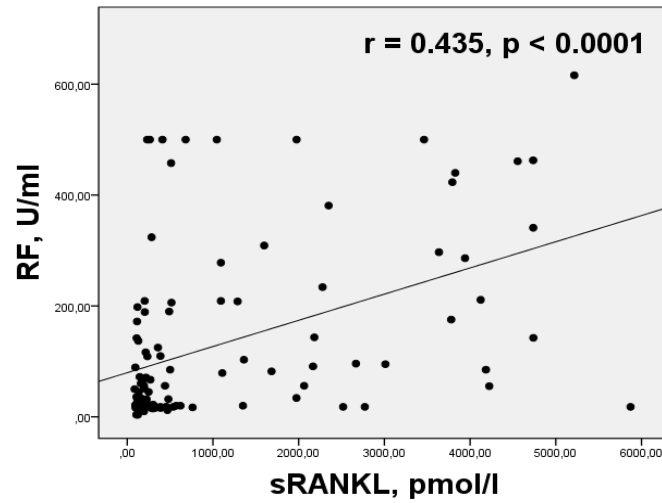
Корелационните зависимости между sTfR и показателите за активност на заболяването (DAS28) и автоимунни нарушения (RF и антиCCP антитела) при болни от РА са представени на фигура 1.

При пациентите с РА се установяват достоверни положителни корелационни връзки на sRAGE с RF и антиCCP антитела (фиг. 4). Не се наблюдава такава зависимост между sRAGE и DAS28.

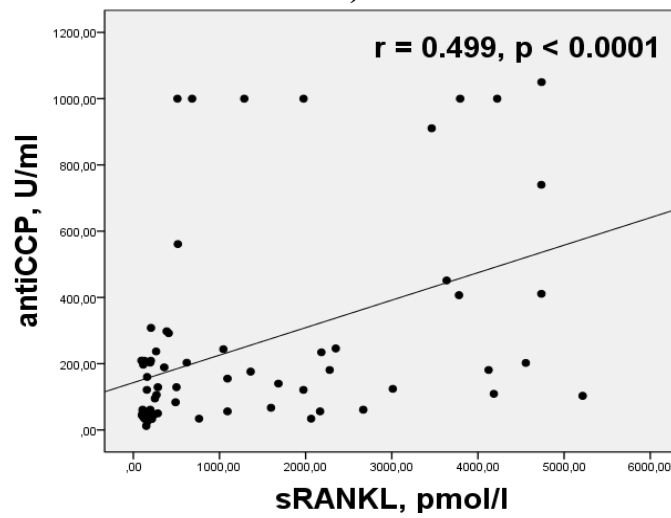


Фигура 4. Корелационни зависимости на sRAGE с RF (а) и sRAGE с антиCCP антитела (б) при пациенти с РА.

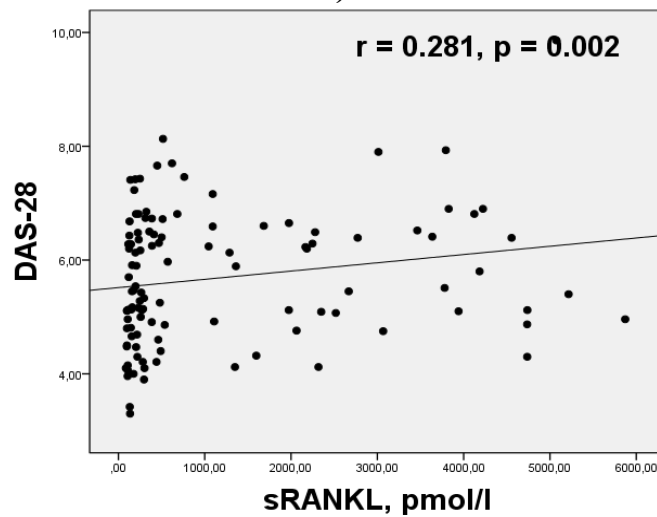
При пациентите с РА се наблюдават достоверни положителни корелационни зависимости на sRANKL с RF, антиCCP антитела и DAS28 (фиг. 5).



a)



б)



в)

Фигура 5. Корелационни зависимости на sRANKL с RF (а), антиCCP антитела (б) и DAS28 (в) при пациенти с ПА.

Не се намери статистически достоверна корелационна зависимост между OPG и специфичните маркери за ПА (RF, антиCCP антитела и DAS28) при болните от ПА.

1.2.4. Съдържание и корелационни връзки на разтворимите рецептори при болни от РА под влияние на възпалителния процес, преценено по серумната концентрация на CRP

При пациентите с РА се направи сравнение между нивата на разтворимите рецептори (sTfR, sRAGE, sRANKL и OPG) при отсъствие и наличие на възпалителен процес, преценено по серумната концентрация на CRP. Стойности на CRP ≤ 8 се приемат за нормални, а CRP > 8 говори за наличие на възпалителен процес.

Съдържание на разтворимите рецептори при пациенти с РА според нивото на CRP

Серумното съдържание на sTfR, sRAGE и sRANKL е достоверно високо не само при пациентите с РА в сравнение с контролната група, но и при болните с повишен CRP спрямо тези с нормален CRP (p < 0,001, p = 0,006, p < 0,001), докато при OPG има тенденция затова (p = 0,062) (табл. 11).

Таблица 11. Сравнение на съдържанието на разтворимите рецептори при пациенти с РА според CRP.

Показател	CRP ≤ 8 Mean ± SD и медиана (25 ^{-ти} и 75 ^{-ти} перцентил)	CRP > 8 Mean ± SD и медиана (25 ^{-ти} и 75 ^{-ти} перцентил)	p
sTfR, µg/ml	0,94 (0,56 – 1,33) n = 79	1,36 (1,03 – 2,02) n = 35	<0,001*
sRAGE, pg/ml	689 (539 – 985) n = 79	1290 (688 – 2681) n = 35	0,006*
sRANKL, pmol/l	248 (139 – 1093) n = 79	1092 (358 – 3793) n = 35	<0,001*
OPG, pmol/l	16,50 ± 4,64 n = 79	18,34 ± 4,83 n = 35	0,062

* статистическа значимост

Корелационни зависимости на sTfR, sRAGE, sRANKL и OPG при болни от РА според нивото на CRP

sTfR

Наблюдават се независещи от серумната концентрация на CRP статистически достоверни положителни корелации на sTfR с sRAGE и sRANKL, тъй като присъстват и в двете групи пациенти.

В групата болни с $CRP \leq 8$ се установява достоверна отрицателна корелация между sTfR и Lf и положителни корелации между sTfR и CRP, DAS28, RF и антиCCP антитела.

Само при $CRP > 8$ се откриват достоверна отрицателна корелационна зависимост между sTfR и феритин и положителни корелации на sTfR с прохепсидин и TIBC (табл. 12).

Корелационни зависимости на sRAGE според нивото на CRP при пациенти с РА

Установява се независеща от нивото на CRP положителна корелационна връзка на sRAGE не само с sTfR, но и sRANKL (табл. 12).

Таблица 12. Корелации на sTfR, sRAGE, sRANKL и OPG според CRP при пациенти.

Показатели	CRP \leq 8			CRP $>$ 8		
	n	r	p	n	r	p
sTfR/феритин	79	-0,103	NS	35	-0,336	0,048*
sTfR/Lf	79	-0,245	0,029*	35	0,157	NS
sTfR/sRAGE	79	0,435	<0,0001*	35	0,451	0,007*
sTfR/прохепсидин	79	0,208	0,065	35	0,385	0,022*
sTfR/TIBC	45	0,061	NS	12	0,580	0,048*
sTfR/sRANKL	79	0,513	<0,0001*	35	0,786	<0,0001*
sTfR/CRP	79	0,283	0,011*	35	-0,041	NS
sTfR/DAS28	79	0,299	0,008*	35	0,001	NS
sTfR/RF	73	0,449	<0,0001*	34	0,194	NS
sTfR/АнтиCCP антитела	45	0,456	0,002*	22	-0,086	NS
sRAGE/Lf	79	-0,008	NS	35	0,401	0,017*
sRAGE/Прохепсидин	79	0,232	0,040*	35	0,241	NS
sRAGE/sRANKL	79	0,636	<0,0001*	35	0,637	<0,0001*
sRAGE/CYE	79	0,426	<0,0001*	35	-0,165	NS
sRAGE/RF	73	0,363	0,002*	34	0,171	NS
sRAGE/АнтиCCP антитела	45	0,429	0,003*	22	0,277	NS
sRAGE/Hb	79	-0,238	0,035*	35	0,304	NS
sRANKL/CRP	79	0,223	0,048*	35	-0,089	NS
sRANKL/CYE	79	0,280	0,013*	35	-0,186	NS
sRANKL/DAS28	79	0,269	0,016*	35	-0,017	NS
sRANKL/RF	73	0,390	0,001*	34	0,422	0,013*
sRANKL/АнтиCCP антитела	45	0,445	0,002*	22	0,247	NS
OPG/Феритин	79	0,320	0,004*	35	0,058	NS

* статистическа значимост

Само при пациенти с $CRP \leq 8$ се наблюдават достоверни положителни корелационни зависимости между sRAGE и прохепсидин, СУЕ, RF, антиССР антитела, а отрицателна корелация на sRAGE с Hb.

В групата болни с $CRP > 8$ се намира статистически достоверна положителна корелация на sRAGE с лактоферин (табл. 12).

Корелационни зависимости на sRANKL според нивото на CRP при пациенти с РА

Независимо от нивото на CRP при болните от РА се открива положителна корелационна зависимост и между sRANKL и RF, освен вече посочените с sRAGE и sTfR.

В групата пациенти с $CRP \leq 8$ се установяват достоверни положителни корелационни връзки на sRANKL с CRP, СУЕ, DAS 28, и антиССР антитела (табл. 12).

Корелационни зависимости на OPG според нивото на CRP при болни от РА

В групата пациенти с $CRP \leq 8$ се наблюдава достоверна положителна корелационна връзка между OPG и феритин. Не се откриват други корелационни зависимости на OPG при разделяне на пациентите с РА според серумната концентрация на CRP (табл. 12).

1.2.5. Съдържание и корелационни връзки на разтворимите рецептори при болни от РА в зависимост от вида анемия, преценена по нивата на sTfR-F индекс и хемоглобин

При пациентите с РА се направи сравнение между нивата на разтворимите рецептори (sTfR, sRAGE, sRANKL и OPG) в зависимост от стойността на sTfR-F индекс. Болните от РА с sTfR-F индекс $< 1,5$ са класифицирани с анемия на хроничното заболяване - ACD, а тези с sTfR-F индекс $> 1,5$ - с комбинация от анемия на хроничното заболяване и желязодефицитна анемия - ACD+IDA.

Също така се направи сравнение на съдържанието на sTfR, sRAGE, sRANKL и OPG при болните от РА според нивото на хемоглобин. На базата на този критерий пациентите са разделени на две подгрупи: без анемия и с анемия.

Съдържание на разтворимите рецептори при болни от РА според sTfR-F индекс и нивото на хемоглобин

При сравнение на съдържанието на разтворимите рецептори според sTfR-F индекс се установява, че нивата на sTfR, sRAGE и sRANKL са достоверно по-високи в групата с комбинирана анемия ACD+IDA (sTfR-F индекс $> 1,5$). Нивото на OPG има тенденция към понижаване в същата група на ACD+IDA ($p=0,053$), (табл. 13).

Таблица 13. Сравнение на съдържанието на разтворимите рецептори при болни от РА според sTfR-F индекс (ACD и ACD+IDA) и нивото на Hb (Hb в норма и нисък Hb).

Показатели	Mean ± SD и медиана (25 ^{-ти} и 75 ^{-ти} перцентил)	Mean ± SD и медиана (25 ^{-ти} и 75 ^{-ти} перцентил)	P
sTfR, µg/ml	ACD 1,04 ± 0,51, n = 100	ACD + IDA 3,22 ± 1,87, n = 14	<0,001*
	Hb в норма 0,99 (0,59 – 1,39), n=79	Нисък Hb 1,14 (0,88 – 1,61), n=35	0,052
sRAGE, pg/ml	ACD 701 (544 – 1242), n = 100	ACD + IDA 2521 (1329 – 5905), n = 14	<0,0001*
	Hb в норма 702 (541 – 1487), n = 79	Нисък Hb 834 (643 – 2042), n = 35	NS
sRANKL, pmol/l	ACD 283 (155 – 1081), n = 100	ACD + IDA 4032 (2041 – 4601), n = 14	<0,0001*
	Hb в норма 296 (158 – 2064), n = 79	Нисък Hb 450 (208 – 1361), n = 35	NS
OPG, pmol/l	ACD 17,39 ± 4,81, n = 100	ACD + IDA 14,77 ± 3,70, n = 14	0,053
	Hb в норма 16,80 ± 4,93, n = 79	Нисък Hb 17,65 ± 4,34, n = 35	NS

* статистическа значимост

При разделянето на пациентите според нивото на хемоглобин не се наблюдава статистически значима разлика в съдържанието на sRAGE, sRANKL и OPG, докато, както беше посочено, при sTfR има тенденция към повишаване в групата с ниско ниво на Hb – p=0,052 (табл. 13).

Корелационни зависимости на sTfR, sRAGE, sRANKL и OPG при болни от РА според нивото на sTfR-F индекс и на хемоглобин

sTfR

Наблюдават се независещи от нивото на sTfR-F индекс достоверни корелации между sTfR и sRAGE (положителна) и между sTfR и серумно желязо (отрицателна), тъй като присъстват и в двете групи пациенти. sTfR е в положителна корелационна зависимост и с sRANKL, независимо от вида на анемията, определена според стойността на sTfR-F индекс. Само в групата с sTfR-F индекс<1,5 (ACD) се откриват положителни корелации на sTfR с прохепсидин, OPG, CRP, IL-6, CUE, DAS28, RF и антиCCP антители. В групата с sTfR-F индекс>1,5 (ACD+IDA) се установява достоверна положителна корелационна връзка на sTfR с феритин, която отсъства при с sTfR-F индекс<1,5 (табл. 14).

Откриват се независещи от нивото на хемоглобин статистически значими положителни корелации между sTfR и прохепсидин, sRANKL, RF и еритроцити. В групата пациенти с нисък Hb се намира достоверна отрицателна корелация между sTfR и феритин. Само в групата болни с нормално ниво на Hb се установяват достоверни положителни корелационни зависимости между sTfR и sRAGE, CRP, IL-6, ESR, DAS28, антиССР антитела (табл. 14).

Таблица 14. Корелационни зависимости на sTfR при болни от РА според нивото на sTfR-F индекс (ACD и ACD+IDA) и на хемоглобин (Hb в норма и нисък Hb).

Показатели	r	p	r	p
	ACD, n = 100		ACD + IDA, n = 14	
sTfR/Феритин	-0,006	NS	0,957	<0,0001*
sTfR/sRAGE	0,356	<0,0001*	0,714	0,004*
sTfR/Fe	-0,340	0,014*	-0,923	0,026*
sTfR/Прохепсидин	0,423	<0,0001*	0,186	NS
sTfR/sRANKL	0,527	<0,0001*	0,657	0,011*
sTfR/CRP	0,519	<0,0001*	-0,121	NS
sTfR/OPG	0,226	0,024*	0,243	NS
sTfR/IL-6	0,484	<0,0001*	-0,176	NS
sTfR/CUE	0,254	0,011*	0,123	NS
sTfR/DAS28	0,398	<0,0001*	-0,098	NS
sTfR/RF	0,408	<0,0001*	0,267	NS
sTfR/АнтиССР антитела	0,461	<0,0001*	0,012	NS
	Hb в норма, n = 79		Нисък Hb, n = 35	
sTfR/Феритин	-0,013	NS	-0,416	0,013*
sTfR/sRAGE	0,519	<0,0001*	0,322	0,059
sTfR/Прохепсидин	0,246	0,029*	0,609	<0,001*
sTfR/sRANKL	0,680	<0,0001*	0,586	<0,0001*
sTfR/CRP	0,512	<0,0001*	0,184	NS
sTfR/IL-6	0,412	0,006*	-0,005	NS
sTfR/CUE	0,292	0,009*	0,050	NS
sTfR/DAS28	0,290	0,010*	0,313	0,067
sTfR/RF	0,452	<0,0001*	0,475	0,004*
sTfR/АнтиССР антитела	0,369	0,012*	0,266	NS
sTfR/Еритроцити	0,237	0,044*	0,386	0,026*

* статистическа значимост

Корелационни зависимости на sRAGE според нивото на sTfR-F индекс и на хемоглобин при пациенти с РА

Наблюдават се достоверни положителни корелационни връзки на sRAGE с избраните показатели за оценка на автоимунни нарушения (RF и антиССР антитела), костна деструкция (sRANKL) и възпаление (CRP и IL-6), които присъстват само в групата пациенти с sTfR-F индекс < 1,5 (ACD).

Установява се положителна корелационна зависимост между sRAGE и sRANKL независимо от нивото на хемоглобина, тъй като се намира и в двете подгрупи. Откриват се значими положителни корелации на sRAGE с CRP, RF и антиССР антитела само в групата болни с нормално ниво на хемоглобин и с IL-6 само в групата пациенти с ниско ниво на хемоглобин (табл. 15).

Таблица 15. Корелационни зависимости на sRAGE при болни от РА според нивото на sTfR-F индекс (ACD и ACD + IDA) и на хемоглобин (Hb в норма и нисък Hb).

Показатели	r	p	r	p
	ACD, n = 100		ACD + IDA, n = 14	
sRAGE/Прохепсидин	0,260	0,009*	0,431	NS
sRAGE/sRANKL	0,600	<0,0001*	0,420	NS
sRAGE/CRP	0,199	0,048*	-0,215	NS
sRAGE/IL-6	0,377	0,005*	-0,304	NS
sRAGE/RF	0,302	0,003*	-0,054	NS
sRAGE/АнтиССР антитела	0,471	<0,0001*	-0,064	NS
	Hb в норма, n = 79		Нисък Hb, n = 35	
sRAGE/Прохепсидин	0,272	0,015*	0,332	0,052
sRAGE/sRANKL	0,740	<0,0001*	0,495	0,003*
sRAGE/IL-6	0,246	NS	0,512	0,043*
sRAGE/CRP	0,229	0,042*	0,075	NS
sRAGE/RF	0,396	0,001*	0,209	NS
sRAGE/АнтиССР антитела	0,460	0,001*	0,379	NS

* статистическа значимост

Корелационни зависимости на sRANKL според нивото на sTfR-F индекс и на хемоглобин при пациенти с РА

При болните с ACD (sTfR-F индекс < 1,5) се намира достоверна положителна корелационна зависимост между sRANKL и OPG, която липсва в цялата група пациенти с РА.

Откриват се положителни корелационни връзки на sRANKL освен със sRAGE и sTfR, и с CRP, RF и антиCCP антитела, независимо от нивото на хемоглобин при пациентите. Установява се статистически значима положителна зависимост между sRANKL и прохепсидин само в групата болни с ниско ниво на Hb (табл. 16).

Таблица 16. Корелационни зависимости на sRANKL при болни от РА според нивото на sTfR-F индекс (ACD и ACD + IDA) и на хемоглобин (Hb в норма и нисък Hb).

Показатели	r	p	r	p
	ACD, n = 100		ACD + IDA, n = 14	
sRANKL/Прохепсидин	0,298	0,003*	-0,138	NS
sRANKL/TIBC	-0,340	0,014*	-0,813	NS
sRANKL/CRP	0,457	<0,0001*	0,190	NS
sRANKL/OPG	0,238	0,017*	-0,093	NS
sRANKL/IL-6	0,355	0,009*	-0,508	NS
sRANKL/DAS28	0,318	0,001*	0,072	NS
sRANKL/RF	0,403	<0,0001*	0,396	NS
sRANKL/АнтиCCP антитела	0,545	<0,0001*	0,352	NS
	Hb в норма, n = 79		Нисък Hb, n = 35	
sRANKL/Прохепсидин	0,199	NS	0,538	0,001*
sRANKL/CRP	0,354	0,001*	0,414	0,013*
sRANKL/IL-6	0,299	0,051	0,364	NS
sRANKL/DAS28	0,207	0,067	0,460	0,005*
sRANKL/RF	0,361	0,002*	0,587	<0,0001*
sRANKL/АнтиCCP антитела	0,459	0,001*	0,585	0,005*

* статистическа значимост

Корелационни зависимости на OPG според нивото на sTfR-F индекс и на хемоглобин при пациенти с РА

Наблюдават се статистически значими положителни корелации на OPG освен с sTfR и sRANKL, и с феритин, серумно желязо, CRP, IL-6, RF и DAS28 само в групата болни с ACD (sTfR-F индекс < 1,5), но не и в тази с комбинирана анемия ACD+IDA.

Откриват се достоверни положителни корелационни зависимости на OPG с IL-6 и RF в групата пациенти с ниско ниво на Hb, докато в групата с нормално ниво на Hb се установяват отрицателна корелация на OPG със серумното желязо и положителна с феритина (табл. 17).

Таблица 17. Корелационни зависимости на OPG при болни от РА според нивото на sTfR-F индекс (ACD и ACD + IDA) и на хемоглобин (Hb в норма и нисък Hb).

Показатели	r	p	r	p
	ACD, n = 100		ACD + IDA, n = 14	
OPG/Феритин	0,224	0,025*	0,281	NS
OPG/Серумно желязо	-0,380	0,005*	0,048	NS
OPG/CRP	0,238	0,017*	0,180	NS
OPG/IL-6	0,269	0,049*	0,714	NS
OPG/RF	0,238	0,022*	-0,464	NS
OPG/DAS28	0,215	0,032*	-0,377	NS
	Hb в норма, n = 79		Нисък Hb, n = 35	
OPG/Феритин	0,312	0,005*	0,178	NS
OPG/Серумно желязо	-0,398	0,010*	0,006	NS
OPG/IL-6	0,215	NS	0,542	0,030*
OPG/RF	0,026	NS	0,350	0,042*

* статистическа значимост

1.3. Ултрасонографски параметри

На таблици 18 и 19 са представени характеристиката на ултрасонографските параметри и корелациите им с показатели на желязната хомеостаза и активността на заболяването при пациенти с РА.

Таблица 18. Характеристика на ултрасонографските параметри.

Показател	US score	US-SE	US-SP	US-PD
Медиана	4,66 (3,25 – 7,17)	6,00 (4,00 – 9,00)	5,00 (4,00 – 7,25)	4,00 (2,00 – 5,00)

Установява се положителна корелационна зависимост между ултрасонографските параметри и феритин, а отрицателна между тях и sTfR-F индекс, TIBC и UIBC. Наблюдават се и статистически достоверни положителни корелации между US score и DAS28 и US-PD и DAS28.

Таблица 19. Корелации на ултрасонографските параметри при пациенти с РА.

Показатели	n	r	p
US score/Феритин	114	0,709	<0,0001*
US score/TIBC	57	-0,633	<0,0001*
US score/UIBC	57	-0,575	<0,0001*
US score/sTfR-F индекс	114	-0,253	0,007*
US score/DAS28	114	0,184	0,050*
US-SE/Феритин	114	0,679	<0,0001*
US-SE/TIBC	57	-0,613	<0,0001*
US-SE/UIBC	57	-0,532	<0,0001*
US-SE/sTfR-F индекс	114	-0,279	0,003*
US-SE/DAS28	114	0,170	0,071
US-SP/Феритин	114	0,696	<0,0001*
US-SP/TIBC	57	-0,610	<0,0001*
US-SP/UIBC	57	-0,578	<0,0001*
US-SP/sTfR-F индекс	114	-0,245	0,009*
US-SP/DAS28	114	0,150	0,112
US-PD/Феритин	114	0,702	<0,0001*
US-PD/TIBC	57	-0,600	<0,0001*
US-PD/UIBC	57	-0,587	<0,0001*
US-PD/sTfR-F индекс	114	-0,206	0,028*
US-PD/DAS28	114	0,208	0,027*

* статистическа значимост

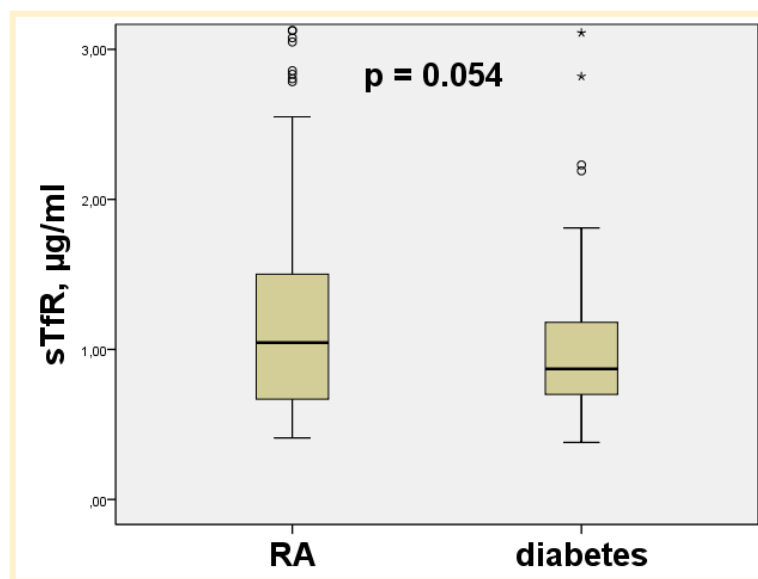
Сонографските данни за ставен излив и синовиална пролиферация корелират само с посочените показатели на хомеостазата на желязо, но не и с DAS28.

Не се откриват достоверни взаимовръзки между ултрасонографските параметри и останалите изследвани показатели на желязна обмяна, възпаление, костни и автоимунни нарушения.

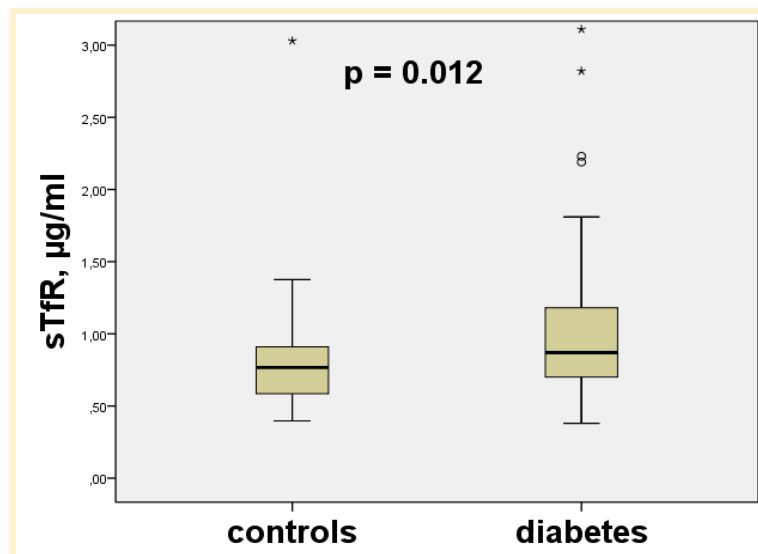
1.4. Сравнителна оценка на някои показатели на желязна хомеостаза и възпаление при ревматоиден артрит и диабет

Сравнителна оценка на желязния статус и възпалителната активност при пациенти с диабет, РА и здрави доброволци се направи чрез изследване на серумните нива на sTfR, Lf и sRAGE (фиг. 6, 7, 8).

Нивото на sTfR е значимо по-високо при пациентите с диабет [0,87 (0,70 – 1,21) $\mu\text{g/ml}$, $n=81$] спрямо контролната група [0,77 (0,58 – 0,91), $\mu\text{g/ml}$, $n=42$], (фиг. 6б), както и при болните от РА спрямо контролната група (табл. 2). Има тенденция за повишаване на концентрацията на sTfR при пациентите с РА в сравнение с тези с диабет ($p=0,054$), (фиг. 6а).



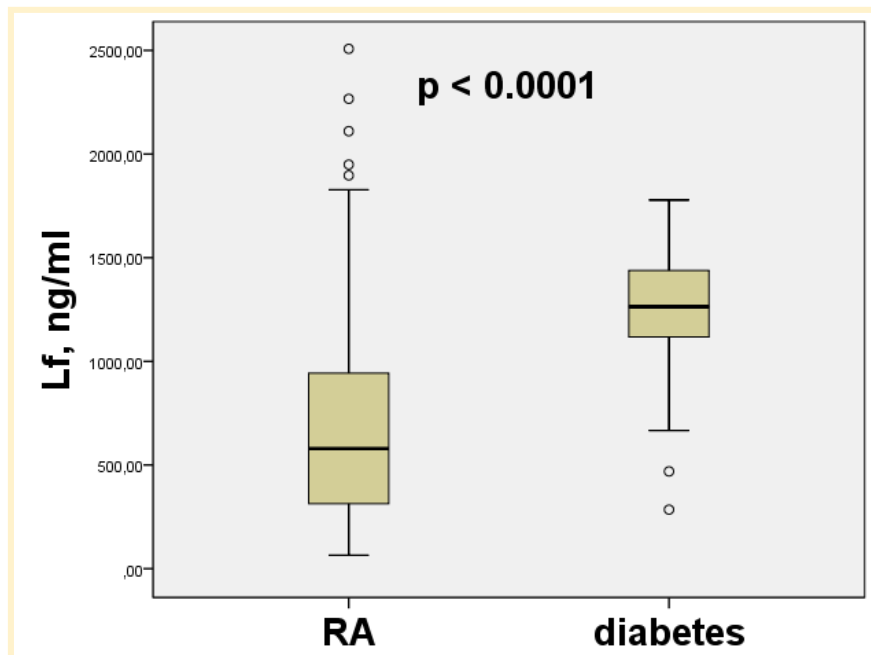
а)



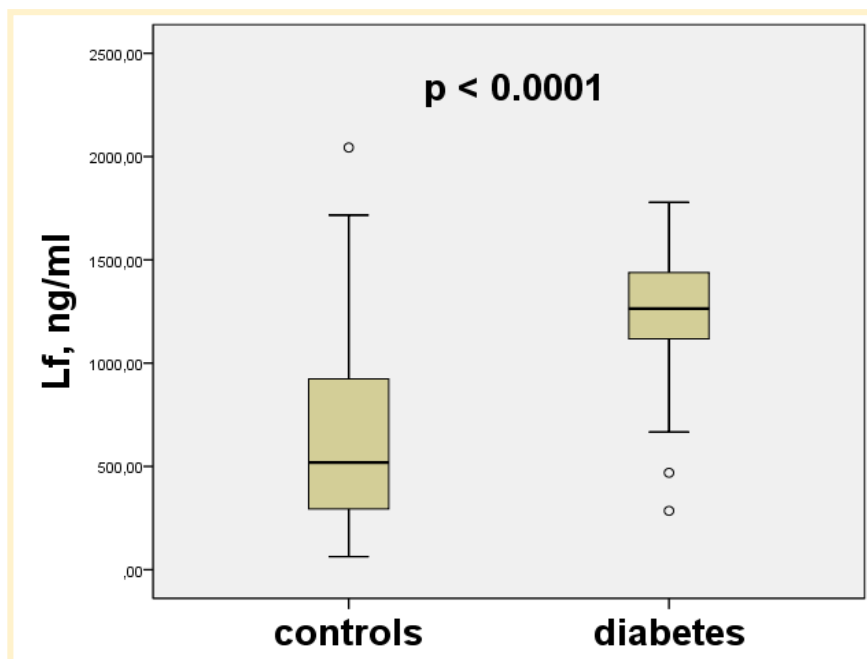
б)

Фигура 6. Сравнение между нивата на sTfR при: пациенти с ревматоиден артрит и диабет (а), контролна група и болни от диабет (б).

Съдържанието на Lf при пациенти с диабет [1264 (1114 – 1440) ng/ml, n=60] е достоверно по-високо в сравнение с РА и здрави доброволци (табл. 2, фиг. 7).



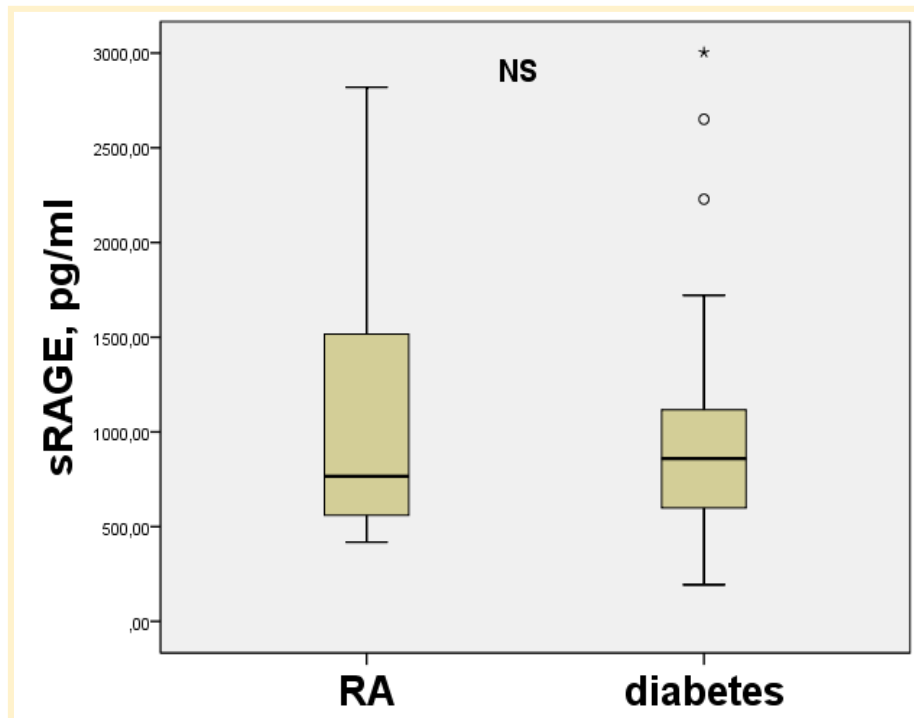
а)



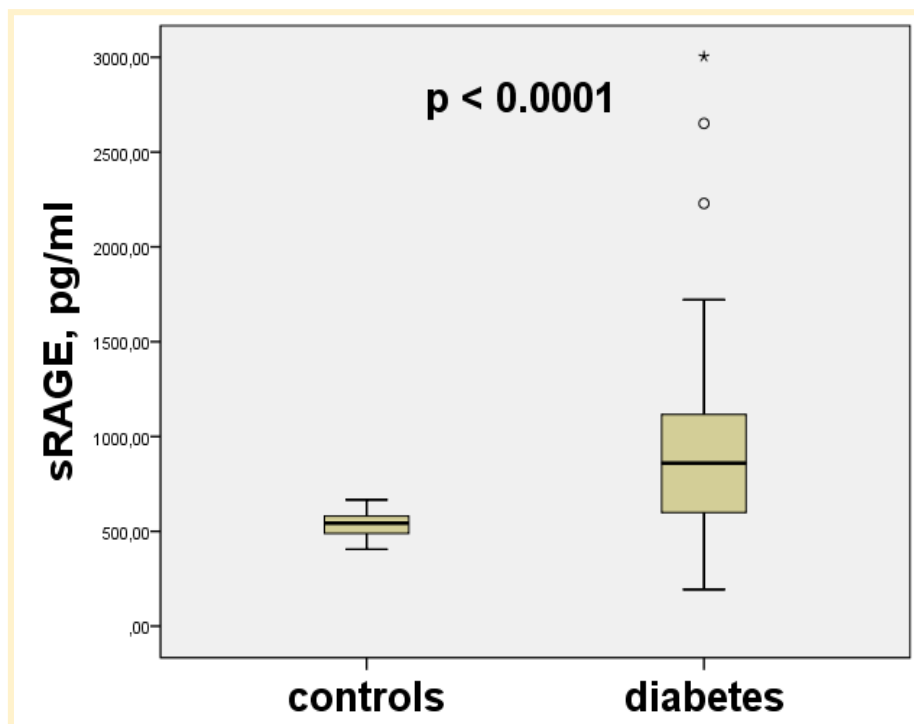
б)

Фигура 7. Сравнение между нивата на Lf при: пациенти с ревматоиден артрит и диабет (а), контролна група и болни от диабет (б).

Резултатите показват, че нивата на sRAGE при болни от диабет [860 (597 – 1125) pg/ml, n=81] и РА са достоверно по-високи в сравнение с контролната група, а няма статистически достоверна разлика в съдържанието на sRAGE между пациентите с РА и диабет (фиг. 3, 8).



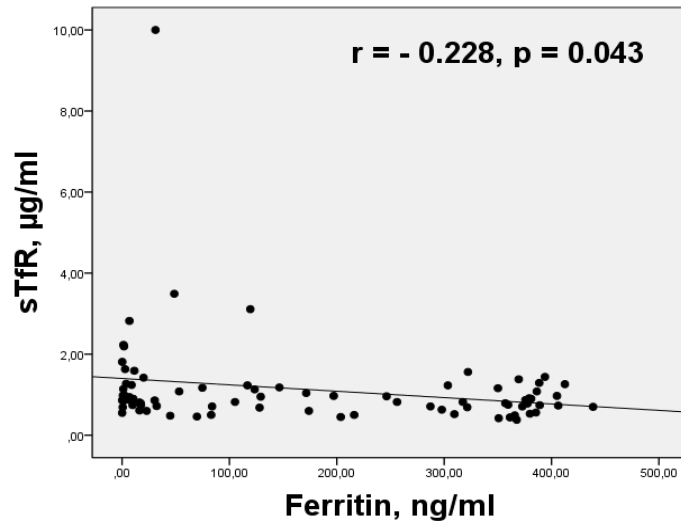
а)



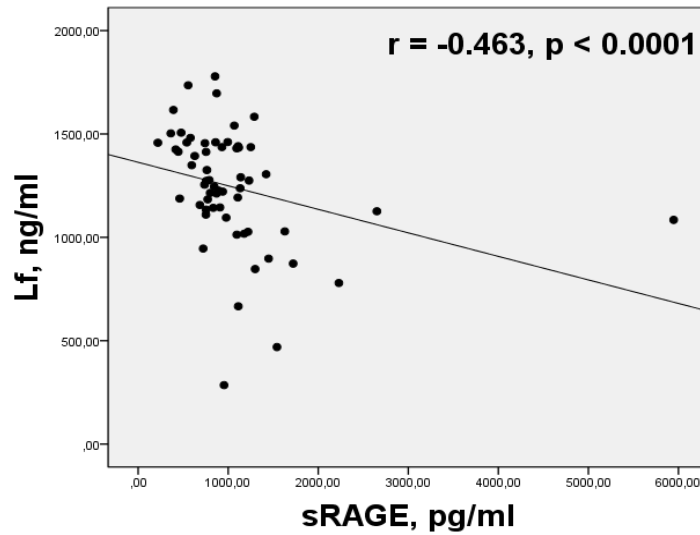
б)

Фигура 8. Сравнение между нивата на sRAGE: при пациенти с ревматоиден артрит и диабет (а), контролна група и болни от диабет (б).

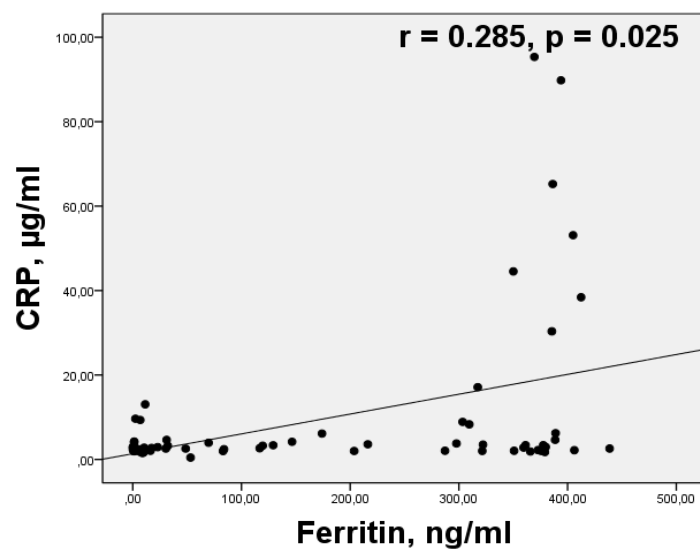
Установяват се статистически достоверни корелационни зависимости между показателите на желязна обмяна и възпаление при пациентите с диабет. Наблюдават се отрицателни корелации на феритин с sTfR и на sRAGE с Lf, и положителна - между феритин и CRP (фиг. 9а,б,в).



a)



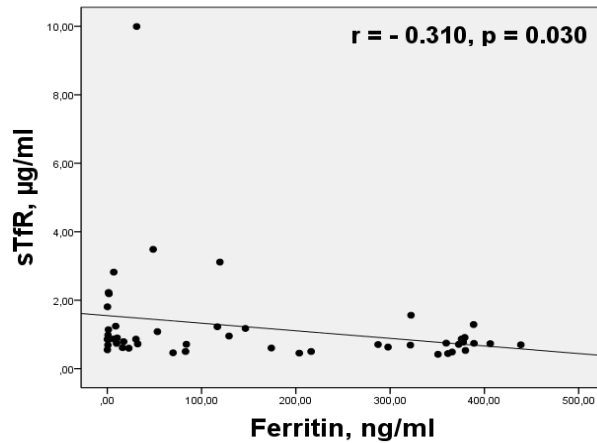
б)



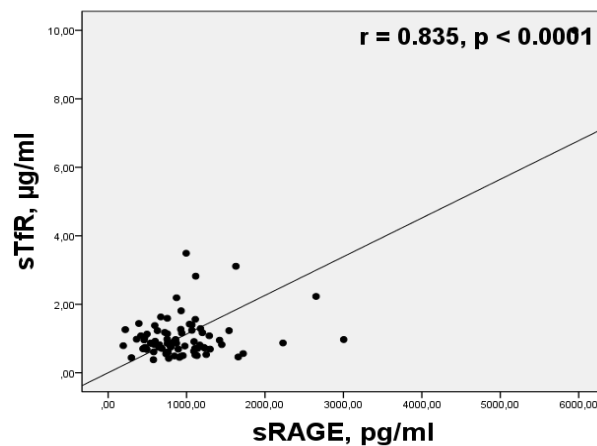
в)

Фигура 9. Корелационн зависимости при пациенти с диабет между: феритин и sTfR, n=79 (а), sRAGE и Lf, n=60, (б), феритин и CRP, n=62, (в).

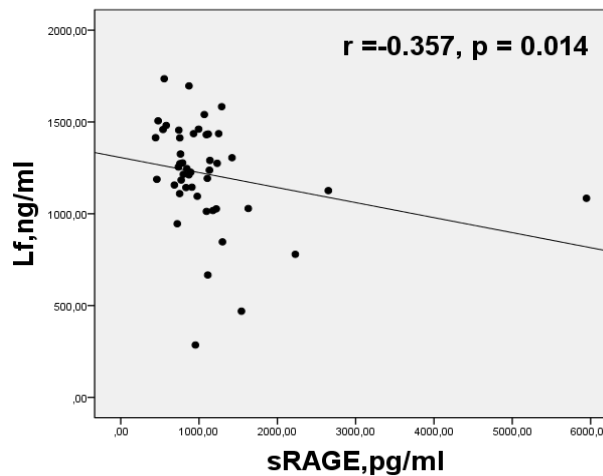
За оценка влиянието на възпалителния процес, преценено по серумната концентрация на CRP, пациентите с диабет се разделят на групи. Стойности на $CRP \leq 8$ се приемат за нормални, а $CRP > 8$ говори за наличие на възпалителен процес. Откриват се статистически достоверни корелационни зависимости, като отрицателната корелация между sRAGE и Lf се запазва и в двете групи пациенти – с повишени и нормални нива на CRP (фиг. 10в, 11б).



а)



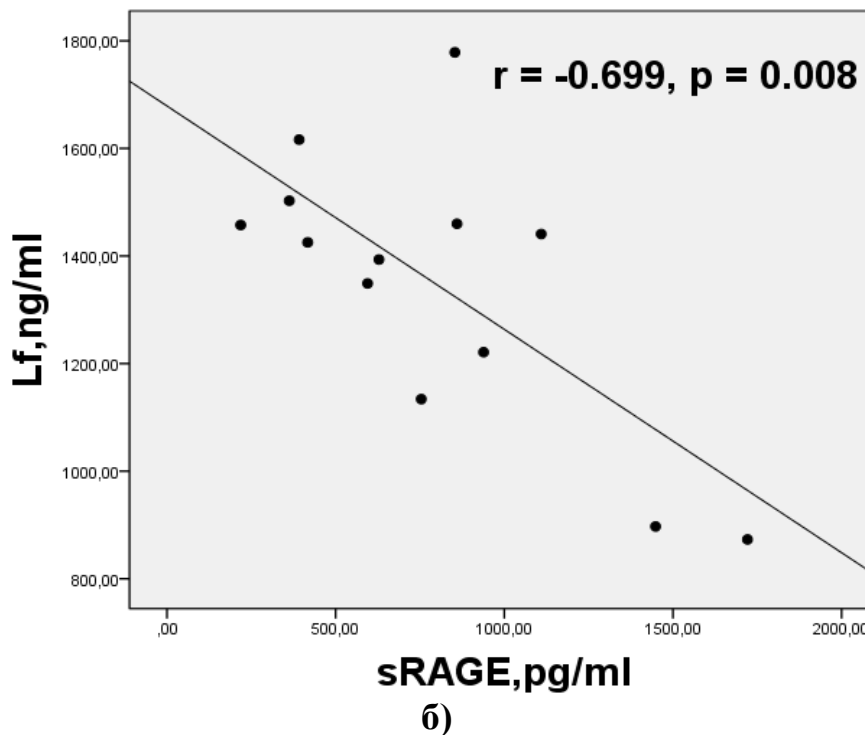
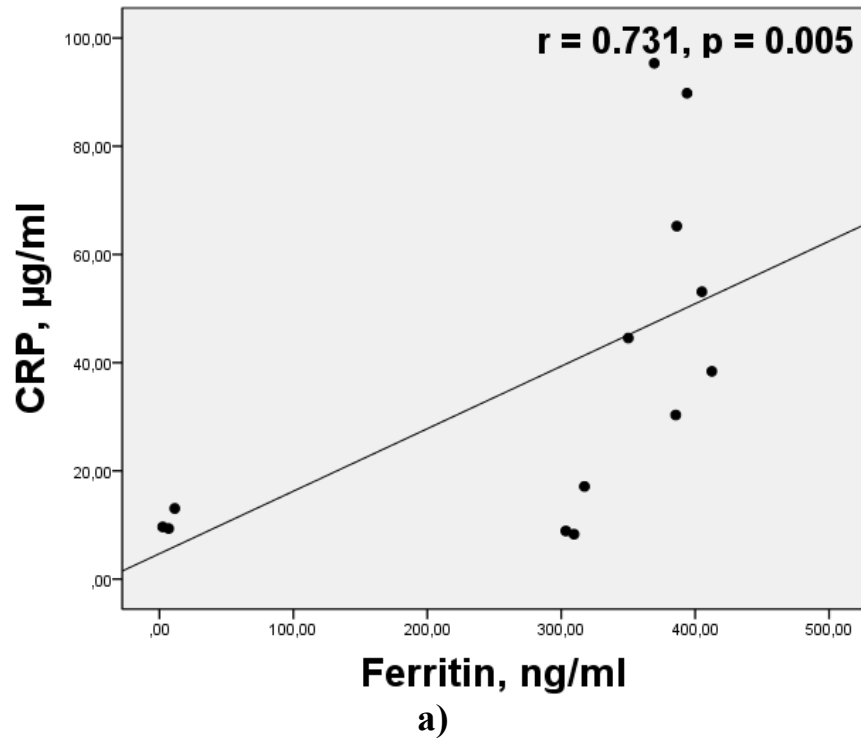
б)



в)

Фигура 10. Корелационни зависимости в групата пациенти с диабет и $CRP \leq 8$ между: феритин и sTfR, $n=49$ (а), sRAGE и sTfR, $n=49$ (б), sRAGE и Lf, $n=47$ (в).

В групата болни с $CRP \leq 8$ се запазва отрицателната корелация между феритин и sTfR и се установява положителна корелация между sRAGE и sTfR (фиг. 10а,б). Тези зависимости губят статистическата си значимост в групата пациенти с диабет и $CRP > 8$. При пациентите с повишен CRP ($CRP > 8$) се наблюдава положителна корелация между феритин и CRP (фиг. 11а), която губи значимост при болните от диабет с $CRP \leq 8$.



Фигура 11. Корелационни зависимости в групата пациенти с диабет и $CRP > 8$ между: феритин и CRP (а), sRAGE и Lf (б), $n=13$.

IV.2. ОБСЪЖДАНЕ

Ревматоидният артрит е хронично възпалително заболяване на ставите, което има различни системни прояви, като анемията е сред най-честите. Анемията при РА може да причини значително по-бързо напредване на ерозиите и изглежда улавя болестни процеси, които остават неотчетени от утвърдените методи за измерване активността на заболяването (Möller et al., 2014). Промените в желязния метаболизъм са водещи причини за анемия при пациенти с РА.

Етиологията на анемията при РА е сложна - може да има анемия на възпалението (ACD), желязодефицитна анемия (IDA) или комбинация от двете (ACD + IDA). За разлика от "чистия" желязен дефицит, при анемията на хроничните възпалителни процеси мишена за терапия е основният болестен процес (Masson, 2011; Calisto et al., 2012). Тъй като анемията при РА може да доведе до сериозни усложнения, усилията на изследователите са да намерят съчетание от подходящи методи за ранно откриване, мониторинг и лечение. Това налага детайлно познаване на връзките на хомеостазата на желязото с възпалителните и автоимунни нарушения при РА и търсене на показатели, които в голяма степен да обединяват тези патологични характеристики на заболяването.

Показатели за оценка на хомеостазата на желязо и възпалителната активност

Определянето на серумното съдържание на sTfR се счита за надежден показател при изследване на ACD (Braga et al., 2014) и за разграничаване на IDA от ACD (Hanif et al., 2005). Нашите резултати потвърждават твърдението на други изследователи, които намират, че повишените нива на sTfR са характерна особеност на функционален дефицит на желязо, независимо от адекватните запаси от желязо, както е при хроничните възпалителни процеси (Beguín, 2003), (табл. 2). Недостигът на желязо, съпътстващ заболяването РА, се потвърждава и от факта, че нивото на sTfR е статистически значимо по-високо не само при болните от РА в сравнение с контролната група, (табл. 2), но и в групата пациенти с нисък хемоглобин се запазва същата тенденция спрямо болните с хемоглобин в норма, $p=0,052$ (табл. 6). Това показва, че определянето на sTfR би могло да демаскира състояние на дефицит на желязо при нормална хемопоеза и обръща внимание на факта, че при ревматоидния артрит не е достатъчно да бъде определен само хемоглобина, за да се приеме отсъствие на желязен дефицит.

Изследването на корелационните връзки на sTfR с останалите показатели на хомеостазата на желязо, възпалителната активност и автоимунните нарушения показва, че този параметър дава най-много информация, като свързва патобиохимичните механизми в усвояването на желязото с автоимунните нарушения при РА (табл. 3, 4). Сравнителните изследвания със здрави доброволци ясно сочат, че само при болните от РА,

но не и при контролната група, се открива положителна корелационна зависимост между необходимостта от желязо (преценено по съдържанието на sTfR) и освобождаването на провъзпалителния цитокин IL-6 и хормона хепсидин (преценено по съдържанието на прохепсидин) (табл. 3). Получените от нас резултати представят sTfR като чувствителен показател за специфичните нарушения при РА и активността на заболяването, тъй като се установи положителна корелационна връзка между sTfR и RF, антиССР антитела, DAS28 и СУЕ при болните от РА (табл. 4, фиг. 1). Известно е, че високите нива на RF и антиССР антителата при РА са свързани с по-тежко протичане на заболяването. Намерената отрицателна корелация между съдържанието на серумно желязо и концентрацията на sTfR също потвърждава информативността на този параметър - адаптивният патологичен механизъм на прибиране на желязото в депата поради хроничния възпалителен процес при РА е причина за железен дефицит, в отговор на което клетките експресират повече рецептори за трансферин. Подобна корелационна зависимост отсъства при контролната група (табл. 3).

Отделните острофазови белтъци са по-малко информативни за оценка на болестния процес и затова са възприети специфични показатели, които обхващат сумарно промените при РА. Такъв показател за активност на заболяването е DAS28 (disease activity score) (Lv et al., 2013), чрез който се проследяват прогресията на болестта и терапевтичната ефикасност на лечението.

Серумният феритин се явява не просто маркер за железен запас, но и показател за наличие на възпаление и окислителен стрес. Повишаването на феритина в серума на болни от РА се дължи на възпалителен отговор към нарастващия окислителен стрес (Shivasekar et al., 2014). Вероятно поради факта, че феритинът е едновременно желязосвързващ и острофазов белтък (Moore et al., 2013), неговата информативност за оценка на хомеостазата на желязото при заболяването РА е ограничена. В нашето проучване не се намира статистически достоверна разлика между здравите доброволци и болните от РА, макар че съдържанието на феритин е по-високо при пациентите (табл. 2). Някои автори докладват, че нивото на феритина е по-високо при пациенти с РА в сравнение с контролна група, като наблюдават значима корелация с DAS28 (Yildirim et al., 2004). Данните ни сочат, че серумният феритин не проявява чувствителност към разделянето на пациентите по групи според нивото на болестната активност (DAS28) и на хемоглобина. Получените от нас резултати не показват наличие на достоверна корелация на sTfR и серумното желязо със серумния феритин при болните от РА, докато при контролната група феритинът е в положителна корелационна връзка със съдържанието на желязо и отразява запасите от метала в депата (табл. 3). Серумният феритин е в отрицателна корелационна зависимост с общия желязосвързващ капацитет при пациентите с РА, което вероятно отразява невъзможността да бъде използвано депонираното желязо (табл. 3).

Само при болните от РА се установяват достоверни отрицателни корелационни връзки на общия желязосвързващ капацитет както със серумния феритин, така и с CRP (табл. 3), и с показателите за специфични нарушения при РА – DAS28 и антиССР антитела (табл. 4). Не се наблюдава статистически значима разлика в съдържанието на общия желязосвързващ капацитет при разделянето на пациентите според нивото на хемоглобина, докато той се понижава в групата пациенти с висока болестна активност ($DAS28 > 5,1$), (табл. 6, 7). Това представя общият желязосвързващ капацитет като параметър, отразяващ степента на възпалението и автоимунния процес, но не и степента на железен дефицит, потвърдено и от други автори (Önder et al., 2009).

Някои автори отричат информативността на определянето на серумното желязо като показател за анемия при РА (Ravindran et al., 2008). В нашето проучване количеството на серумното желязо е статистически значимо по-високо при здравите доброволци в сравнение с пациентите (табл. 2). При групата болни от РА с ниско ниво на хемоглобина серумното желязо очаквано се понижава, но има такава тенденция и в групата пациенти с висока болестна активност - $DAS28 > 5,1$ ($p=0,051$), (табл. 6, 7). Тези резултати сочат, че параметърът вероятно отразява състоянието на железен дефицит и възпалителна активност. Серумното желязо показва отрицателна корелационна връзка с IL-6 както при здрави доброволци, така и при болни от РА, но само при последните се установява достоверна отрицателна корелационна зависимост между серумното желязо и CRP (табл. 3). Наблюдава се и достоверна отрицателна корелация на серумното желязо със СУЕ и DAS28 при пациентите с РА (табл. 4), което потвърждава връзката между нарушената желязна хомеостаза и активността на заболяването РА.

Има противоречиви данни в литературата по отношение информативността на прохепсидина за оценка на железния статус (Koca et al., 2008; Jayarane et al., 2009; Kim et al., 2010). Получените от нас резултати свързват този параметър със състоянието на железен дефицит и с възпалителната активност при заболяването РА. Прохепсидинът има статистически значимо по-високо ниво при болни от РА спрямо контролната група, $p=0,013$ (табл. 2) и отразява състоянието на хипоферемия при възпалителния процес, тъй като е в достоверна положителна корелация със sTfR и с CRP само при пациентите с РА, но не и при здравите доброволци (табл. 3). Съществуват доказателства, че трансфериновият рецептор модулира експресията на хормона хепсидин (Schmidt et al., 2008). Според някои автори има зависимост между желязодефицитното състояние и серумната концентрация на прохепсидин при болните от РА (Jayarane et al., 2009), а други считат, че прохепсидинът корелира с активността на основния болестен процес, но не и със състоянието на анемия (Kim et al., 2010). В редица изследвания се установява, че серумното ниво на прохепсидин е статистически значимо по-високо при пациенти с РА в сравнение със здрави доброволци (Koca et al., 2008; Dağlı et al., 2013; Emerah et al., 2014). Нашите резултати показват, че

прохепсидинът е информативен както за оценка на жлезен дефицит, така и като показател, улавящ динамиката на автоимунния и възпалителен процес при РА, което проличава от намерената му достоверна положителна корелационна зависимост при болните от РА със СУЕ, DAS28 и RF (табл. 5, фиг. 2). Не се наблюдава корелационна връзка между прохепсидин и IL-6, което вероятно означава включване на допълнителни регулационни механизми при превръщането на предшественика прохепсидин в хормона хепсидин. Не се установява разлика в съдържанието на серумния прохепсидин между групите пациенти с ниско и нормално ниво на хемоглобина, което се потвърждава и от други автори (Kim et al., 2010; Emerah et al., 2014). Като нов показател за диагностика на анемията на хроничното възпаление при РА някои автори предлагат да бъде въведено определянето на серумния хепсидин (Pasricha, 2012; Lemos et al., 2010).

Нашите изследвания потвърждават данните на други автори, че провъзпалителните маркери CRP и IL-6 се свързват с промените в жлезния метаболизъм при заболяването РА, тъй като статистически значимо се повишават както при болните в сравнение с контролната група, така и в групата на пациентите с ниско ниво на хемоглобин спрямо тези с хемоглобин в норма (табл. 6). Известно е, че IL-6 има определена роля при РА, тъй като се експресира в изобилие в синовиалната течност на пациенти с това заболяване. IL-6 участва в автоимунния отговор чрез промяна в баланса между Th17- и Treg клетките. Производството на главния регулатор на жлезния метаболизъм, хепсидин, е един от ключовите системни ефекти на IL-6, което води до развитие на жлезен дефицит (Dayer, Choy, 2010). IL-6-хепсидиновата ос играе решаваща роля в анемията на възпалението, наблюдавана при много пациенти с РА (Dayer, Choy, 2010). Съвременни проучвания показват, че лечението на РА с цитокинови антагонисти има значително терапевтично отражение върху анемията в контекста на възпалението и увреждането на жлезния метаболизъм (Hashizume, Mihara, 2011; Raj, 2009; Wahle, 2012). Нашите резултати потвърждават участието на IL-6 едновременно в хипосидеремията (наличие на положителна корелационна зависимост със sTfR, а отрицателна със серумно желязо и хемоглобин) (табл. 3, 4) и във възпалителните нарушения и активността на заболяването РА (положителна корелация на IL-6 със СУЕ, CRP и DAS28) (табл. 5).

В проучването ни се установява достоверна отрицателна корелация между лактоферин и RF ($r=-0,238$, $p=0,014$) при болните от РА. Има данни, че лактоферинът играе различна роля при заболяванията чрез въздействие върху Th1/Th2 цитокиновия баланс в зависимост от имунния статус на болния. По такъв механизъм лактоферинът е способен да причини Th1 поляризация при заболявания, в които способността да се контролира инфекцията или туморното развитие зависи от силния Th1-отговор. Обратно, лактоферинът може да намали Th1 компонента при свръх развитие на възпалителния отговор. Лактоферинът може да бъде протектор при Th1- и Th2-индуцирани заболявания, такива като автоимунните и алергични заболявания, чрез

корекция в Th1/Th2 дисбаланса (Fischer et al., 2006). RF е автоантитяло, насочено срещу собствени IgG молекули, които сами по себе си също са антитела. Заедно с прицелния имуноглобулин, RF образува имунни комплекси, които могат да се докажат в циркулацията или ставната течност и които участват в патогенезата на РА. Отрицателната корелация между RF и лактоферин вероятно отразява ролята на лактоферина като „балансър“, който намалява Th1-отговорите при автоимунни заболявания (Fischer et al., 2006).

Разтворими рецептори – sTfR, sRAGE, sRANKL и OPG

В литературата има противоречиви данни за промените в серумните нива на разтворимите рецептори и патобиохимичното им значение при РА (Chen et al., 2009; Pullerits et al., 2005; Ziolkowska et al., 2002; Ghorbanhaghjo et al., 2014; Kolarz et al., 2003; Skoumal et al., 2008). Не е изяснена връзката на разтворимите рецептори с хомеостазата на желязо, въпреки че анемията е системна проява на заболяването РА. Нашето проучване си постави за цел да потърси взаимни връзки между серумните разтворими рецептори и показатели за основните характеристики на ревматоидния артрит и усложненията при протичането му, а именно, оценка на хомеостаза на желязото, възпалителна активност, автоимунни нарушения и костна деструкция.

Нашите резултати показват връзка между експресията на рецептори за трансферин и наличието на възпалителен процес при РА. Както беше посочено нивото на sTfR е значимо по-високо при пациенти с РА в сравнение с контролната група (табл. 2), но и в групата болни с повишено ниво на CRP спрямо тези с нормално ниво на CRP (табл. 11). При наличие на възпалителен процес (CRP>8), sTfR се променя пропорционално на серумната концентрация на прохепсидин, каквато зависимост не се наблюдава при пациентите с нормално ниво на CRP. Само при нормални стойности на CRP се установяват положителни корелационни зависимости на sTfR със CRP, DAS28, RF и антиCCP антитела, което вероятно означава съхранени механизми на белтъчна биосинтеза при ниска степен/отсъствие на възпалителен процес (табл. 12).

Проучването ни илюстрира връзка между необходимостта от желязо при РА, преценена чрез sTfR, и показатели на възпалителния процес. Откриват се положителни корелационни връзки между sTfR и възпалителните маркери CRP, IL-6 и СУЕ само в групата пациенти с нормално ниво на хемоглобина. Това вероятно показва, че при наличие на анемия с повишаване съдържанието на CRP, IL-6 и СУЕ се нарушават способностите на клетките да си осигурят набавянето на желязо. Положителните корелации между sTfR и маркерите за хроничен възпалителен процес губят своята статистическа значимост вероятно поради изчерпване на възможностите на клетките да експресират рецептори за трансферин (табл. 14). При групата болни с ниско ниво на хемоглобин освен това се наблюдава отрицателна корелация между sTfR и феритин, което потвърждава този факт – хемопоезата като първа линия на защита си

осигурява желязо, при задълбочаване на дефицита му, спада нивото на хемоглобина. Това отговаря на ситуации, когато се освобождава като острофазов белтък феритин, а клетките нямат потенциал да осигуряват рецептори за трансферин, доставящ вътреклетъчно желязо.

Подобни разсъждения са направени и от други автори, което подчертава ползата от количественото определяне на sTfR за разграничаване на ACD от IDA (Kuvibidila et al., 1995). Според някои автори съдържанието на sTfR не се променя при ACD, в контраст с нивата на серумния феритин и трансферин. Разликата в нивото на sTfR при недостиг на желязо (повишено) спрямо анемия на хроничното възпаление (не се увеличава) е интригуваща. В двата случая еритроидните прекурсори съществуват при хипоферемични условия и въз основа на покачване на масата на TfR при недостиг на желязо, може да се очаква подобен ефект и при ACD. В действителност при ACD нивото на sTfR остава в рамките на нормалното при последващите разстройства, което се дължи на потискане на вътреклетъчното производство на TfR от възпалителни цитокини (Kim, Ponka, 2000). Измерването на sTfR е изключително ценно, когато ACD е комбинирана с IDA. В тази ситуация нивото на sTfR е повишено, което показва, че недостигът на желязо е налице, докато измерването на феритин и трансферин не е информативно, тъй като нивата им се променят при наличие на възпаление (Wians et al., 2001). Според Masson ACD протича с понижени нива на sTfR, което я отличава от анемията, предизвикана от недостатъчен прием на желязо с храната (Masson, 2011). Нашите изследвания подкрепят това, тъй като нивото на sTfR статистически значимо се понижава в групата пациенти с ACD спрямо тази с комбинирана анемия ACD+IDA (табл. 13). Именно при ACD се открива положителна взаимовръзка между sTfR и възпалителните маркери - CRP, IL-6, СУЕ, костните и автоимунни нарушения - sRANKL, RF, антиССР антитела (табл. 14). Това потвърждава, че sTfR е чувствителен показател за разграничаване на двата вида анемия. Установява се и положителна корелационна връзка на sTfR със серумния феритин само в групата с комбинирана анемия, но не и в групата с ACD. Вероятно тази корелация губи статистическата си значимост при анемията на хроничното възпаление, защото феритинът поема функцията си на острофазов белтък (табл. 14).

RAGE е замесен в патогенезата на РА чрез неговата способност да усилва възпалителните процеси (Sunahori et al., 2006). RAGE и лигандите му са включени в активиране на остеокластите и ремоделиране на костите (Zhou, Xiong, 2011). sRAGE може да попречи на провъзпалителните ефекти на RAGE сигнализацията, като действа като примамка за отстраняване/обезвреждане на циркулиращите лиганди (Yonekura et al., 2003). Chen и др. докладват, че не наблюдават разлика в нивото на серумния sRAGE при РА и здрави индивиди (Chen et al., 2009). В друго изследване серумното ниво на sRAGE е значимо по-високо при болни от РА в сравнение

с контролна група, като има значими положителни корелации между нивото на sRAGE и активността на заболяването, CUE и CRP (Jafari Nakhjavani et al., 2018). В нашето проучване също се установява достоверно по-високо серумно ниво на sRAGE при пациенти с РА в сравнение със здрави доброволци (фиг. 3). Точно обратното, в изследването на Pullerits и сътрудници пациентите с РА показват значимо понижаване в нивата на серумния sRAGE спрямо контролната група. Те намират значимо по-високо ниво на sRAGE в синовиалната течност на пациенти с РА, лекувани с метотрексат, в сравнение с пациенти, без лечение с болест-модифициращи антиревматологични средства (Pullerits et al., 2005). Mokbel и др. също намират, че нивата на sRAGE са значимо по-ниски при пациенти с РА и това намаляване корелира с параметрите за активност на заболяването (Mokbel et al., 2011). Тези различия в литературата породиха интереса ни към търсене на точното място на sRAGE като маркер, доставящ полезна информация в състоянието на анемията на възпалителния процес при РА.

Нашите изследвания показват, че sRAGE се проявява като показател, чувствителен към разпределението на пациентите с РА в зависимост от наличието на възпаление, оценено по нивото на CRP и вида на анемията, оценена чрез sTfR-F индекс. sRAGE има статистически значимо по-високи стойности при болните от РА с CRP > 8 и с sTfR-F индекс > 1,5 (ACD+IDA), но няма достоверна разлика в средните стойности на sRAGE между групите пациенти, разделени според нивото на хемоглобина. Това вероятно показва връзката на sRAGE с повишената възпалителна активност и също така отразява по-тежкото състояние на анемията на хроничния възпалителен процес, комбинирана с чист дефицит на желязо (табл. 11, 14).

Тъй като RAGE инициира клетъчни сигнали на окислителния стрес, ние считаме, че повишените серумни нива на sRAGE и sTfR при РА вероятно отразяват наличието на адаптивен механизъм при окислителен стрес клетките едновременно да експресират sRAGE (отстраняващи променените при окислителен стрес белтъчни молекули) и рецептори за трансферин (осигуряващи желязо).

В литературата няма проучвания дали има взаимозависимост между експресията на рецептори за трансферин (TfR) и за гликирани белтъци (RAGE). Нивата на разтворимите форми на тези рецептори корелират с количеството на мембранносвързаните рецептори (Hambidge, 2003). Ние намираме достоверна отрицателна корелация между sTfR и sRAGE при здравите доброволци (табл. 8). Вероятно обяснение е, че при отсъствие на възпалителен процес има нормална експресия на TfR, но много ниско съдържание на sRAGE, тъй като RAGE е рецептор с повишена експресия при патологични състояния. Напротив, при пациентите с РА докладваме за първи път за положителна корелационна зависимост между sRAGE и sTfR, което показва еднопосочен отговор, с повишено образуване на двата вида рецептора при хроничния възпалителен процес и необходимостта на

клетките от желязо (табл. 8). Прави впечатление, че положителната корелация на sRAGE с sTfR се запазва независимо от стойностите на CRP и sTfR-F индекс, което също е в полза на твърдението, че тази връзка е от съществено биологично значение при заболяването РА (табл. 12, 15).

Нашите резултати показват sRAGE като участник в анемията на хроничния възпалителен процес, тъй като се установяват положителни корелационни връзки на sRAGE с прохепсидин и IL-6 (индуктор на синтеза на хепсидин) при пациентите с РА, каквито отсъстват при здравите индивиди (табл. 8), но се запазват в именно в групата болни с sTfR-F индекс < 1,5 (ACD), (табл. 15). Такова предположение е изказано преди около 20 години като авторите посочват sRAGE като свързващо звено между хипоферемията и възпалението, тъй като провежда сигнални пътища на възпалението (Huttunen et al., 1999).

Специфичното участие на sRAGE в патобиохимичните механизми на РА проличава от достоверните корелационни връзки, които се установяват в нашето изследване само при болните от РА, но не и при здравите доброволци. В подкрепа на участието на sRAGE във възпалителния процес при РА е и наблюдаваната положителна корелационна зависимост с CRP, каквато не е намерена при контролната група (табл. 8). Известно е, че IL-6 увеличава експресията на хепсидин, който регулира рециклирането и усвояването на желязо, като води до анемия (Daye, Chou, 2010).

Автоантителата са един имунологичен фактор, който значително участва в етиологията на РА. Достоверните положителни корелации на sRAGE със специфичните утвърдени показатели - RF и антиCCP антитела вероятно показва участие на sRAGE в патобиохимичните механизми на заболяването РА (фиг. 4). Корелационните зависимости на sRAGE с RF и антиCCP антителата се установяват само при пациентите с нормално ниво на хемоглобин, което предполага, че повишението на sRAGE е адаптивен механизъм, свързан с хомеостазата на желязо (табл. 15).

Има проучвания, които предоставят доказателства за участието на RAGE в костното ремоделиране. Изглежда, че RANKL стимулира експресията на RAGE, което се отразява на развитието на остеокластите и изключването на RAGE отслабва RANKL-медираната диференциация на остеокластите (Zhou, Xiong, 2011; Asadipooya, Uy, 2019). Ние потвърждаваме тази връзка като наблюдаваме достоверна корелационна зависимост между двата показателя при болните от РА. За разлика от контролната група при пациентите се открива висока положителна корелация между sRAGE и sRANKL, които използват общ сигнален път с участието на NF-κB, свързан с възпалителни нарушения и костна деструкция (табл. 8). Положителната корелационна зависимост между sRAGE и sRANKL се запазва независимо от стойностите на CRP и нивото на хемоглобина и само при болните с sTfR-F индекс < 1,5. Това показва, че взаимната връзка между окислителните промени (sRAGE) и костната

деструкция (sRANKL) се проявява само при пациенти с анемия на хроничния възпалителен процес (sTfR-F индекс<1,5), но губи своята статистическа значимост при усложненото протичане на комбинираната анемия (sTfR-F индекс>1,5), (табл. 12, 15).

В нашето проучване се установява, че съдържанието на sRANKL е достоверно по-високо при болните от РА в сравнение с контролната група, което е очаквано, защото RANKL е мембранен рецептор, провеждащ сигнали, които водят до деструкция на костите. Това се потвърждава и от други автори (Ziolkowska et al., 2002; Fadda et al., 2015; Xu et al., 2012). Ellabban и др. също намират, че в групата с РА серумното ниво на RANKL е значимо по-високо от това при здравите индивиди, но не корелира с активността на заболяването (Ellabban et al., 2012).

Подобно на sRAGE, sRANKL също се оказва показател, чувствителен към разпределението на пациентите с РА по групи, като се увеличава при наличие на възпалителен процес (CRP>8) и при комбинация от ACD+IDA (sTfR-F индекс>1,5) (табл. 11, 13). Разпределението на болните според нивото на хемоглобина не води до значима разлика в нивото на sRANKL. Това показва, че sRANKL е маркер, който проявява чувствителност към възпалението и към типа анемия.

За първи път в литературата се установява, че при РА sTfR запазва положителна корелационна връзка не само с sRAGE, но и с sRANKL, независимо от разделянето на пациентите според нивото на CRP, sTfR-F индекс и хемоглобина (табл. 12, 14). Вероятно това е израз на съществени взаимно поддържащи се механизми на адаптация на хомеостазата на желязото, възпалението и костните промени в процеса на развитие на РА. Тези резултати показват, че независимо от CRP, при болните от РА клетките защитават потребностите от желязо и образуват рецептори за трансферин, успоредно с провъзпалителните сигнали, опосредствани от експресията на RAGE и RANKL.

Връзката на sRANKL с хомеостазата на желязото при РА се вижда и от проявената положителна корелационна зависимост между sRANKL и прохепсидин, която отсъства при контролната група (табл. 9). Тази корелация се наблюдава само при пациентите с ниско ниво на хемоглобина (табл. 16), което потвърждава посочената зависимост. Предполагаме, че не само sRAGE, но и sRANKL вероятно отразява недостига на желязо, който се развива при повишаването на IL-6 и прохепсидин (предшественик на хепсидин) при болните от РА.

С-реактивният протеин (CRP) е един от биомаркерите за диагностициране и оценка на активността на заболяването РА. CRP е не само страничен продукт на възпалителния отговор, но играе провъзпалителна и протромботична роля (Kim et al., 2015). CRP стимулира производството на RANKL в моноцити и индуцира диференциацията на остеокластите от моноцити и костната резорбция, при липсата на RANKL. Така CRP играе важна роля в процеса на костно разрушение при РА (Kim et

al., 2015). Ние потвърждаваме връзката между sRANKL и CRP с установената положителна корелация между тях при пациентите с РА и липсата ѝ при контролната група (табл. 9). Hein и др., също докладват за значима положителна корелация, но между синовиалния sRANKL и CRP, както и СУЕ при РА (Hein et al., 2008).

В нашето изследване се проявява достоверна положителна корелационна зависимост и между sRANKL и IL-6 при болните от РА, но не и в контролната група (табл. 9). В изследването на Oelzner и др. се наблюдава положителна корелация между IL-6 и активността на заболяването РА, но такава липсва при sRANKL и OPG (Oelzner et al., 2007), за разлика от нашето проучване. Oelzner и др. посочват критичното значение на IL-6 транс-сигнализацията за увеличаване на съотношението RANKL/OPG и на костната резорбция в серуми на жени след менопауза, с РА. Правят извода, че инхибирането на IL-6 транс-сигнализация може да представлява ефективна защита на костта (Oelzner et al., 2012).

В проучването ни се установяват статистически значими положителни корелационни зависимости на sRANKL с утвърдени клинични показатели като DAS28, СУЕ, RF и антиССР антителя при пациентите с РА (фиг. 5). Това представя sRANKL като надежден показател за костна деструкция, отразяващ автоимунните нарушения и активността на заболяването РА.

Skoumal и др. намират отрицателна корелация между OPG и RANKL в синовиална течност на пациенти с РА (Skoumal et al., 2005). В нашето изследване също се открива отрицателна корелационна зависимост между sRANKL (стимулатор на костната резорбция) и OPG (протективен разтворим рецептор срещу костна деструкция) в серума, но при контролната група (табл. 9). Тази корелация няма статистическа достоверност при РА, което вероятно касае нарушения в нормалните механизми на регулация.

В нашето проучване серумното ниво не само на sRANKL, но и на OPG, е статистически значимо по-високо при пациентите с РА в сравнение със здравите доброволци, което вероятно е протективен механизъм (фиг. 3). Тези данни съвпадат с проучването, проведено от Ziolkowska и сътрудници, в което са изследвани серуми, получени от 43 болни от РА и 30 здрави индивиди. Те съобщават за значително по-високи серумни нива на OPG и sRANKL при РА спрямо контролната група, които се нормализират след анти-TNF- α лечение (Ziolkowska et al., 2002). Други автори също установяват, че нивата на OPG в серума на болни от РА са повишени в сравнение с контролната група (Ghorbanihaghjo et al., 2014, Kolarz et al., 2003). Skoumal и др. показват повишени серумни нива на OPG, но нормални нива на sRANKL при пациенти с дългогодишен РА (Skoumal et al., 2008). В проучването на Fadda и др. и Xu и др. при болните от РА се наблюдават значимо по-високи серумни нива на RANKL, но по-ниски серумни нива на OPG в сравнение със здравите индивиди (Fadda et al., 2015, Xu et al., 2012). Те правят извода, че при пациенти с РА, промени в системата на

OPG/RANKL водят до повишаване на sRANKL и намаляване на OPG в периферната кръв, което може да допринесе за загубата на костна плътност и генерирането на остеопороза. Fadda и др. намират несигнификантна корелация между OPG, RANKL, съотношението OPG/RANKL и показателите за активност на заболяването DAS28 и CUE (Fadda et al., 2015). Изследването, проведено от Vanderborght и колеги, в което са били включени 17 пациенти с хроничен РА, 14 пациенти с ранен РА, 8 пациенти с ОА, и 17 здрави доброволци, също сочи, че нивата на иРНК за RANKL са били значително по-високи в периферната кръв на пациенти с ранен и хроничен РА в сравнение с контролната група, докато нивата на иРНК за OPG са по-ниски (Vanderborght et al., 2004). Друго проучване също установява повишена концентрация на RANKL и намалена концентрация на OPG, но в синовиалната течност на пациенти с РА (Kotake et al., 2001).

Противоречивите данни в литературата вероятно могат да бъдат обяснени с разликите във възрастовия диапазон на пациентите, размера на извадката, тежестта и продължителността на заболяването, вида на лечението, които не са сравними между различните проучвания.

За първи път в нашето изследване се установява връзка между OPG и показатели на хомеостазата на желязо - серумно желязо и феритин (табл. 10). Съществува достоверна отрицателна корелационна зависимост между OPG и серумно желязо при болните от РА, която не се наблюдава в контролната група (табл. 10). Тази връзка предполага, че понижението в серумното желязо стимулира експресията на OPG като протектор на костта при хипоферемията на възпалителния процес. Концентрацията на OPG отговаря на съдържанието на депонираното желязо под формата на феритин. Това се вижда от значимата положителната корелация между OPG и феритин, при здрави индивиди и болни от РА (табл. 10) и отразява зависимостта на костообразуването от резервите на желязо в организма. OPG се експресира в отговор на възпалителен процес, тъй като се открива положителна корелационна зависимост със CRP и IL-6 при пациентите с РА, която губи статистическата си значимост при контролната група (табл. 10). Kolarz и др. също докладват за значима корелация на серумния OPG със CRP, но и със CUE и RF (Kolarz et al., 2003). В общата група болни от РА не се установяват корелационни връзки на OPG със специфичните показатели за нарушения при РА. Нашите резултати съответстват с проучването, проведено от Ghorbanihaghjo и др., които също намират несигнификантна корелация между нивото на OPG и DAS28 (Ghorbanihaghjo et al., 2014).

OPG показва чувствителност към разделянето на болните от РА според нивото на sTfR-F индекс, тъй като се наблюдава тенденция за повишаването му в групата с ACD ($p=0,053$) спрямо тази с комбинирана анемия (табл. 13). При разпределението на пациентите с РА по групи според CRP, sTfR-F индекс и нивото на хемоглобина се намери положителна корелация на OPG със sTfR в групата с sTfR-F индекс < 1,5 (ACD). Това

вероятно е израз на адаптивен механизъм на костообразуване (OPG) в резултат на повишени нужди от желязо (sTfR) при анемията на хроничния възпалителен процес. Наблюдава се положителна корелационна зависимост между OPG и феритин само при нормално ниво на CRP и не се открива при наличие на възпалителен процес (CRP>8), когато феритинът служи като острофазов белтък (табл. 12). Отрицателната корелация между OPG и серумно желязо се проявява при нормално ниво на хемоглобина и sTfR-F индекс<1,5 (табл. 17). Подобна корелационна зависимост е показателна за приспособяване на костообразуването към анемията на хроничния възпалителен процес, проявяваща се с понижена доставка на желязо и запазена еритропоеза (нормални нива на хемоглобина). OPG свързва специфичните нарушения при РА с анемията на хроничното възпаление (sTfR-F индекс<1,5), тъй като се наблюдава положителна корелация на OPG с RF и DAS28 само в тази група пациенти (табл. 17), но не и в общата група болни. При sTfR-F индекс>1,5 отсъства подобна корелация, което вероятно съответства на по-тежката клинична картина при комбинирания тип анемия.

В нашето изследване се установява положителна взаимовръзка между нивото на OPG и възрастта, както при пациентите с РА, така и при здравите доброволци (табл. 10). Това отчасти се припокрива с публикуваното от Ziolkowska и сътрудници, които намират силна положителна корелация между концентрацията на OPG и възрастта, но само при контролната група, за разлика от Ghorbanihaghjo и др, които наблюдават, че възрастта корелира положително с OPG именно при пациентите с РА (Ziolkowska et al., 2002; Ghorbanihaghjo et al., 2014). Fadda и др. откриват взаимовръзка между възрастта и нивото на RANKL (Fadda et al., 2015), а това съответства с проучването на Wisowska и др. които съобщават, че нивата на OPG и RANKL са свързани с възрастта на пациентите (Wisowska et al., 2009).

Ултрасонографски параметри

В клиничната практика ултрасонографските методи се явяват прецизни и информативни по отношение диагностиката и проследяването на ставната деструкция при заболяването РА. Поради това за проучването ни представляват интерес взаимовръзките между показателите на желязна обмяна, възпаление, костни и автоимунни нарушения и параметрите от ултрасонографските изследвания.

Нашите резултати показват, че ултрасонографските показатели корелират с някои биомаркери на хомеостазата на желязото. Установява се положителна корелационна зависимост между ултрасонографските параметри и феритина и отрицателна - между тях и sTfR-F индекс, TIBC и UIBC. Наблюдава се и статистически достоверна положителна корелация между Power Doppler и активността на заболяването DAS28, което е очаквано. Следователно изследването на разтворимите рецептори, sTfR, sRAGE, sRANKL и OPG, вероятно улавя по-детайлно промените в хомеостазата на желязото, възпалението и автоимунните нарушения при заболяването РА, тъй като се установяват множество корелационни зависимости между тях в сравнение с ултрасонографските параметри.

Сравнителна оценка на някои показатели на желязна хомеостаза и възпаление при ревматоиден артрит и диабет

Диабетът и РА имат различна етиология и клинична картина, но и двете заболявания протичат с възпалителен процес, окислителен стрес, хипертония, сърдечносъдови усложнения и атеросклероза (Okamoto et al., 2008, Stamatelopoulos et al., 2009). Във връзка с това за нашето проучване представлява интерес сравняване на съдържанието на някои показатели на хомеостаза на желязо и възпаление при пациенти с диабет и РА.

При диабет за разлика от РА има слаб хроничен възпалителен процес. RAGE играе съществена роля в инициране на възпалителен процес и активиране на ендотела, което е предпоставка за развитие на атеросклероза при пациенти с диабет и РА (Vazzana et al., 2009). Този рецептор е с повишена експресия при диабет и РА като провежда сигнали на възпалението и окислителния стрес (Murdaca et al., 2012, Vazzana et al., 2009).

sRAGE, ендогенно секретирани или протеолитично отцепени от мембранната форма на рецептора, упражнява протективни ефекти, като блокира сигналите на RAGE. Ниски нива на sRAGE в плазмата корелират с влошаване на основния болестен процес при диабет (McNair et al., 2009) и РА (Pullerits et al., 2005) и са съчетани с коронарна болест и настъпване на инфаркт на миокарда (Murdaca et al., 2012).

Получените от нас данни ясно показват, че при пациентите с диабет и РА има статистически достоверно увеличение в експресията на RAGE спрямо контролната група, преценена по серумните нива на разтворимия рецептор. Този показател вероятно би бил полезен за мониторинг и ранно улавяне на промяна в активността на болестния процес, тъй като намалените нива на sRAGE са белег за влошаване състоянието на болните (McNair et al., 2009).

Получените резултати показват, че CRP се явява чувствителен показател, отразяващ възможностите на клетката да експресира желязо-свързващи белтъци. При нормално ниво на CRP се запазва отговорът на клетката да реагира с повишена експресия на RAGE, като следствие на хипергликемията и на sTfR – в отговор на адаптивната хипосидеремия при диабет. Единствено в групата пациенти с диабет и отсъствие на възпалителен процес, преценено по съдържанието на CRP, се намира статистически достоверна корелация между sRAGE и sTfR (фиг. 10), което показва, че адаптивните коригиращи механизми се включват, когато е овладян възпалителният процес.

Хипергликемията е свързана с нарушения, които активират клетъчни сигнали, водещи до експресия на медиатори на възпалението. При поддържания хронично слаб възпалителен процес при диабет, като адаптивен отговор се проявява патологично отклоняване на серумното желязо във феритиновите депа и възникване на железен дефицит. Той протича с повишена тъканна експресия на рецептори за трансферин, както и с повишена серумна концентрация на разтворимия трансферинов рецептор (Ganz, Nemeth, 2009). В нашето изследване се установява

статистически значимо по-високо ниво на sTfR при пациентите с диабет спрямо контролната група, както и при болните от РА спрямо здравите доброволци (табл. 2, фиг. 6). Наблюдава се тенденция за повишаване на концентрацията на sTfR при РА в сравнение с диабет ($p=0,054$). Това вероятно отразява по-висока степен на дефицит на желязо при хроничния автоимунен възпалителен процес при РА и поради това по-висока експресия на TfR в сравнение с болните от диабет. Вероятно при диабет са запазени адаптивните възможности за контрол върху хомеостазата на желязото в сравнение с РА. Това се вижда и от намерената статистически значима отрицателна корелация между sTfR и феритин при диабет, каквато отсъства при РА. Такава корелационна зависимост се открива и в изследването на Fernández-Real, които също установяват достоверно повишени нива на sTfR и феритин при пациенти с влошен глюкозен толеранс (Fernández-Real et al., 2007). За повече яснота при тълкуване на взаимовръзките на феритина с останалите показатели, параметърът беше изследван след разделяне на пациентите с диабет според нивото на CRP. В групата с нормално ниво на CRP се запазва отрицателната корелация между феритин и sTfR (фиг. 10), а се губи статистическата значимост в групата с повишен CRP (фиг. 11). Това говори, че при отсъствие на възпалителен процес, феритинът изпълнява роля единствено на депо за желязото, тъй като не се установява корелационна зависимост със CRP. Нашите резултати потвърждават, че при диабет нивата на феритина отразяват степента на възпаление, тъй като се наблюдава положителна корелация между стойностите на феритин и CRP при пациентите с повишен CRP (фиг. 11), която се запазва и в цялата група болни от диабет. Други автори също изказват предположението, че повишените нива на феритин при диабет тип 2 се дължат на възпалителни механизми, а не на натрупване на желязо (Hernández et al., 2005).

Нивото на лактоферин (неспецифичен фактор на имунитета и желязо-транспортен белтък) е по-високо при пациентите с диабет в сравнение с болните от РА, като разликата е статистически значима ($p<0,0001$). Пониското съдържание на лактоферин при РА в сравнение с диабет вероятно касае непрекъснатата му секреция от специфичните гранули на неутрофилите при фагоцитоза, което изчерпва адаптивните възможности на клетката за белтъчна биосинтеза на лактоферин при пациенти с РА.

Нашите резултати показват, че при болните от диабет се установява достоверна отрицателна корелационна връзка между sRAGE и лактоферин, която се проявява като общ феномен и при пациенти с нормален, и при тези с повишен CRP (фиг. 10, 11). Такава корелационна зависимост не се наблюдава при болните от РА, вероятно защото лигандите на sRAGE се различават при двете заболявания. Известно е, че при болни от диабет основните лиганди на RAGE са AGE, известни като продукти от хипергликемия, докато при РА са свърхекспресирани и други лиганди за RAGE. Такива са HMGB-1, мощен проинфламаторен цитокин и S100/калгранулини, свързани с продукцията на автоантитела и съдов риск (Sparvero et al., 2009; Chen et al., 2009).

IV.3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашето проучване са изследвани взаимовръзките в промените на желязната хомеостаза с възпалението, костната деструкция, автоимунните и окислителни нарушения при РА. Едновременното определяне на двойката показатели – растворим трансферинов рецептор и прохепсидин се явява най-информативно за оценка на хомеостазата на желязо при РА. Когато нивата на sTfR и прохепсидин са повишени се получава информация за тъканен недостиг на желязо (оценен по нивото на sTfR), причина за който е възпалителният процес, съпроводен с експресия на прохепсидин. Потвърждение на това становище е съществуващата положителна корелационна зависимост между двата показателя, само при болните от РА, но не и при контролната група.

Положителните корелационни зависимости на sTfR, sRAGE и sRANKL със специфични диагностични биомаркери за РА предполагат, че тези растворими рецептори участват в патогенезата на заболяването и могат да бъдат връзка между дефицита на желязо, автоимунните нарушения и активността на заболяването. Нашите данни предполагат, че OPG е свързан с метаболизма на желязото като неговата експресия се увеличава в отговор на възпаление. Получените резултати предоставят възможност за практическо използване на изследваните растворими рецептори в мониторинга и отчитането на усложненията при РА.

V. ИЗВОДИ

1. Повишеното серумно ниво на sTfR, прохепсидин, CRP, IL-6, sRAGE, sRANKL и OPG и намаленото ниво на серумно желязо спрямо контролната група показват едновременно наличие на желязен дефицит, възпалителен процес и костна деструкция при пациенти с ревматоиден артрит.
2. Установените нови положителни взаимовръзки на sTfR, sRAGE и sRANKL както помежду им, така и с маркери на анемия на хроничното възпаление (IL-6, прохепсидин) и автоимунни нарушения (RF, антиCCP антитела) представят тези разтворими рецептори като надеждни показатели за паралелна оценка на желязен дефицит, възпалителен процес, автоимунни нарушения и костна деструкция при ревматоиден артрит.
3. Едновременното определяне на двойката показатели разтворим трансферинов рецептор и прохепсидин е най-информативно за оценка на хомеостазата на желязо при ревматоиден артрит.
4. По-високото серумно съдържание на OPG вероятно е адаптивен механизъм за съхранение на костите в отговор на хипосидеремия и депониране на желязото като феритин при ревматоиден артрит.
5. Получените резултати представят IL-6 едновременно като маркер за възпалителна активност и като полезен показател за оценка на риска от настъпване на анемия при ревматоиден артрит.
6. Взаимовръзките между показатели на хомеостазата на желязото и ултрасонографските параметри показват едновременно настъпване на желязен дефицит и деструктивни промени при ревматоидния артрит.
7. Във връзка с различията на възпалителния процес при ревматоиден артрит и диабет се наблюдават специфични изменения в желязния статус.

VI. ПРИНОСИ

➤ с оригинален характер:

1. Проведено е обстойно проучване върху голяма група пациенти с РА и здрави доброволци, като за първи път комплексно са изследвани показатели на желязна хомеостаза (sTfR, феритин, серумно желязо, общ и ненаситен желязосвързващ капацитет, лактоферин, прохепсидин), възпалителна активност (sRAGE, CRP, IL-6, СУЕ), костни и автоимунни нарушения (sRANKL, OPG, RF, антиCCP антитела, DAS28).
2. За първи път в едно системно проучване са изследвани взаимовръзките в промените на желязната хомеостаза с възпалението, костната деструкция, автоимунните и окислителни нарушения при РА, като са съпоставени критично получените резултати за стойността на изследваните показатели с наличните противоречиви данни в литературата.
3. Намерени са нови взаимовръзки между изследваните показатели, които допринасят за изясняването на патобиохимичните механизми на желязната обмяна, възпалението, костните и автоимунни нарушения при РА.
4. Проведено е сравнително изследване на промени в хомеостазата на желязото при диабет и ревматоиден артрит и за първи път са установени характерни особености, свързани с различните патобиохимични механизми при двете заболявания.

➤ с научно-приложен характер:

1. Изследваните разтворими рецептори биха могли да намерят приложение за ранно улавяне и мониторинг на системни усложнения при ревматоиден артрит, тъй като обединяват различни патобиохимични характеристики на заболяването.

НАУЧНИ ТРУДОВЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

Публикации:

1. **Stefanova K**, Delcheva G, Stankova T, Maneva A, Selimov P, Karalilova R, Batalov A. sRANKL, OPG and sRAGE as markers of bone metabolism in rheumatoid arthritis: relation to indicators of impaired iron homeostasis and inflammation. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*. IF₂₀₁₈=0.321. (под печат)
2. **Stefanova KI**, Delcheva GT, Maneva AI, Batalov AZ, Geneva-Popova MG, Karalilova RV, Simitchiev KK. Pathobiochemical Mechanisms Relating Iron Homeostasis with Parameters of Inflammatory Activity and Autoimmune Disorders in Rheumatoid Arthritis. *Folia medica* 2018, Vol.60, No. 1, pp. 124-132.
Stefanova KI, Delcheva GT, Maneva AI, Batalov AZ, Geneva-Popova MG, Karalilova RV, Simitchiev KK. Pathobiochemical Mechanisms Relating Iron Homeostasis to Parameters of Inflammatory Activity and Autoimmune Disorders in Rheumatoid Arthritis. *Folia Medica* 2016, Vol.58, No. 4, pp. 257-263.
3. **Stefanova K**, Delcheva G, Maneva A, Batalov A, Geneva-Popova M, Karalilova R, Iliev D, Orbetzova M. Comparative evaluation of some parameters of iron homeostasis in diabetes and rheumatoid arthritis. *Folia Medica* 2015, Vol.57, Suppl.1, pp. 60.
4. **Stefanova K**, Delcheva G, Maneva A, Iliev D, Deneva T, Orbetzova M. Iron deficiency in patients with diabetes: Correlation between soluble transferrin receptor, ferritin and soluble transferrin receptor – ferritin index. *Trakia Journal of Sciences, Series Biomedical Sciences*, 2014, Vol.12, Suppl. 1, pp. 46-49.

Цитирана публикация:

Stefanova KI, Delcheva GT, Maneva AI, Batalov AZ, Geneva-Popova MG, Karalilova RV, Simitchiev KK. Pathobiochemical Mechanisms Relating Iron Homeostasis with Parameters of Inflammatory Activity and Autoimmune Disorders in Rheumatoid Arthritis, *Folia medica*

Цитирана от:

1. Douglas B. Kell and Ethersia Pretorius, No effects without causes: the Iron Dysregulation and Dormant Microbes hypothesis for chronic, inflammatory diseases. *Biological Reviews*, 2018, 93(3), 1518-1557. IF=11.615
2. Haithem A. Al-Rubaie, Israa M. Al-Bayaa, Yassmin A. Al-Amiri, The value of soluble transferrin receptor and soluble transferrin receptor-ferritin index in discriminating iron deficiency anaemia from anaemia of chronic disease in patients with rheumatoid arthritis, *Open Rheumatology Journal* 2019, 13(1), 9-14.
3. Jéssica Valadas, Vitória Foigt, Wagner de Aguiar Raupp, Thiago Aley Brites de Freitas, Liane Rotta, Correlação entre os resultados de proteína C-reativa e velocidade de hemossedimentação (Correlation between results of C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate), *Revista de Atenção à Saúde*, 2019, 17, 60.
4. Yuting Chen, Wei Xu, Hui Yang, Ming Shao, Shanshan Xu, Jixiang Deng, Xing Gao, Huanhuan Liu, Zongwen Shuai, Shengqian Xu, Faming Pan, Serum Levels of Hepcidin in Rheumatoid Arthritis and Its Correlation with Disease Activity and Anemia: A Meta-analysis, *Journal Immunological Investigations*, 2020 Mar 26, 1-16, doi: 10.1080/08820139.2020.1742731.

5. Anatole Besarab, Tilman B Druke, The Problem With Transferrin Saturation as an Indicator of Iron 'Sufficiency' in Chronic Kidney Disease, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2020 Apr 17, gfaa048. doi: 10.1093/ndt/gfaa048.
6. Wojciech Tański, Mariusz Chabowski, Beata Jankowska-Polańska, Ewa Anita Jankowska, Iron metabolism in patients with rheumatoid arthritis, *Research square*, 2020, doi: 10.21203/rs.3.rs-29281/v1.

Участие в конференции и научни форуми:

1. Katya Stefanova, Ginka Delcheva, Ana Maneva, Anastas Batalov, Mariela Geneva-Popova, Rositza Karalilova, Dimitar Iliev, Maria Orbetzova, Comparative evaluation of some parameters of iron homeostasis in diabetes and rheumatoid arthritis, Anniversary Scientific Conference “Science for Health” 70 Years Medical University of Plovdiv, 20-22 May, 2015, Plovdiv.
2. Katya Stefanova, Ginka Delcheva, Ana Maneva, Dimitur Iliev, Tanya Deneva, Maria Orbetzova, Iron deficiency in patients with diabetes: Correlation between soluble transferrin receptor, ferritin and soluble transferrin receptor – ferritin index, International scientific conference, “1st Trakia Medical Days”, May 22-23, 2014, Stara Zagora.
3. Георги Нанов, Катя Стефанова, Гинка Делчева, Теодора Станкова, Павел Селимов, Модуляция на белтъци от сигнални пътища като мишена за терапия при ревматоиден артрит, *Наука и младост*, конкурсна сесия 2018, 30 март – 01 април, 2018, МУ – Пловдив.
4. Надежда Георгиева, Катя Стефанова, Теодора Станкова, Гинка Делчева, Системата тиоредоксин/тиоредоксин редуктаза (Trx/TrxR) при ревматоиден артрит, *Наука и младост*, конкурсна сесия 2016, МУ – Пловдив.
5. Александър Дончев, Катя Стефанова, Гинка Делчева, Адхезивни молекули и антиадхезивна терапия, Годишна конференция за студенти и млади учени, *Наука и младост*, 10-12 април 2014, МУ – Пловдив.
6. Елизар Цветков, Катя Стефанова, Гинка Делчева, Ана Манева, Разтворими клетъчни рецептори - механизми на образуване, биологични ефекти и приложение в терапията, Годишна конференция за студенти и млади учени *Наука и младост* 2013, 18-20 Април, 2013, МУ – Пловдив.

Благодарности към:

- Академичното ръководство на МУ – Пловдив за финансирането на Вътреуниверситетски проект НО-11/2013, позволил реализирането на това проучване;
- Научните ми ръководители проф. Ана Манева и проф. д-р Анастас Баталов за примера, професионализма, доверието и подкрепата;
- Колегите от катедра „Биохимия“ за подкрепата и приятелството.