

Министерство здравоохранения Российской Федерации
федеральное Государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ имени И.М. СЕЧЕНОВА
МИНЗДРАВА РОССИИ (Сеченовский Университет)

На правах рукописи

МАРКИНА МАРИНА МИХАЙЛОВНА

ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ АНЕМИИ НА РАННИХ СТАДИЯХ
ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК

14.01.29 – нефрология
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель: доктор медицинских наук,
профессор Милованов Ю.С.

Москва – 2018

Оглавление

Введение	4-12
Глава 1. Обзор литературы	
1. Общие сведения об анемиях: определение, классификация	13-15
1.1 Анемия – классическое осложнение хронической болезни почек (ХБП)	15-18
1.2. Патогенез анемии хронических заболеваний	18-22
1.2.1. Роль гепсидина в патогенезе обмена железа при анемии хронических заболеваний (АХЗ)	23-26
1.2.2. Роль интерферона γ (IFN- γ) в патогенезе обмена железа при АХЗ	27-28
1.2.3. Связь анемии и дефицита железа с изменениями циркулирующей формы белка Klotho	28-30
1. 3. Лечение АХЗ	30-31
Заключение	32
Глава 2. Клиническая характеристика больных и методы исследования	33-40
Глава 3. Результаты работы и их обсуждение	40
3.1. Частота анемии у больных хронической болезнью почек (ХБП) 1-2 стадий	40-43
3.2. Значение определения сывороточной концентрации белка Klotho (sKlotho) в оценке тяжести АХЗ у больных ХБП 1-2 стадий	44-46
3.3. Анализ особенностей метаболизма железа и особенности обмена железа у больных ХБП 1-2 стадий	46-48
3.4. Прогнозирования риска развития анемии у больных ХБП 1-2 стадий	48-53
3.5. Особенности терапии препаратами железа при АХЗ у больных ХБП 1-2 стадий	53-54
Клинические наблюдения	55-60

Обсуждение	61-69
Выводы	71
Практические рекомендации	72
Список работ, опубликованных по теме диссертации	73
Список, использованной литературы	74-82
Список сокращений	83
Приложения	83-113

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Большинство авторов главной причиной развития анемии при прогрессировании хронической болезни почек (ХБП) или хронической почечной недостаточности считают дефицит выработки эндогенного эритропоэтина [2, 4, 5]. Однако снижение гемоглобина у 10-20% больных начинается выявляться уже на ранних стадиях хронической болезни почек (ХБП) и до настоящего времени имеются лишь единичные публикации об особенностях ее диагностики и лечения [6-8].

Теоретический анализ существующих работ, посвященных данному исследованию, показал связь анемии у больных хронической болезнью почек (ХБП) с нозологической принадлежностью ХБП, в первую очередь гломерулонефритом (ГН) при системных заболеваниях (системная красная волчанка (СКВ), системные васкулиты)[16]. По мнению исследователей, обострение ГН или основного заболевания может приводить к цитокин-опосредованным нарушениям эритропоэза с развитием анемии хронических заболеваний (АХЗ) [3, 6, 8, 14]. Учитывая распространенность ХБП в популяции, встает вопрос о выявлении маркеров анемии хронических заболеваний (АХЗ) у этой категории больных, вклад АХЗ в прогрессирование хронической болезни почек (ХБП) и развитие ее осложнений. Роль их важна, как в отношении понимания механизмов формирования АХЗ у больных ХБП, так и для решения вопроса о рациональной тактики лечения.

Диагностика анемии хронических заболеваний (АХЗ) основывается на анализе особенностей метаболизма железа, свойственных этой форме анемии [6, 10, 14]. Нарушения метаболизма железа связаны главным образом с усилением его поглощения и задержкой клетками ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) с последующим ограничением поступления железа в костный мозг [3, 6, 10, 14].

В контроле за реутилизацией железа при АХЗ значение придают повышению синтеза печенью белка острой фазы воспаления – гепсидина-25 [6, 14-16, 24, 25].

Наряду с экспериментальными исследованиями в настоящее время появляются клинические работы показывающие роль циркулирующей формы белка Klotho (s-Klotho) как кардиопротективного фактора, вовлеченного в патогенез кардиоренальных взаимоотношений у больных хронической болезнью почек (ХБП) и анемией [4, 5, 9]. Публикаций о связи сывороточной концентрации Klotho с уровнем гемоглобина нами не обнаружено.

Анемия хронических заболеваний (АХЗ) требует ранней коррекции, особенно у пациентов с дополнительными факторами риска (ишемической болезнью сердца, заболеваниями легких, хронической болезнью почек). Клиницисту необходимо использовать все возможности ранней диагностики АХЗ, что позволит выбрать обоснованную стратегию ее лечения. Существует точка зрения, что лечение анемии может способствовать не только снижению частоты сердечно-сосудистых осложнений (ССО), но и снижению скорости прогрессирования ХБП, в этой связи коррекцию анемии можно рассматривать как основную часть программы ренопротективного лечения [4, 6, 9, 11].

Таким образом, до настоящего время не разработаны маркеры анемии хронических заболеваний (АХЗ) у больных для оценки вклада АХЗ в прогрессировании хронической болезни почек (ХБП) и развитие ее осложнений, что определяет необходимость совершенствования методов ранней диагностики и лечения АХЗ.

Цели исследования

Улучшение диагностики или результатов лечения анемии хронических заболеваний (АХЗ) у больных первичным гломерулонефритом (ГН) и ГН при системных заболеваниях на ранних стадиях хронической болезни почек (ХБП) за счет оценки маркеров иммунного воспаления по их влиянию на прогноз ХБП и развитие ССО

Задачи исследования

Поставленная цель реализуется посредством решения следующих задач: на ранних стадиях ХБП (1-2 стадии) в сравнении 2-х групп больных – первичным гломерулонефритом (ГН) и ГН при системных заболеваниях:

1. Проанализировать, обобщить и систематизировать работы, посвященные данной проблеме
2. Уточнить частоту АХЗ в зависимости от этиологии ХБП и клинических проявлений активности поражения почек - величины протеинурии, артериальной гипертензии, степени почечной дисфункции
3. Оценить выраженность (тяжесть) АХЗ в зависимости от показателей в сыворотке крови факторов иммунного воспаления - гепсидина, γ -интерферона
4. Определить вклад анемии в продукцию нефрокардиопротективного фактора – циркулирующей формы белка Klotho (s-Klotho), величину артериальной гипертензии и степень ремоделирования миокарда ЛЖ
5. На основе логистической регрессионной модели определить ранние предикторы развития АХЗ у больных
6. Установить возможность влияния снижения активности основного заболевания и ранней коррекции АХЗ на продукцию s-Klotho
7. Усовершенствовать алгоритм противоанемической терапии на основе изучения диагностики: гемоглобина, TSAT, s-Klotho, у больных на

ранних стадиях ХБП с АХЗ при первичном гломерулонефрите (ГН) и ГН при системных заболеваниях (СЗ)

Объект и предмет исследования:

Анемия хронического заболевания (АХЗ) у больных хронической болезнью почек (ХБП) 1-2 стадий при системных заболеваниях (СЗ) и сывороточные показатели иммунного воспаления (гепсидин-25, Клото, интерферон- гамма), соответственно.

Основные положения, выносимые на защиту

1. При первичном гломерулонефрите (ГН) и ГН при системных заболеваниях (СКВ, гранулематоз Вегенера) на ранних стадиях хронической болезни почек (ХБП) выявляется анемия, отвечающая критериям анемии хронических заболеваний (АХЗ), частота которой среди пациентов системными заболеваниями в 3,3 раза больше чем среди больных первичным ГН(41,7% против 12,7%, $p < 0,05$). Для больных с АХЗ характерно выявление биомаркеров активного иммунного воспаления – повышение сывороточного уровня интерферона- γ и гепсидина выше 25 пг/мл
2. Развитие АХЗ уже на ранних стадиях ХБП сопровождается снижением уровня циркулирующей формы белка Klotho (s-Klotho) с усилением артериальной гипертонии и степени ремоделирования ЛЖ – увеличением ИММЛЖ. Ранняя коррекция анемии с поддержанием целевого уровня гемоглобина (≥ 120 г/л) и железа (TSAT ≥ 20 %) позволяет обеспечить профилактику снижения продукции s-Klotho и формирования ГЛЖ
3. Критерием риска развития анемии хронических заболеваний (АХЗ) на ранних стадиях хронической болезни почек (ХБП) является повышение уровня гепсидина в сыворотки крови (выше 25 пг/мл). Выявление АХЗ

на ранних стадиях ХБП у больных гломерулонефритом свидетельствует о сохраняющейся активности нефрита и является показанием для оптимизации нефропротективной терапии (в том числе обсуждения необходимости усиления поддерживающей терапии иммунодепрессантами).

Научная новизна исследования

Научная новизна исследования заключается в следующем: разработан алгоритм диагностических и лечебных мероприятий у больных на ранних стадиях хронической болезни почек (ХБП) с анемией хронических заболеваний (АХЗ) при первичном гломерулонефрите (ГН) и ГН при системных заболеваниях, а также разработана патогенетически обоснованная тактика коррекции железодефицита у данных больных.

Впервые в отечественной клинической практике проведено изучение воспалительных цитокинов – гепсидина и интерферона γ у больных ХБП на ранних стадиях течения с учетом нозологической принадлежности ХБП и циркулирующей формы белка Клото (s-Klotho).

Показано, что сывороточные показатели гепсидина, интерферона γ и Klotho являются ранними маркерами АХЗ при хронической болезни почек (ХБП), их изменения начинаются уже с 1-2 стадий ХБП и персистируют по мере снижения СКФ. При этом повышение уровня интерферона γ , гепсидина и снижение Klotho в сыворотке крови опережает снижение сывороточной концентрации железа и % насыщения железом трансферрина по мере прогрессирования почечной дисфункции[80].

Обнаружена сильная связь тяжести анемии со снижением сывороточной концентрации белка Klotho, степенью повышения АД у больных с АГ, степенью ремоделирования миокарда левого желудочка сердца[81].

Показана возможность усиления продукции белка s-Klotho у данной категории больных при достижении целевого уровня гемоглобина (120 г/л)

путем воздействия на основное заболевание и коррекции железодефицита с помощью внутривенного введения железа.

Теоретическая и практическая значимость исследования:

Выбор методологии исследования предопределен уровнем развития медицинской науки в настоящее время. В ходе исследования применялись следующие методы: анализ теоретических аспектов изучения проблемы, изучение медицинской документации (историй болезни, выписки), сравнение (сравнительный анализ данных), обобщение. Для обработки и интерпретации эмпирического материала применялись методы статистической обработки полученных данных (критерий Манна-Уитни, корреляционный, многофакторный анализ) с использованием статистического пакета «SPSS».

На основании результатов проведенного исследования разработан алгоритм выявления анемии на ранних стадиях хронической болезни почек (ХБП) и усовершенствована тактика лечения анемии хронических заболеваний (АХЗ) у больных ХБП при первичном и вторичном гломерулонефрите (ГН), что позволяет уменьшить число осложнений, снизить уровень летальности, сократить сроки лечения, улучшить качество жизни и работоспособность.

В ходе исследования было показано, что у больных первичным ГН и ГН при системных заболеваниях уже на ранних стадиях хронической болезни почек (ХБП) (1-2 стадии) повышение сывороточного уровня факторов иммунного воспаления обуславливает развитие АХЗ. У больных ХБП с АХЗ, особенно выявляемой рано, наряду с определением маркеров почечного повреждения (протеинурией, артериальной гипертонией, скорость клубочковой фильтрации (СКФ)) необходимо исследовать сывороточный уровень синтезируемого печенью белка острой фазы воспаления гепсидина-25.

Снижение уровня гемоглобина < 120 г/л у этой категории больных следует рассматривать в качестве прогностического фактора риска снижения продукции нефрокардиопротективного белка s-Klotho, усиления систолического артериального давления с формированием гипертрофии левого желудочка (ГЛЖ) уже на ранних стадиях ХБП.

Степень разработанности проблемы

Проблемам повышения эффективности диагностики и лечения анемии хронических заболеваний (АХЗ) у больных хронической болезнью почек (ХБП) посвящены труды авторов: Андреичев Н.А., Балеева Л.В., Добросмыслов И. А., Масчан А.А., Румянцев А.Г., Рамеев В.В., Саркисова И.А., Чеботарева Н.В. В последние годы данной проблеме лечения АХЗ уделяли внимание Козловская Л.В., Милованов Ю.С., Милованова С.Ю. Определенное влияние на решение проблемы из зарубежных ученых оказали McMahon, Foley.

Их работы содержат фундаментальные основы по патогенетическим звеньям, клинико-морфологическим вариантам анемии хронических заболеваний (АХЗ). Их работы в значительной мере способствовали изучению АХЗ на поздних стадиях ХБП (3-4 стадии ХБП), тактики ведения больных препаратами железа и эритропоэтина. В этих работах отражен характер данной нозологии при наличии у больных таких сопутствующих заболеваний, как сахарный диабет (СД), артериальная гипертензия (АГ), ревматоидный артрит (РА).

Однако в трудах этих ученых не рассматриваются 1-2 стадии хронической болезни почек (ХБП) и системные заболевания (СЗ). Эти работы не могут быть в чистом виде применены для решения вопроса о тактике ведения больных на ранних стадиях ХБП, так как возможен риск развития АХЗ уже на 1-2 стадиях ХБП, особенно у больных СЗ (гранулематоз

Вегенера, СКВ). Таким образом в значительной части эти исследования охватывают только поздние стадии ХБП, не учитывая ранние стадии ХБП.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность и обоснованность результатов и выводов исследования подтверждается их соответствием методическим положениям нефрологии, применением комплексных методов теоретического и эмпирического исследования, адекватных цели и задачам, результатами практической апробации диссертации, репрезентативностью выборки (достаточный клинический материал – 79 человек), использованием современных диагностических методик и статистических методов. Статистическая обработка материала продемонстрировала достоверность полученных результатов.

Апробация работы проведена 30 июня 2018 года на совместном заседании кафедры внутренних, профессиональных болезней и ревматологии медико-профилактического факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова(Сеченовский Университет) и кафедры внутренних болезней факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, протокол № 5. Основные результаты диссертационного исследования были представлены на 47-й Сессии Nephrology Dialysis Transplantation 5-7 декабря 2015 (Милан, Италия) [Постер] и на 53-ем Конгрессе ERA-EDTA 21-24 мая 2016 (Вена, Австрия) [Постер].

Личный вклад автора

Автор принимал участие во всех этапах исследования: от постановки цели и задач до их теоретической и практической реализации. Теоретическая часть состояла в написании литературного обзора, подборе, анализе и систематизации научных статей по теме диссертации; построении целей и задач исследования. Практическая часть исследования заключалась в сборе анамнеза, жалоб, осмотре больного, заборе проб крови с последующим

получением плазмы для оценки концентрации гепсидина-25, интерферона γ , растворимой формы белка Klotho (s-Klotho), проведении инструментальных исследований - Эхо-кардиографии, динамическом наблюдении за больными, а также в статистической обработке полученных данных.

Внедрение результатов в практику

Результаты работы Маркиной М.М. внедрены в практику работы Университетской клинической больницы №3 и используются в учебном процессе кафедры внутренних, профессиональных болезней и ревматологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова(Сеченовский Университет).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации и результаты проведенного исследования соответствуют формуле специальности 14.01.29 – «нефрология» и выполнены в соответствии со следующими пунктами паспорта специальности ВАК: 4. Клиническая патофизиология: иммунные механизмы возникновения и прогрессирования заболеваний почек; 5. Диагностические методики при заболеваниях почек; 6. Гломерулонефриты (этиология, патогенез, клинические особенности, методы лечения); 7. Поражение почек при системных заболеваниях; 11. Почечная недостаточность (хроническая: клиническое течение, консервативные методы лечения).

Публикации

По данной теме научно-исследовательской работы опубликованы 4 научные работы, в том числе 3 в рецензируемых журналах, рекомендованных в ВАК, в которых нашли отражение теоретические принципы и результаты работы.

Объем и структура диссертации

Диссертация содержит 133 страниц машинописного текста, который состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, выводов, библиографии, включающей 107 отечественных и зарубежных источника. Диссертация иллюстрирована 27 таблицами и 18 рисунками.

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1. Общие сведения об анемиях

Под термином «анемия» понимают снижение содержания гемоглобина и эритроцитов в крови [2, 6, 11]. Для диагностики анемии необходимы три показателя: содержание гемоглобина, гематокрит и число эритроцитов, при этом измерение содержания гемоглобина в крови применяют как наиболее точный и репрезентативный метод [6, 12-14].

Диагностически значимым считают снижение гемоглобина ниже физиологического уровня на два стандартных отклонения с учетом возраста и пола:

- менее 120 г/л у взрослых женщин
- менее 130 г/л у взрослых мужчин
- менее 120 г/л у пожилых мужчин (старше 70 лет)

Этот показатель используют и для оценки тяжести анемии.

В группу анемий вследствие снижения продукции эритроцитов (гипорегенераторные; RPI более 2) относят анемии с нарушением построения гема из-за дефицита железа (железодефицитная анемия), ретенции железа в ретикулоэндотелиальной системе (РЭС) организма при нарушенной регуляции эритропоэтином костномозговой продукции (анемия хронических заболеваний – АХЗ, анемия воспаления), недостатка эритропоэтина (хроническая болезнь почек – ХБП), эндокринопатии [4, 6, 11, 46].

В России для диагностики дефицита железа используют показатели TSAT и ферритина.

Коррекция дефицита железа для приема внутрь или внутривенного введения может снизить выраженность анемии у пациентов с ХБП. Нескорректированный дефицит железа – одна из важных причин пониженной чувствительности к терапии эритропоэз-стимулирующими препаратами (ЭСС). Важно диагностировать дефицит железа, поскольку его коррекция может своевременно компенсировать связанную с ним анемию, а исследование причин дефицита железа, которое должно последовать в дальнейшем, может привести к установке важного диагноза [6, 10, 38, 39].

У пациентов с анемией при ХБП терапия железом направлена на обеспечение адекватных запасов железа необходимых для эритропоэза, коррекции дефицита железа и (у пациентов, получающих ЭСС) – для профилактики его развития. Коррекция железодефицита, особенно внутривенно, способна ускорить эритропоэз, повысить уровень гемоглобина у больных с анемией, даже если уровни TSAT и ферритина не указывают на абсолютный недостаток железа, а свидетельствуют наоборот об относительном дефиците железа, наблюдающемся при АХЗ с повышенным уровнем ферритина, и даже тогда, когда исследование костного мозга выявляет адекватно необходимые запасы железа. Восполнение дефицита железа, в частности внутривенно, стабильно улучшает ответ на эритропоэз-стимулирующие средства (ЭСС) [6, 10, 29].

Среди большинства больных с ХБП при уровне ферритина выше 100 мкг/л возможен достаточный запас железа в костном мозге. Однако у многих из этой категории больных увеличивается содержание гемоглобина и/или снижается доза ЭСС, если провести терапию железом [6, 10, 39].

Эксперты KDOQI (2006) внутривенную терапию железом не рекомендуют если уровень ферритина выше 500–800 мкг/л. Высокий уровень

ферритина в ряде анализируемых ими исследованиях был связан с более повышенной летальностью, но является ли высокий уровень ферритина маркером избыточного применения железа, а не неспецифическим реактантом острой фазы – они не уточняют. Некоторые авторы полагают, что возрастающий и высокий уровень ферритина отвечает за увеличение отложений железа в печени [5, 13, 83], однако убедительных клинических данных, подтверждающих эту точку зрения не представлено.

Считают, что решение о назначении препаратов железа конкретному больному следует основывать: 1) на анализе потребности в увеличении уровня гемоглобина, например, для предупреждения гемотрансфузий или для снижения связанной с анемией симптоматики и 2) на анализе результатов оценки потенциальных побочных эффектов лечения железом (пероральным или внутривенным), если они указывают на то, что риски определенно перевешиваются ожидаемыми выгодами от терапии препаратами железа [6, 84].

1.1. Анемия - классическое осложнение хронической болезни почек (ХБП)

Важнейшими задачами нефрологии являются повышение качества жизни и общей выживаемости больных с ХБП, распространенность которой в мире неуклонно нарастает.

Почечная анемия закономерно осложняет течение хронической почечной недостаточности и обычно наблюдается при снижении клиренса креатинина до 40-60 мл/мин, но нередко и на более ранних стадиях заболевания, например при диабетической нефропатии (ДН) [11].

При хронической почечной недостаточности анемия является независимым фактором неблагоприятного прогноза, увеличивает общую и сердечно-сосудистую летальность. В исследовании SOLVD показано, что уменьшение гематокрита на 1% повышает общую смертность больных

хронической сердечной недостаточностью на 2,7%, а исследование OPTIME выявило увеличение риска смерти или повторной госпитализации на 12% при уровне гемоглобина менее 12 г/дл [24, 25]. Между степенью снижения гемоглобина и увеличением массы миокарда левого желудочка при хронической болезни почек (ХБП) установлена прямая зависимость, при этом роль анемии как фактора риска развития гипертрофии левого желудочка сопоставима с артериальной гипертонией и сахарным диабетом [11]. Развивающаяся на фоне анемии почечная ишемия приводит к прогрессирующему ухудшению функции почек: каждое снижение гемоглобина на 1 г/дл увеличивает вероятность развития терминальной стадии ХБП на 11 % [57, 63]. В больших рандомизированных исследованиях (SOLVD, ARIC, PRAISE и др.) было установлено взаимное отрицательное влияние заболеваний сердца, почек и анемии [24, 61, 67], что явилось причиной введения понятия «кардиоренальный анемический синдром», смертность при котором в течение двух лет составляет 45,6% [4].

Следовательно, анемия является частым осложнением хронической болезни почек (ХБП), приводит к ухудшению качества жизни больных, вызывает снижение их общего самочувствия, а таким образом работоспособности и толерантности к физической нагрузке, нарушение сексуальной и когнитивной функции и сопровождается различными симптомами (одышка, головокружение, плохой аппетит и т.д.). Анемия может возникать еще до наступления терминальной стадии ХБП и затем усугубляться по мере прогрессирования почечной недостаточности. Установлено, что при скорости клубочковой фильтрации (СКФ) меньше 60 мл/мин/1.73 м² средний уровень гемоглобина по данным популяционных исследований составляет менее чем 12 г/дл [4, 7, 12, 13].

В исследованиях последних лет показана мультифакторность развития анемии [5-7]. При одинаковом уровне почечной функции определяются значительные индивидуальные вариации уровня гемоглобина больных ХБП,

что может быть вызвано с многофакторностью патогенеза нефрогенной анемии. По современным представлениям важное значение в развитие анемии у больных ХБП имеют уменьшение продукции почками эритропоэтина и антипролиферативное действие на костномозговые эритроидные предшественники уремических токсинов, но значительное влияние могут оказывать также и воспаление, инфекция с развитием АХЗ, коморбидные состояния, неоплазии, лекарства, нутритивные агенты (недостаток железа, витамина В12, фолиевой кислоты, белково-энергетическая недостаточность) [1, 4-6].

Значение некоторых из них изучено недостаточно, между тем оценка вклада этих факторов, в частности воспалительных цитокинов (гепсидина), в общую картину заболевания важна не только с точки зрения понимания механизмов развития анемии у больных ХБП, но и для определения рациональной тактики лечения.

Для диагностики и дальнейшего контроля за анемией у больных ХБП следует мониторировать: уровень гемоглобина (для определения степени анемии); индексы красной крови: средний объем эритроцитов, средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах и др. (для оценки типа анемии); проводится подсчет количества ретикулоцитов. Для определения тканевых резервных запасов железа и типа анемии недостаточно оценки сывороточного железа и общей железосвязывающей способности сыворотки крови (ОЖСС), необходима также определение уровня ферритина, насыщения трансферрина железом (TSAT) [6, 21, 79, 80].

Дефицит железа при ХБП может быть абсолютный и относительный[85]. При абсолютном дефиците выявляется общее истощение запасов железа, которое возникает вследствие острых и хронических кровопотерь (остающаяся в контуре аппарата для гемодиализа кровь, частый забор крови для лабораторных исследований, кровоточивость слизистых, в том числе на фоне нарушений системы гемостаза и др.), малобелковой диеты,

синдрома мальабсорбции, прием лекарственных препаратов, снижающих всасывание железа (фосфат-связывающие препараты) и повышающих потребность в железе (препараты эритропоэтина). Функциональный дефицит железа предполагает его нормальные и повышенные запасы при условии нарушения мобилизации железа из депо с истощением его лабильного пула [2, 6, 16, 83].

Как было ранее установлено, анемия почечного генеза обычно наблюдается при снижении клиренса креатинина до 40–59 мл/мин (3А стадия ХБП по классификации KDIGO, 2012), но при некоторых этиологических формах ХБП анемия может развиваться и на более ранних стадиях ХБП. Например, при сахарном диабете 2 типа, заболеваемость которым приобретает эпидемический характер, у некоторых больных анемия выявляется уже на 2-й стадии ХБП и является прогностически неблагоприятным осложнением диабетической нефропатии [11, 12, 61]. У большинства пациентов ХБП диабетической этиологии и анемией наблюдается повышение сывороточных концентраций провоспалительных цитокинов [11, 61, 65].

В последние годы все большее внимание обращают на профилактику и лечение анемии на ранних стадиях ХБП с целью рено- и кардиопротекции. У большинства больных к началу программного гемодиализа анемия существенно выражена. Существует точка зрения, что коррекция анемии может способствовать и уменьшению темпов прогрессирования ХБП [4, 6, 61].

К сожалению, в доступной литературе не предоставлено достаточных данных о распространенности анемии исключительно на ранних стадиях (1-2) ХБП при системных заболеваниях.

1.2.Патогенез анемии хронических заболеваний

В настоящее время внимание исследователей привлечено к особой форме анемии – анемии воспаления или анемии хронических заболеваний

(АХЗ). Характерной особенностью этой анемии является нарушение метаболизма железа - сочетание дефицита доступного для эритропоэза железа (сниженного уровня насыщения трансферрина железом - TSAT) при достаточных его запасах в ретикулоэндотелиальной системе [6, 8, 82].

Установлена ведущая роль цитокин-опосредованных механизмов в нарушениях эритропоэза у больных с анемией хронических заболеваний (АХЗ) [2, 6, 8, 80]. Основные причины АХЗ представлены в таблице 1. При ХБП анемия хронических заболеваний - АХЗ выявляют у 23-50% больных.

Таблица 1

Причины анемии хронических заболеваний (по G. Weiss, L.T. Goodnough, 2005)

Заболевание	Частота анемии, %
• Инфекции (острые и хронические): - вирусные, включая ВИЧ - бактериальные - паразитарные - грибковые	18-95
• Опухоли: - гемобластозы - солидные опухоли	30-77
• Аутоиммунные заболевания: - ревматоидный артрит - системная красная волчанка - васкулиты - саркоидоз - хронические заболевания кишечника (язвенный колит, болезнь Крона)	8-71
• Хроническое отторжение трансплантата	8-70
• Хроническая болезнь почек	23-50

Пусковым фактором развития у больных АХЗ считают активацию Т-лимфоцитов и моноцитов, которые усиленно синтезируют γ -интерферон, фактор некроза опухоли α (ФНО- α), интерлейкин-1, интерлейкин-6 и

интерлейкин-10. Установлено, что цитокины конкурентно блокируют рецепторы к эритропоэтину на эритроидных предшественниках и оказывают воздействие на связанные с этими рецепторами внутриклеточные сигнальные пути. В результате снижения экспрессии растворимой формы мембранного рецептора FasL (Fas ligand) и повышения экспрессии мембранного рецептора TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) угнетается пролиферация и созревание эритроидных клеток, усиливается их апоптоз (рисунок 1.) [2, 3, 6, 8, 48-50].

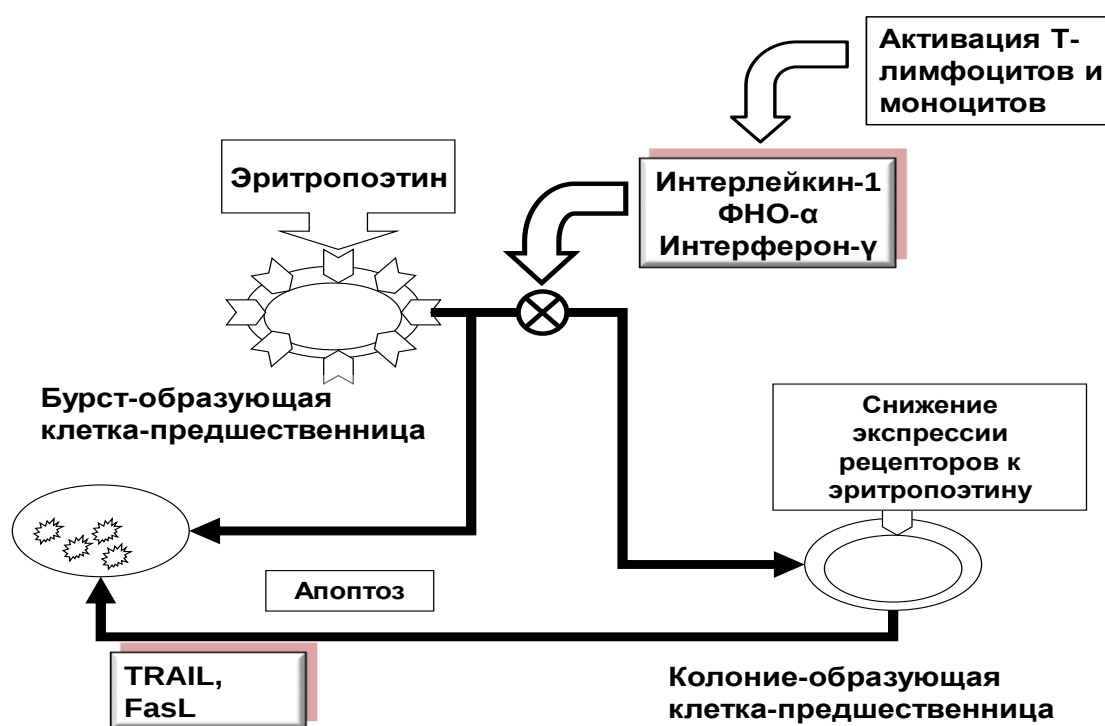


Рисунок 1. Патогенез анемии хронических заболеваний (I)

Важным патогенетическим звеном развития у больных анемией хронических заболеваний (АХЗ) является нарушение ферокинетики, которая обеспечивается путем взаимодействия транспортных белков, депоформ и регуляторов железа. Появились публикации в которых выяснена функция гепсидина, выполняющего с одной стороны роль медиатора врожденного иммунитета, а с другой – негативного регулятора обмена железа [6, 16, 69-70]. Также, показано участие гепсидина в прогрессировании ССО [37-39]. Обсуждается роль таких показателей метаболизма железа как ферритин и

трансферрин в виде маркеров, ассоциированных с резистентностью к эритропоэз-стимулирующей терапии [6, 8, 30, 33]. Для оценки ответа на лечение препаратами железа рекомендовано исследование растворимых рецепторов трансферрина, которое не имеет зависимости от факторов воспаления, действия половых гормонов и расчет ферритинового индекса – соотношения растворимых рецепторов трансферрина к десятичному логарифму уровня ферритина. Данные биомаркеры показали большую информативность в дифференциальном диагнозе АХЗ и железодефицитной анемии (ЖДА), чем ферритин и трансферрин [6, 8, 32].

Нарушения обмена железа связывают главным образом с усиленным поглощением и задержкой его клетками ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) с последующим ограничением поступления железа в костный мозг [6, 8, 40-42]. Получены данные, свидетельствующие, что в условиях хронического воспаления повышение содержания железа в макрофагах связано с усилением эритрофагоцитоза и трансмембранного поступления железа в макрофагальные клетки с помощью белка-транспортера двухвалентных металлов I типа (DMT-1). Повышение экспрессии DMT-1 активированными макрофагами стимулируют γ -интерферон, TNF- α , интерлейкин 6 (ИЛ-6) и бактериальный липополисахарид, и эти же стимулы способствуют ретенции железа в макрофагах благодаря подавлению экспрессии ферропортина – трансмембранного белка, обеспечивающего высвобождение железа из макрофага [6, 8, 63, 64].

Как было выше отмечено, важное значение в контроле за реутилизацией железа при АХЗ в настоящее время придают усилению синтеза печенью белка острой фазы воспаления – гепсидина (вследствие влияния липополисахарида, ИЛ-6) [рисунок 2.].

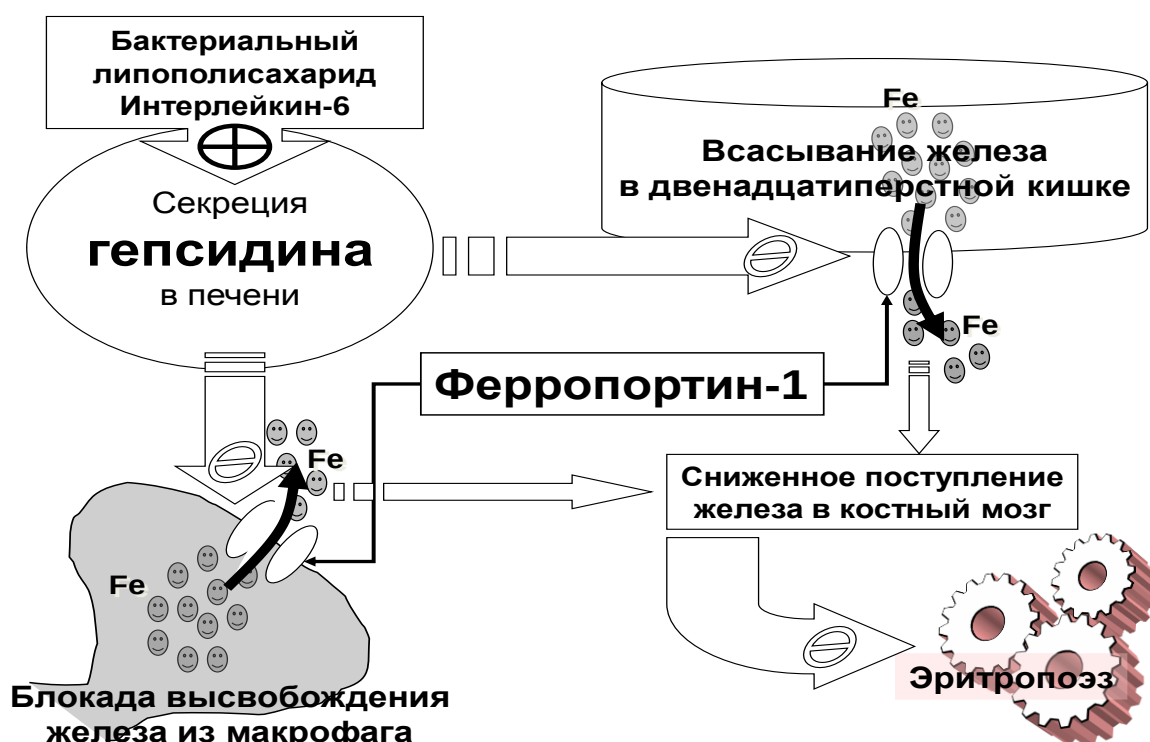


Рисунок 2. Патогенез анемии хронических заболеваний (II)

Важным является тот факт, что у больных с ХБП на додиализном этапе и активностью основного системного заболевания (ревматоидный артрит, системная красная волчанка, системный васкулит и др.) характерны нарушения нутритивного статуса со снижением выработки эритропоэтина, и вследствие этого уменьшением основного обмена. У этой группы пациентов анемия может иметь многофакторное происхождение, представленное сочетанием воспаления, белково-энергетической недостаточности и уменьшением массы почечной ткани и соответственно продукции эритропоэтина. Наряду с этим, у больных с ХБП при нарушениях нутритивного статуса выявляются также недостаток железа и авитаминозы, а именно снижение сывороточных концентраций фолиевой кислоты и витамина В₁₂, однако диагностировать их при первичном обследовании удастся далеко не всегда [6, 8]. Диагностика и лечение анемии у этой категории больных до настоящего времени не определены.

1.2.1. Роль гепсидина в патогенезе обмена железа при АХЗ

В последнее время идентифицирован ранее не известный фактор, участвующий в регуляции гомеостаза железа и развитии АХЗ при ХБП гепсидин.

Гепсидин-25 представляет собой гормоноподобный пептид, состоящий из 25 аминокислотных остатков, вырабатываемый только тканью печени. В 2001 году были опубликованы первые результаты экспериментальных исследований на мышах, показавших, что синтез гепсидина стимулируется в условиях избыточного поступления и накопления железа [60-66, 87]. В дальнейшем было установлено, что гепсидин, является негативным регулятором всасывания железа в кишечнике и его высвобождения из депо, оказывая тем самым важный биологический эффект, который направлен на снижение циркуляции железа. Продукция пептида определяется активностью эритропоэза. Активация эритропоэза экзогенным эритропоэтином приводит к снижению синтеза гепсидина, увеличению абсорбции железа в кишечнике, освобождению его из депо и достаточному насыщению эритронов железом [6, 26, 27, 87].

Синтез гепсидина увеличивается вне зависимости от обмена железа и состояния эритропоэза под воздействием бактериальных липополисахаридов и провоспалительных цитокинов, в результате чего цитокиновая активация образования гепсидина и накопление железа в энтероцитах, макрофагах и гепатоцитах при бактериальных инфекциях может стать причиной развития анемии [1, 42-45, 87].

Эти процессы ведут к снижению концентрации железа в циркуляции и таким образом уменьшению доступного для использования костно-мозговыми эритроцитарными предшественниками железа. Недостаточное поступление железа в клетки эритроидного ряда костного мозга является

важным фактором торможения их созревания и снижения активности синтеза гема. Опубликованы данные, свидетельствующие о том, что заболевания, сопровождающиеся АХЗ, могут сочетаться с аутоиммунным гемолизом и угнетением гранулоцитопоеза Т-лимфоцитами (например, синдром Фелти у больных с ревматоидным артритом), что усложняет генез анемии и требует коррекции лечения [6, 8].

Идентификация гепсидина позволила установить связь между иммунными нарушениями обмена железа и АХЗ, характерной чертой которой является сочетание низкого уровня железа в сыворотке с повышенными запасами его в клетках ретикулоэндотелиальной системы [6, 8, 15, 24-25, 87]. Гепсидин-25 тормозит не только кишечное всасывание железа, его высвобождение макрофагами, но и транспорт железа через плаценту[23]. Установлено, что у нокаутированных мышей в отсутствии мРНК гепсидина содержание железа в крови очень высокое. С другой стороны, трансгенные мыши с усиленной выработкой гепсидина умирали при рождении с тяжелым железодефицитом [23, 28, 42-44]. У больных гепсидинпродуцирующей аденомой диагностируется железодефицитная анемия, резистентная к лечению препаратами железа [23, 42]. Мутации гена гепсидина приводят к развитию гемохроматозов [6, 8, 23].

Изучение роли гепсидина в обмене железа дает новые перспективы для лечения различных расстройств и позволяет сформулировать новые рекомендации, которые касаются применения препаратов железа [6, 8, 23, 25].

Терапия рекомбинантным гепсидином может быть применена у больных ювенильным гемохроматозом и с менее тяжелыми, но более частыми формами гемохроматоза, которые вызываются мутациями гена HFE [6, 23, 37, 62].

При анемиях воспаления (АХЗ), часто резистентных к терапии эритропоэтином, подавление гепсидина может привести к выходу депонированного в макрофагах железа и, вследствие этого нормализации уровня гемоглобина [6, 23, 41, 46, 48], что позволит скорректировать недостаток железа в миоглобине и цитохромах. Необходимо контролировать прием препаратов железа, который вызывает накопление железа макрофагами в синовиальных оболочках, также обусловленного гепсидином [6, 23, 50]. Железо синовиальной оболочки может стимулировать образование свободных кислородных радикалов, что, полагают, связано с хроническим течением и тяжестью поражений суставов при ревматоидном артрите. Для гематологов гепсидин является основным маркером для контроля кинетики железа [6, 23, 69].

Наряду с регуляцией абсорбции железа, гепсидин способен разрушать бактериальные мембраны, создавая неблагоприятное микроокружение для микробов, попавших в кровоток [6, 8, 23, 71-72].

Гепсидин, стимулируя накопление железа макрофагами, лишает микроорганизмы необходимого компонента для выработки супероксиддисмутазы, которая может служить защитой их от кислородных радикалов хозяина [6, 8, 23, 72].

Изданы публикации, свидетельствующие об обратной корреляции частоты встречаемости туберкулеза и ревматоидного артрита, которая может быть косвенно вызвана избытком гепсидина: возможно, что недоступность железа при ревматоидном артрите защищает организм от туберкулеза [8, 23, 55, 74, 75].

Определение сывороточного уровня гепсидина в крови стало возможным в обычной лабораторной практике лишь в последние годы благодаря появлению коммерческих тест-систем для иммуноферментного анализа: у здоровых лиц концентрация гепсидина варьирует от 17 до 65 пг/мл у женщин и от 112 до 286 пг/мл у мужчин [38-40, 87].

Важно отметить, что основную роль в генезе анемии хронических заболеваний (АХЗ) отводят нарушениям эритропоэза, связанным с ингибирующим действием цитокинов, однако диагностику АХЗ проводят на основании оценки показателей обмена железа. У больных с АХЗ, также как и у больных с ЖДА, выявляют низкий уровень сывороточного железа и сниженное насыщение железом трансферина, но при этом ОЖСС снижена (а не повышена, как при истинной ЖДА) [6, 8, 33].

При анемии хронических заболеваний (АХЗ) уровень сывороточного ферритина, отражающий запасы железа, нормальный или повышен - более 100 мкг/л, в среднем 160 мкг/л (при истинной ЖДА – низкий, чаще не выше 15 мкг/л) [6, 8, 25].

Обратно пропорционально содержанию сывороточного ферритина изменяется уровень в сыворотке крови растворимых *трансферриновых рецепторов* - TsR, который при АХЗ снижен (при ЖДА повышен).

В части случаев, при необходимости дифференциального диагноза АХЗ и железодефицитная анемия (ЖДА) проводят пункцию костного мозга с окраской методом берлинской лазури: при АХЗ число сидеробластов снижено - в среднем 13% (при ЖДА еще ниже – в среднем 2,5%) - *железодефицитный эритропоэз*, но запасы железа в костно-мозговых ретикулоэндотелиальных клетках нормальное или повышено [6, 8, 33]. В костно-мозговом пунктате выявляют гистиоциты с синими гранулами депозитов железа вне клеток [6, 8].

У большинства больных АХЗ обычно умеренно выражена, размер эритроцитов чаще не изменен (нормоцитоз), микроцитоз в отличие от ЖДА не характерен, но внутриклеточная концентрация гемоглобина снижена (гипохромия у 23-50% больных). Количество ретикулоцитов в норме или сниженное [6, 8, 14, 25].

1.2.2. Роль интерферона γ (IFN- γ) в патогенезе обмена железа при АХЗ

Ген интерферона II типа IFN- γ , расположенный в 12-ой хромосоме, содержит три интрона, 4 экзона кодируют полипептид из 166 аминокислот, 20 из которых составляют сигнальный пептид. В отличие от синтеза IFN- α и IFN- β , который может происходить в любых клетках, продукция IFN- γ осуществляется Т-лимфоцитами и NK-клетками [6, 8, 50, 61].

Индукторы IFN- γ активируют Т-лимфоциты либо поликлональным (митогены или антитела) либо клонально ограниченным антиген-специфичным путем. IFN- γ продуцируется при инфекции CD8+ Т-лимфоцитами (цитотоксические клетки/клетки-супрессоры) и Т-хелперами первого типа (Th1). Th1 секретируют IL-2, IL-3, TNF- β и IFN- γ , тогда как Th2 в основном продуцируют IL-3, IL-4, IL-5 и IL-10, но не продуцируют (или продуцируют мало) IFN- γ . IFN- γ избирательно ингибирует пролиферацию Th2-, но не Th1-клеток, что подтверждается преимущественной пролиферацией Th1-клеток в иммунном ответе в присутствии IFN- γ .

Интерферон гамма (IFN- γ) представляет собой лимфокин, не обнаруживающий молекулярной гомологии с интерфероном I типа, однако сходный с ним по ряду биологических свойств. IFN- γ индуцирует противовирусную защиту и антипролиферативное действие [6, 8, 43, 61]. Наряду с этим, IFN- γ обладает иммунорегуляторными свойствами. Так, установлено, что IFN- γ является мощным активатором мононуклеарных фагоцитов, т.к. IFN- γ стимулирует экспрессию Mac-1, усиливает эндоцитоз и фагоцитоз моноцитами, активирует макрофаги уничтожать опухолевые клетки путем высвобождения активных форм кислорода и TNF- α . IFN- γ индуцирует или модулирует экспрессию антигенов МНС на макрофагах, Т- и В-клетках и на опухолевых клетках некоторых линий. Кроме того, IFN- γ стимулирует дифференцировку Т- и В-клеток. Он ускоряет пролиферацию активированных В-клеток и может действовать синергично с IL-2, усиливая синтез легких цепей иммуноглобулинов. IFN- γ является одним из

естественных факторов дифференцировки В-клеток. Наконец, IFN- γ активирует нейтрофилы, НК-клетки и эндотелиальные клетки сосудов.

Роль IFN- γ как маркера АХЗ изучена при ряде патологических состояний, таких как аутоиммунные заболевания (ревматоидный артрит, СКВ, васкулиты). IFN- γ продуцируется при вирусных инфекциях [6, 8, 25].

1.2.3. Связь анемии и дефицита железа с изменениями циркулирующей формы белка Klotho

В единичных исследованиях обнаружена связь изменений растворимой формы белка Klotho (s-Klotho) с наличием у больных анемии [6]. Авторы сравнили концентрацию белка s-Klotho у больных ХБП с анемией и без анемии и выявили более низкий уровень s-Klotho среди больных анемией, чем среди больных с теми же стадиями ХБП, имеющими целевые значения гемоглобина. Разница между этими группами больных анемией по величине s-Klotho составила 80% [9].

Имеются лишь единичные публикации о наличии прямой корреляции белка s-Klotho с нарушением обмена железа [6, 9]. Полагают, что дефицит железа приводит к развитию анемии, следствием которой является ишемии почек со снижением продукции s-Klotho [9].

Белок Klotho впервые был идентифицирован в 1997 г., как результат генной мутации у мышей с синдромом преждевременного старения [9]. Название белка происходит от имени одной из богинь греческой мифологии, прядущей нить человеческой жизни. Далее было установлено, что ген Klotho кодирует трансмембранный протеин, который принадлежит к семейству гликозидаз и находится в канальцах почек [6, 9, 17].

В настоящее время известно, что ген Klotho секретирует «белок молодости», обладающий плеiotропными эффектами, включая кардионефропротективные эффекты [9]. Мыши, лишённые этого гена развивают фенотип, идентичный фенотипу преждевременного старения человека [6, 8].

Сниженная продукция этого белка наблюдается у пациентов с хронической почечной недостаточностью (ХПН) и может быть одним из факторов, лежащих в основе дегенеративных процессов (например, атеросклероза, остеопороза и атрофии кожи), наблюдаемых при ХПН. Кроме того, мутации белка Klotho связаны со старением и потерей костной массы. S-Klotho представляет собой трансмембранный белок, который, помимо других эффектов, обеспечивает некоторый контроль над чувствительностью организма к инсулину и участвует в процессе старения.

Установлено, что s-Klotho вызывает уменьшение продукции почечного супероксида и супрессию активности НАДФН-оксидазы (клеточный мембрано-связанный мультимолекулярный ферментный комплекс), которая является основным источником активных форм кислорода, вовлекаемых в прогрессирование тубулоинтерстициального повреждения [9].

Интраперитонеальное введение растворимой формы белка Klotho (s-Klotho) экспериментальным животным сразу же после индукции у них односторонней обструкции мочеточника предотвращает развитие острого тубулоинтерстициального фиброза в результате ингибирования TGF β R I [9]. Снижение белка s-Klotho в сыворотке крови ассоциировано с гиперфосфатемией, усилением оксидативного стресса, эндотелиальной дисфункцией и кальцинозом артерий. Низкий уровень s-Klotho характерен для заболеваний, проявляющихся преждевременным сосудистым старением (диабет, атеросклероз, гипертония) [6, 9].

Вопреки достигнутым успехам в изучении патогенетических особенностей развития анемии при ХБП и нарушений обмена железа, недостаточно определены механизмы регуляции обмена железа и пути оптимизации медикаментозной коррекции и профилактики анемии при ХБП.

Необходимы дальнейшие исследования изменений метаболизма белка Klotho в условиях применения больными эпоэтина, внутривенного железа

для уточнения возможности медикаментозной стимуляции продукции белка Klotho.

1. 3. Лечение анемии хронических заболеваний (АХЗ)

По мнению большинства авторов выраженная АХЗ требует коррекции, особенно у пациентов с наличием дополнительных факторов риска (ишемическая болезнь сердца, заболевания легких, хроническая болезнь почек) [2, 6-8, 25].

Лечению АХЗ должно включать:

- Воздействие на основное заболевание
- Применение рекомбинантного эритропоэтина
- Внутривенное введение препаратов железа с целью увеличения содержания и доступности железа для эритропоэза

Большое внимание следует уделить лечению подлежащего заболевания. В части случаев снижение активности заболевания, в рамках которого развилась анемия хронических заболеваний (АХЗ) (ревматоидный артрит(РА), системная красная волчанка (СКВ), васкулиты, воспалительные заболевания кишечника – язвенный колит, болезнь Крона), само по себе приводит к улучшению показателей красной крови [6, 8].

Применение эритропоэтина у этой категории больных показано при значительном снижении уровня гемоглобина [25].

Экзогенный эритропоэтин при АХЗ вызывает:

- Конкуренцию с воспалительными цитокинами за общие сигнальные пути в эритроидных предшественниках (а также клетках воспаления),
- Усиление выработки трансферриновых рецепторов на эритроидных клетках-предшественниках,
- Компенсацию неадекватного биологического действия эндогенного эритропоэтина (для индукции ответа требуются более высокие дозы эритропоэтина).

Полагают, что выбор препарата эритропоэтина и его дозы зависит от характера основного заболевания, его тяжести и наличия осложнений (сердечно-сосудистых, почечных, печеночных). Дозу эритропоэтина необходимо корректировать у больных сахарным диабетом и имеющих анамнез опухолевых заболеваний, а также у больных с критическими состояниями. При назначении препаратов железа важно учитывать особенности клинической картины основного заболевания (опухоль, хроническое воспаление) [2, 6, 8, 25].

По мнению экспертов KDIGO (2012), при бактериальном воспалении и наличии онкологического заболевания железо используется размножающимися микроорганизмами и опухолевыми клетками для своего роста, поэтому его применение в условиях длительной иммунной стимуляции может способствовать обострению инфекции и активации опухолевого процесса [5, 13]. Поэтому терапия препаратами железа должна применяться у больных с АХЗ только при наличии *сопутствующего дефицита железа - абсолютного или относительного*, или когда он развивается у этих больных при лечении эритропоэтином [6, 65, 66].

Учитывая особенности обмена железа (ретенция в РЭС и нарушение всасывания в ЖКТ), предпочтительный способ введения железа при АХЗ – внутривенный. Обычно назначают железа (III) гидроксида сахарозный комплекс или низкомолекулярный декстран железа в дозе 100-200 мг/нед. [6, 8, 10, 25].

Заключение

Таким образом у 10-20% больных анемия развивается на ранних стадиях течения хронической болезни почек (ХБП) или хронической почечной недостаточности (ХБП/ХПН 1-2 стадий) [2, 27-29]. До настоящего времени имеются лишь единичные публикации об особенностях ее диагностики и лечения у этой категории больных [11, 40]. По имеющимся в литературе данным причиной снижения уровня гемоглобина у больных на

ранних стадиях ХБП может быть развитие Кумбс-положительной аутоиммунной гемолитической анемии, обусловленной активностью системной красной волчанки (СКВ), а при длительном отрицательном дефиците железа возможно также развитие железодефицитной анемии [51-53, 76-78].

В единичных исследованиях показано, что развитие анемии на ранних стадиях ХБП могут также вызывать цитокин-опосредованные нарушения эритропоэза вследствие сохраняющейся активности заболевания, приведшего к развитию ХБП (СКВ, системные васкулиты, ревматоидный артрит) [6, 8].

В настоящее время получены данные, свидетельствующие о том, что снижение уровня гемоглобина при ХБП ассоциировано со снижением циркулирующей формы s-Klotho – установленного кардиопротективного фактора [9].

Однако отсутствие единых подходов к диагностике анемии у больных ХБП на ранних стадиях и регламентированных мер ее профилактики у этой категории больных, ограничивают возможности адекватной ее терапии.

Необходимы дальнейшие исследования изучения особенностей метаболизма железа у больных ХБП с анемией хронических заболеваний (АХЗ) при системных заболеваниях, а также изменения продукции растворимой формы Klotho (s-Klotho) в условиях железодефицита и ранней его коррекции у больных ХБП 1-2 стадий с АХЗ.

Глава 2. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 90 больных первичным гломерулонефритом (ГН) и ГН при системных заболеваниях (системная красная волчанка (СКВ), гранулематоз Вегенера (ГВ)) на ранних стадиях течения – хронической болезни почек (ХБП) 1-2 стадий. У 49 из них выявлена анемия, которая у большинства - 43

(10 – первичным ГН, 17 – ГН при СКВ, 16 – ГН при ГВ) отвечала критериям анемии хронических заболеваний (АХЗ). Именно эти 43 больных вошли в дальнейшее исследование, составив основную группу (группа 1). Остальные больные с анемией - с длительным отрицательным балансом железа (у 5), Кумбс- положительным аутоиммунным гемолизом (у 1) были исключены из исследования. Основная группа (группа 1, n=43)) больных сравнивалась с группой контроля (группа 2 (n=36)) [рисунок 3]. В группу контроля были отнесены 36 больных теми же нозологическими формами гломерулонефрита (ГН) (первичным ГН - 10, ГН при СКВ - 10, ГН при ГВ -16) без анемии. Все больные подписывали информированное согласие для участия в исследовании. Перед подписанием согласия им разъяснялись цель исследования и возможные риски осложнений. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом Первый МГМУ им. И.М.Сеченова.

Больные из основной группы и группы контроля - всего 79 человек, на момент включения в исследование принимали поддерживающую иммуносупрессивную терапию, при этом за 3 месяца до рандомизации не требовали усиления этой терапии.

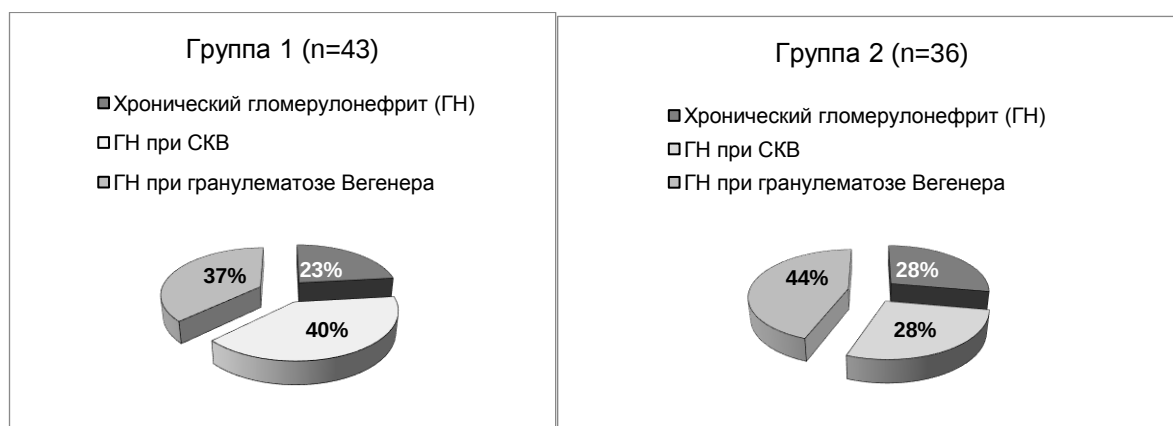


Рисунок 3. Нозологические формы поражения почек в основной (группа 1) и контрольной (группа 2) группах ХБП

Диагноз первичного гломерулонефрита (ГН) устанавливали на основании клинических признаков – протеинурии, гематурии, артериальной гипертензии. У 9 из 20 обследованных больных диагноз первичного ГН подтвержден прижизненным исследованием почечного биоптата. Системную красную волчанку (СКВ) диагностировали на основании системных поражений разной степени выраженности и сочетаний - сетчатое или древовидное ливедо, полиартралгии и артриты мелких суставов кистей, капилляриты кончиков пальцев, ладоней и подошв, лимфоденопатия, волчаночный нефрит. У 9 из 20 больных диагноз волчаночного нефрита подтвержден с помощью биопсии почки. Диагноз гранулематоза Вегенера устанавливали на основании характерных клинических симптомов (поражения верхних дыхательных путей, легких, глаз, кожи, периферических нервов, ЖКТ, почек, у 15 из 19 пациентов в том числе обнаружения с-ANCA). Среди 19 больных ГН при гранулематозе Вегенера у 12 в сыворотке крови выявлен повышенный уровень С-реактивного белка – неспецифического маркера воспаления, у 5 из них выполнена биопсия почек, в результате которой диагностирован малоиммунный некротизирующий васкулит.

Критерии включения в исследование:

1. Хроническая болезнь почек (ХБП) у больных первичным гломерулонефритом (ГН) и ГН при системных заболеваниях (СКВ, гранулематоз Вегенера) на ранних стадиях течения (ХБП 1 и 2 стадий)
2. Отсутствие в течение последних 3 мес до скрининга у всех больных:
 - необходимости в усилении поддерживающей терапии, а также
 - тяжелых инфекционных осложнений, признаков аутоиммунного гемолиза – отрицательная проба Кумса, нормальный уровень ЛДГ, отсутствие ретикулоцитоза, повышения неконъюгированного билирубина, признаков тромботической микроангиопатии

К критериям исключения относились: больные старше 65 лет, а также больные с нарушениями нутритивного статуса (альбумин < 35 г/л, ИМТ < 23 кг/м²), обострением заболевания, требующего усиления поддерживающей иммуносупрессивной терапии в течение последних 3-мес до скрининга.

Больные имели ограничения по уровню АД (систолическое АД ≥ 170 мм рт. ст., диастолическое ≥ 90 мм рт. ст.).

Вид исследования проспективный когортный.

Возраст пациентов варьировал от 21 года до 65 лет ($45,3 \pm 11,1$ лет), большинство составили лица среднего возраста мужского пола (рисунок 4) (мужчины – 46 (58,2%), женщины – 33 (41,8%).

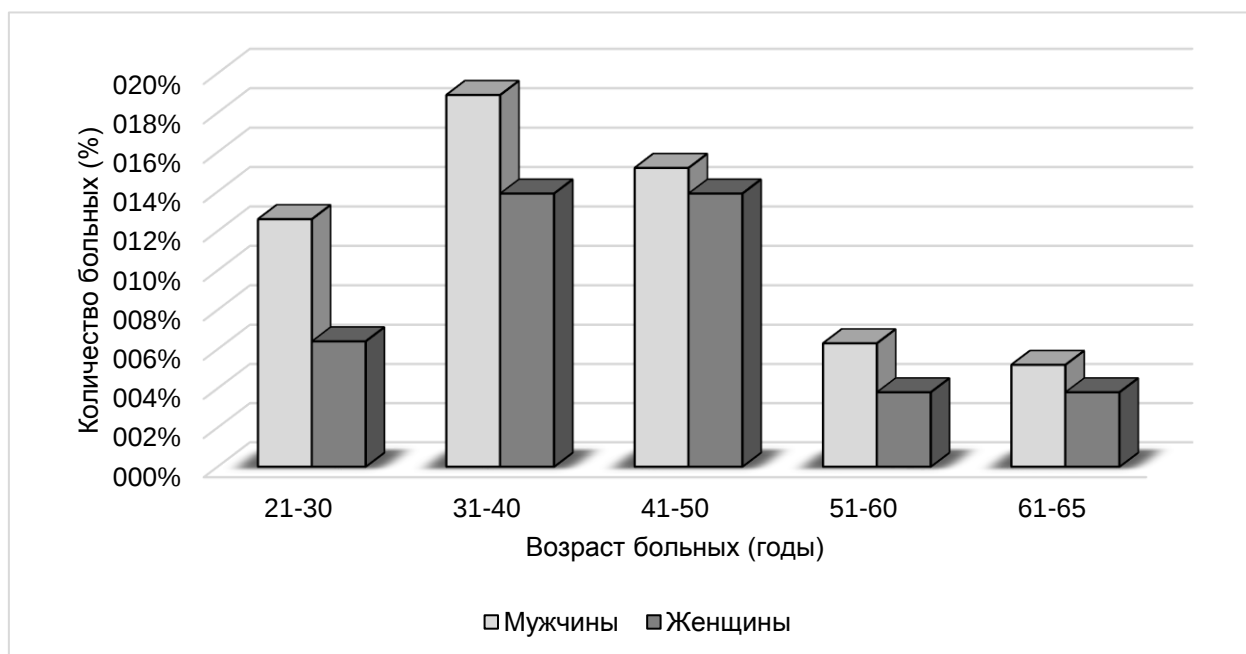


Рисунок 4. Распределение больных по возрасту и полу

Продолжительность хронической болезни почек (ХБП) от начала заболевания до скрининга составила 3,5-7,1 лет, в среднем $5,3 \pm 1,4$ лет.

Характеристика пациентов представлена в таблице 2.

Таблица 2.

**Характеристика обследованных пациентов ХБП 1-2 стадий с анемией
хронических заболеваний (АХЗ) и без АХЗ**

Показатель	1-я группа, n=43 (есть АХЗ: Hb < 120 г/л)	2-я группа, n=36 (нет АХЗ: Hb > 120 г/л)	p
Медиана – Ме (квартиль 25, квартиль 75)			
Анамнестические и физикальные данные			
ИМТ, кг/м ²	21 (20; 24)	23 (20-25)	0,064
Артериальная гипертензия в анамнезе, чел (Ме)	43 (100%)	21 (44,4%)	0,030*
САД на момент исследования	150 (145;160)	120 (115;146,3)	0,012*
ДАД на момент исследования	90 (85; 100)	80 (75; 83,4)	0,210

Примечание: *-p<0,05; **-p<0,001

Таблица 2.

**Характеристика обследованных пациентов ХБП 1-2 стадий с
анемией хронических заболеваний (АХЗ) и без АХЗ (Продолжение)**

Показатель	1-я группа, n=43	2-я группа, n=36	p
Медиана – Ме (квартиль 25, квартиль 75)	(есть АХЗ: Hb < 120 г/л)	(нет АХЗ: Hb > 120 г/л)	
Лабораторные данные			
Гемоглобин, г/л	110 (110; 119)	140 (130;150)	<0,001
СОЭ, мм/час	22,5 (19; 25)	10, 3 (9; 12)	<0,01
Протеинурия, г/сут	0,95 (0,5; 1,2)	0,17 (0,1; 0,23)	<0,001
Креатинин, мг/дл	90 (70; 109)	80,5 (62; 90)	0,017*
СКФ, мл/мин	65 (62; 85)	89 (86; 105)	0,009**
Данные эхокардиографии			
ИММЛЖ г/м ²	155 (145; 160)	120 (110; 125)	0,049*

Примечание: *-p<0,05; **-p<0,001

Диагноз ГН у 21 больного подтвержден морфологически при прижизненной биопсии почки (таблица 3).

Таблица 3.

Морфологические варианты нефрита у больных с ХБП 1-2 стадий

Нозологическая форма ХБП	1-я группа, n=43 (есть АХЗ: Hb < 120 г/л)	2-я группа (контроль), n=36 (нет АХЗ: Hb > 120 г/л)
ХГН (n=20)	Очаговый диффузный ГН (n=5) IgA-нефропатия (n=1)	Очаговый (фокальный) ГН (n=3)
ГН при СКВ (n=20)	I-II класс волчаночного нефрита (ВН) с ТИК и ФПК (n=2) III класс мезангиального ВН (n=2) IV класс мезангиального ВН (n=3)	I-II класс волчаночного нефрита с ТИК (n=2) III класс пролиферативного ВН (n=2)
ГН при гранулематозе Вегенера (n=19)	Некротизирующий васкулит (n=3)	Некротизирующий васкулит (n=2)

Вид исследования проспективный когортный.

В сравнении больных хронической болезнью почек (ХБП) с первичным гломерулонефритом (ГН) и ГН при системных заболеваниях на ранних стадиях течения была определена частота и выраженность анемии в зависимости от величины протеинурии, артериальной гипертензии, степени дисфункции почек, сывороточного уровня гепсидина-25, γ -интерферона, показателей метаболизма железа, растворимой формы белка Klotho (s-Klotho).

Стадии ХБП устанавливали по критериям KDIGO (2012), при этом скорость клубочковой фильтрации (СКФ) подсчитывали по уравнению CKD EPI.

Помимо общеклинического обследования пациентов в нефрологическом отделении, для решения поставленных задач проводили специальные исследования: определение сывороточного уровня гепсидина-25, интерферона γ , белка s-Klotho, а также сывороточного железа, ферритина, насыщения трансферрина железом.

Определение уровня гепсидина-25, интерферона- γ , растворимой формы белка Klotho (s-Klotho) выполняли с помощью тест-систем для иммуноферментного анализа: у здоровых лиц уровень гепсидина в сыворотке крови составляет 0,06-10 нг/мл, интерферона γ – 0,04-25 пг/мл и s-Klotho 0,08-10,0 нг/мл[приложения].

Набор предназначен для количественного определения гепсидина 25 в плазме крови (ЭДТА) методом иммуноферментного анализа. Диапазон измерения: 0.04-25.0 нг/мл. Чувствительность: 0.04 нг/мл.

Набор высокочувствительного интерферона- γ (IFN- γ) предназначен для количественного высокочувствительного определения человеческого IFN- γ в образцах супернатантов клеточных культур, сыворотки, плазмы, синовиальной жидкости и других биологических жидкостей методом иммуноферментного анализа. Диапазон измерения: 0.06-10.0 пг/мл. Чувствительность: 0.06 пг/мл[приложения].

Для количественного определения растворимой формы белка Klotho (s-Klotho) в образцах сыворотки, плазмы методом иммуноферментного анализа использовали набор Klotho. Диапазон измерения: 0.058-10 нг/мл. Аналитическая чувствительность: 0.058 нг/мл.

Для прогнозирования развития анемии хронических заболеваний (АХЗ) при ХБП 1-2 стадий для 79 больных основной и контрольной групп была составлена логистическая регрессионная модель. В качестве возможных предикторов АХЗ у этой категории больных рассматривались клинические показатели активности основного заболевания (суточная протеинурия $> 0,5$ г, артериальная гипертония, снижение СКФ), воспаления (сывороточные

показатели гепсидина, интерферона γ , С-реактивного протеина) и обмена железа (ферритин, насыщение трансферрина железом (TSAT, англ. Transferrin Saturation).

Для оценки влияния анемии на показатели центральной гемодинамики и состояние миокарда определяли уровни систолического и диастолического АД, а также индекс массы миокарда ЛЖ (ИММЛЖ). Гипертрофию левого желудочка (ГЛЖ) диагностировали при индексе массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ) ≥ 125 г/м² для мужчин и ≥ 110 г/м² для женщин[78].

Все больные с АГ получали комплексную антигипертензивную терапию (ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента и/или блокаторы кальциевых каналов, бета-адреноблокаторы). Ингибиторы АПФ применялись в апробированных в клинике дозах, не влияющих на выраженность анемии (Козловская Л.В., Милованов Ю.С., 2006).

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку материала проводили по программе SPSS 22. Описательная статистика для количественных признаков представлена в виде медиан и квартилей. Для определения статистической значимости различий при межгрупповых сравнениях по количественным признакам использовался непараметрический критерий Манна-Уитни. Для выявления предикторов, связанных с развитием анемии при ХБП применяли множественный пошаговый логистический регрессионный анализ. Критический уровень отвержения нулевых статистических гипотез принимали равным 0,05.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Частота анемии у больных хронической болезнью почек (ХБП) 1-2 стадий

Из 79 больных ХБП 1-2 стадий анемия хронических заболеваний (АХЗ) выявлена у 43 (54,4%) больных с сохраняющейся активностью поражения почек (протеинурией $> 0,5$ г/сут, артериальной гипертонией $> 140/80$ мм рт. ст., снижением СКФ < 90 мл/мин). Частота АХЗ у больных гломерулонефритом (ГН) при системных заболеваниях (группа 1 б) была в 3,3 раза больше (41,7% против 12,7%, $p < 0,05$) по сравнению с ее частотой при первичном ГН (группа 1 а) [таблица 4]. Наряду с этим АХЗ выявлялась значительно более часто у больных 2-й стадией ХБП, чем 1-й (таблица 1). Гендерных различий в частоте анемии в сравниваемых группах больных выявлено не было.

Таблица 4.

Частота выявления анемии в зависимости от нозологической формы поражения почек и стадии хронической болезни почек (ХБП)

Больные ХБП	ХБП 1 стадии	ХБП 2-й стадии
	Число больных с АХЗ (абс, %)	
Первичный ГН (группа 1 а), n=40	2 (2,6%)	8 (10,1%)
ГН при системных заболеваниях (группа 1 б):		
• СКВ, n=20	5 (6,4%)	12 (15,2%)
• Гранулематоз Вегенера, n=19	6 (7,5%)	10 (12,6%)
Всего (n=79)	13 (16,5%)	30 (37,9%)

Мы сравнили показатели АД, ИММЛЖ, гепсидина-25, интерферона γ , s-Klotho, С-реактивного белка и суточной протеинурии в группах больных ХБП с АХЗ без АХЗ (таблица 1, 5).

Таблица 5.

Лабораторные показатели у обследованных больных в группах сравнения

Показатель	1-я группа, n=43 (есть анемия: Hb < 120 г/л)	2-я группа (контроль), n=36 (нет анемии: Hb > 120 г/л)	p
Медиана – Me (квартиль 25, квартиль 75)			
С-реактивный протеин, мг/дл	1,5 (1,1; 2,1)	0,3 (0,2; 0,6)	<0,001
Гепсидин, нг/мл	26 (25; 27)	5,1 (3,8; 5,9)	<0,001
Интерферон γ , нг/мл	11 (10; 14)	0,2 (0,09; 0,6)	<0,001
s-Klotho, нг/мл	12 (10; 18)	20 (16,2; 29,8)	<0,05

У больных с анемией хронических заболеваний (АХЗ) (1-я группа) отмечены значимо ($p < 0,01$) более высокие уровни интерферона γ , гепсидина-25 в сыворотке крови по сравнению с больными без АХЗ (2-я группа) [рисунок 5].

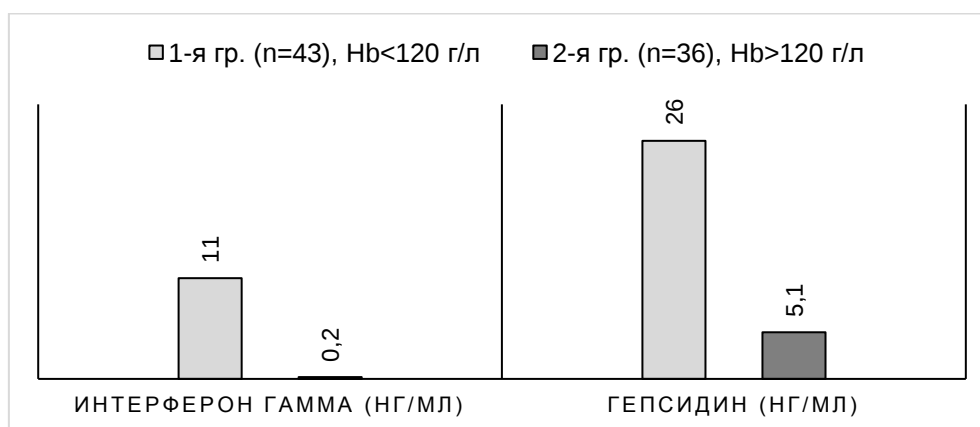


Рисунок 5. Показатели интерферона γ , гепсидина в сравниваемых группах больных хронической болезнью почек (ХБП) 1-2 стадий

Мы изучили связь анемии хронических заболеваний (АХЗ) с сывороточным уровнем интерферона γ , С-реактивного протеина и гепсидина в основной группе больных с ХБП 1-2 стадий (n=43).

У больных ХБП 1-2 стадий с АХЗ выявлена обратная корреляция между сывороточным уровнем интерферона γ и показателем гемоглобина ($r = -0,565$; $p < 0,001$), рисунок 6.

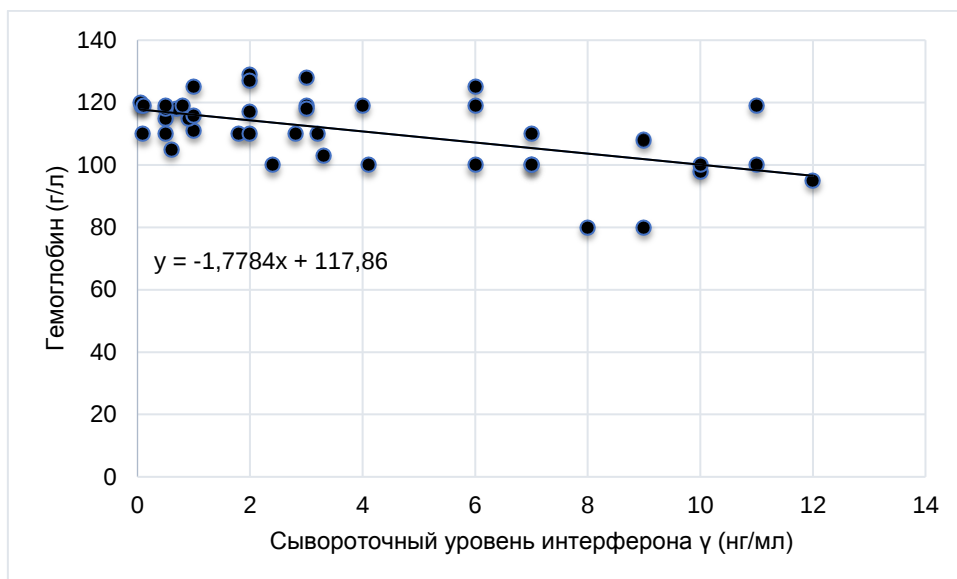


Рисунок 6. Связь сывороточного уровня интерферона γ с показателем гемоглобина у 43 больных ХБП 1-2 стадий с АХЗ

Среди 19 больных гранулематозом Вегенера (ГВ) с анемией у 12 выявили повышение сывороточного уровня С-реактивного протеина по сравнению с показателями у больных без анемии (Ме 1,5 (1,1; 1,8) мг/дл против 0,3 (0,1; 0,4) мг/дл; $p < 0,01$). У тех же больных выявлена обратная корреляция между повышением сывороточного уровня С-реактивного белка – неспецифического маркера воспаления и уровнем гемоглобина ($r = (-) 0,716$; $p < 0,01$), рисунок 7.

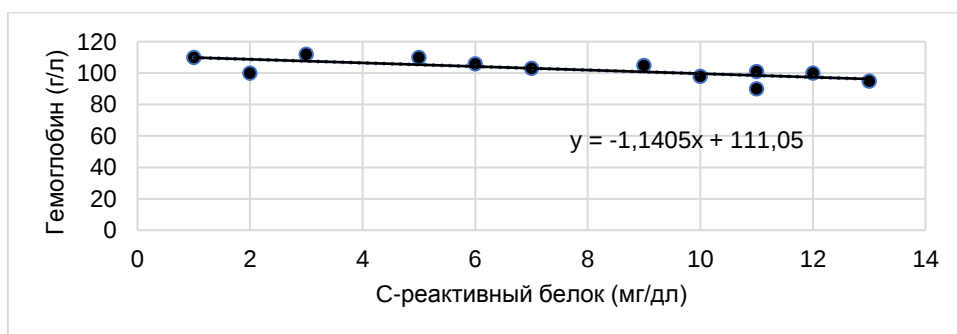


Рисунок 7. Связь сывороточного уровня С-реактивного белка с показателем гемоглобина у 12 больных ГН при ГВ с анемией хронических заболеваний (АХЗ)

В группе больных с АХЗ выявлена сильная обратная корреляция между повышением в сыворотке крови уровня гепсидина и показателем гемоглобина ($r = (-) 0,716$; $p < 0,01$), рисунок 8.

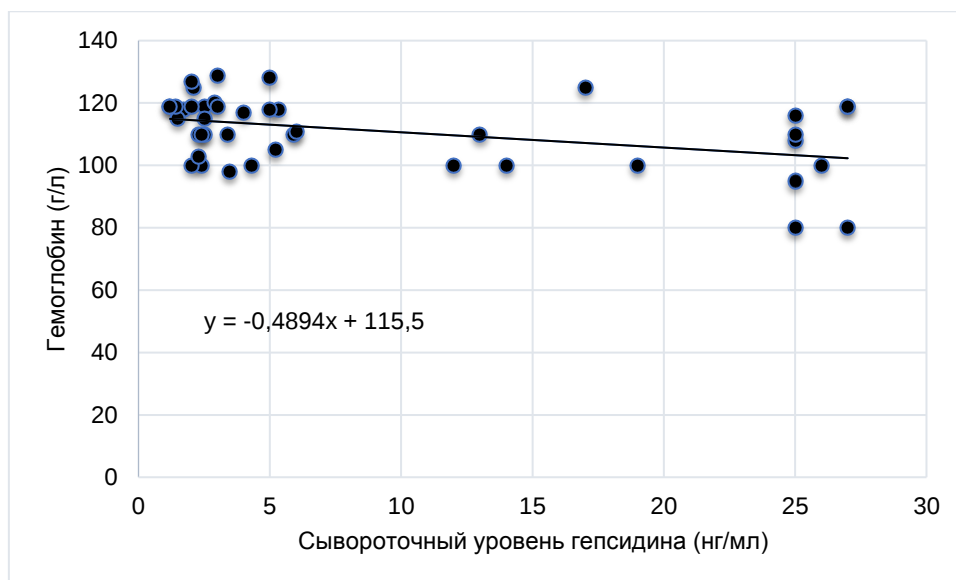


Рисунок 8. Связь сывороточного уровня гепсидина с показателем гемоглобина у 43 больных ХБП 1-2 стадий с АХЗ

3.2. Значение определения сывороточной концентрации белка Klotho (s-Klotho) в оценке тяжести анемии у больных хронической болезнью почек (ХБП) 1-2 стадий

Мы изучили связь белка s-Klotho - установленного кардиопротективного фактора у больных анемией с белком острой фазы воспаления – гепсидином-25. Выявлена отрицательная корреляция ($r = (-) 0,737$; $p < 0,001$) между повышением в сыворотке крови уровня гепсидина и содержанием s-Klotho (рисунок 9), что подтверждает обсуждаемую рядом авторов роль системного воспаления, как одного из факторов риска снижения продукции Klotho при ХБП [2, 6].

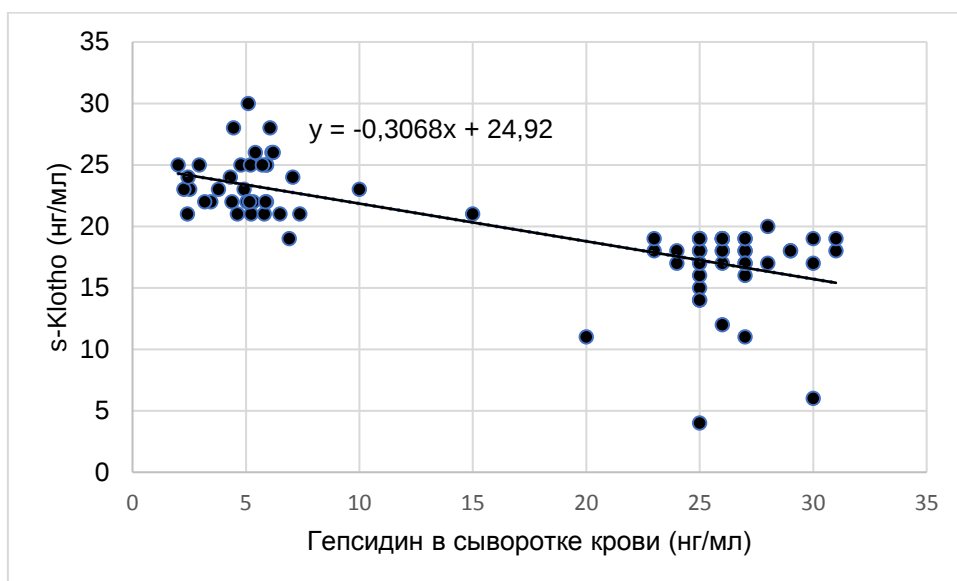


Рисунок 9. Связь сывороточной концентрации гепсидина с растворимой формой белка Klotho (s-Klotho) у 79 больных ХБП 1-2 стадий

Кроме того, мы оценили изменение сывороточного уровня белка s-Klotho в зависимости от величины гемоглобина. У больных хронической болезнью почек (ХБП) 1-2 стадий с анемией хронических заболеваний (АХЗ) нами обнаружена сильная прямая корреляция снижения уровня гемоглобина со снижением продукции белка s-Klotho ($r=0,356$; $p<0,01$) [рисунок 10], что указывает на вероятную связь, обуславливаемой анемией тканевой гипоксии и ишемии почек со снижением продукции белка Klotho.

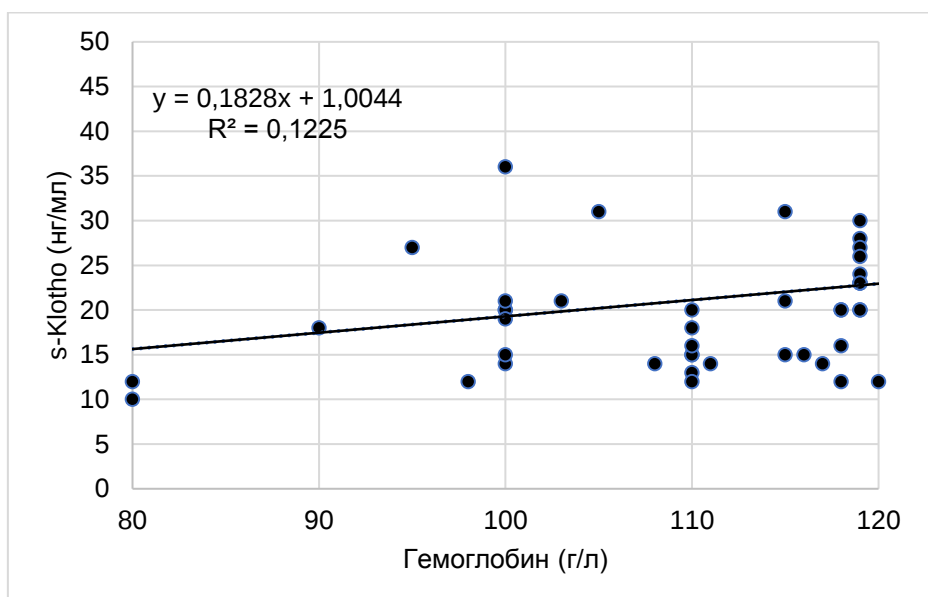


Рисунок 10. Связь s-Klotho со снижением уровня гемоглобина у 43 больных ХБП 1-2 стадий с АХЗ (n=43)

Среди 43 больных хронической болезнью почек (ХБП) с анемией отмечены статистически значимо ($p < 0,05$) более высокий уровень систолического артериального давления и более выражена степень ремоделирования миокарда ЛЖ, чем у больных без анемии (группа контроля). Как следует из данных, представленных в таблице 2, в группе больных с анемией отмечены значимо более высокий уровень сывороточного креатинина и низкий СКФ по сравнению с аналогичными показателями у больных ХБП без анемии.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы о влиянии анемии на формирование гиперкинетического типа кровообращения с увеличением венозного возврата к сердцу и развитием ГЛЖ [2, 6, 11].

С помощью коэффициентов парной корреляции Пирсона установлено влияние анемии на увеличение систолического АД и ИММЛЖ [рисунок 11 и 12].

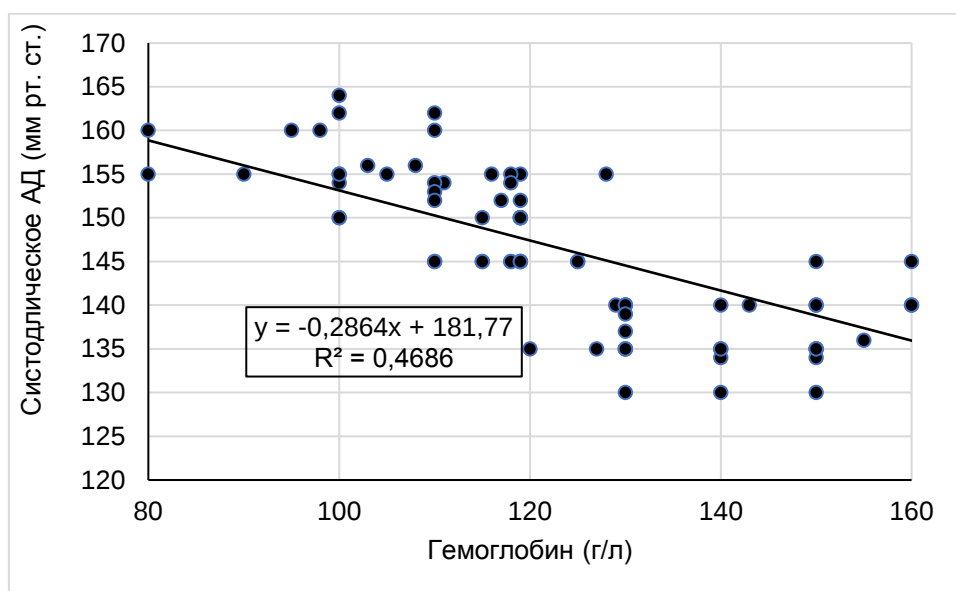


Рисунок 11. Связь повышения уровня систолического АД со снижением уровня гемоглобина ($r = (-)0,684$; $p < 0,001$) у больных 1-й группы

Снижение уровня гемоглобина при ХБП ассоциировано с увеличением ИММЛЖ (рисунок 12).

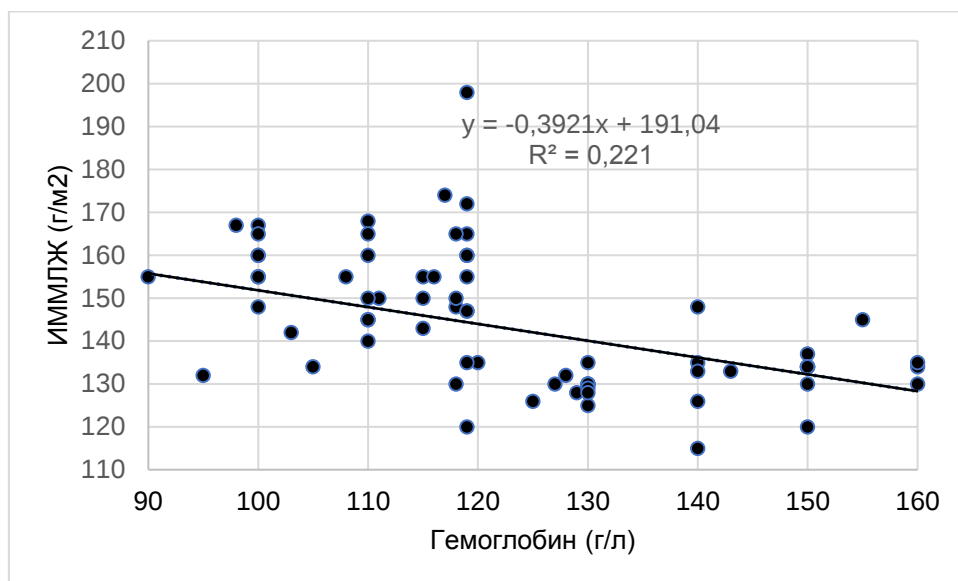


Рисунок 12. Связь снижения уровня гемоглобина с увеличением ИММЛЖ ($r = (-) 0,453$; $p < 0,001$) у больных ХБП 1-й группы

3.3. Анализ особенностей метаболизма железа у больных ХБП 1-2 стадий с анемией

Таким образом, из таблицы 5 следует, что среди 43 больных ХБП 1-2 стадий с анемией у всех выявлялся низкий ретикулоцитарный индекс и высокий уровень белка острой фазы воспаления – гепсидина (таблица 3), что подтверждало ее иммуновоспалительную природу.

Для АХЗ у всех 43 больных ХБП 1-2 стадий характерным также было сочетание пониженного коэффициента насыщения трансферрина железом - TSAT (ниже 12%) с нормальным или повышенным уровнем ферритина в сыворотки крови; таким образом у всех больных выявлялся относительный дефицит железа (таблица 5).

У всех 43 больных ХБП 1-2 стадий анемия имела характер гипорегенераторной (ретикулоцитарное число $Me\ 53\ (40; 59) \times 10^9/л$, индекс продукции ретикулоцитов $Me\ 1,5\ (1,1; 1,9)$, нормоцитарной ($MCV = Me\ 85\ (80; 100)$ фл. (табл. 6) с низким уровнем сывороточного железа и насыщения

железом трансферрина, но при этом нормальным или повышенным уровнем ферритина.

Таблица 6.

Характеристика АХЗ у обследованных пациентов (кинетические, морфологические показатели)

Показатель	1-я группа, n=43 (есть анемия: Hb < 120 г/л)	2-я группа, n=36 (нет анемии: Hb > 120 г/л)	p
Медиана – Me (квартиль 25, квартиль 75).			
Средний объем эритроцита (MCV), фл	85 (80;100)	87 (82;95)	0,402
Ретикулоцитарное число $\times 10^9/\text{л}$	53 (40;59)	95 (80;100)	$p < 0,01$
Индекс продукции эритроцитов (RPI)	1,5 (1,1;1,9)	2,5 (2;2,9)	$p < 0,05$
Железо, мкмоль/л	11,3 (9; 12)	16 (11; 19)	$< 0,05$
Насыщение трансферрина железом (TSAT), %	17 (14; 19)	23 (22; 25)	$< 0,001$
Ферритин, мкг/мл	169 (140; 200)	110 (100; 140)	$< 0,05$

При анализе показателей обмена железа у пациентов ХБП с АХЗ (n=43) выявлена сильная связь ($r = (-)0,856$; $p < 0,001$) повышения уровня гепсидина-25 со снижением насыщения трансферина железом (TSAT) [рисунок 12], что подтверждает важное значение гепсидина в контроле за реутилизацией железа при АХЗ.

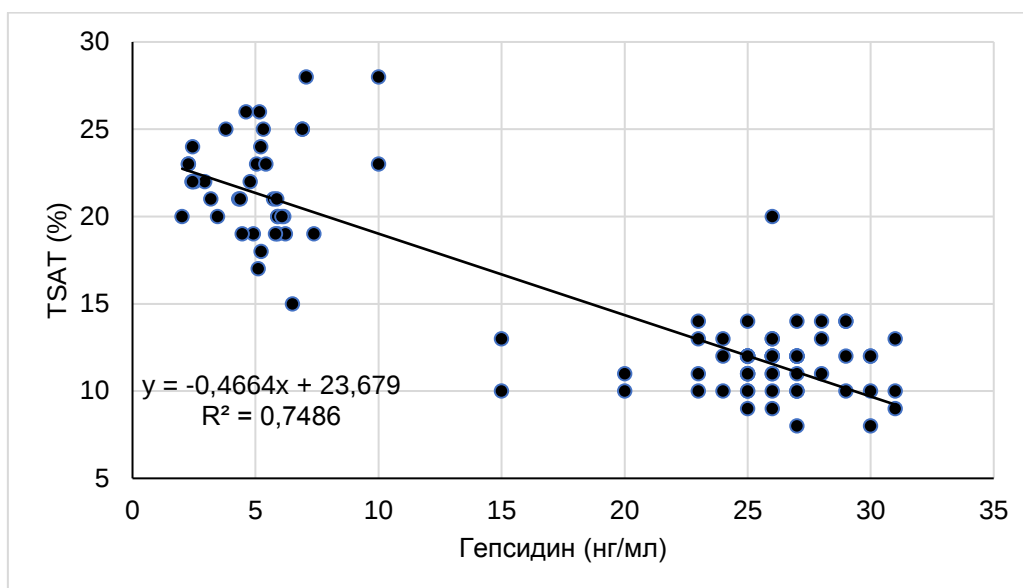


Рисунок 12. Связь повышения сывороточного уровня гепсидина со снижением уровня TSAT у больных ХБП 1-2 стадий с АХЗ (n=43)

Таким образом, у больных ХБП 1-2 стадий сохраняющаяся умеренная активность почечного поражения (протеинурия $> 0,5$ г/сутки, АД – АД $> 140/80$ мм рт. ст., снижение СКФ < 90 мл/мин) может инициировать иммуновоспалительный механизм нарушения эритропоэза, а развивающаяся анемия может привести к снижению продукции кардионефропротективного фактора белка s-Klotho.

3.4. Прогнозирования риска развития анемии хронических заболеваний (АХЗ) у больных хронической болезнью почек (ХБП) 1-2 стадий

Для определения наиболее значимых факторов развития АХЗ у 79 обследованных нами больных с ХБП на ранних стадиях течения (ХБП 1 и 2 стадий) была составлена логистическая регрессионная модель.

Построение логистической регрессионной модели осуществлялось методом пошагового включения всех ассоциированных с анемией факторов (интерферона γ , гепсидина-25, С-реактивного протеина, уровня скорости клубочковой фильтрации (СКФ), креатинина) с определением минимального набора предикторов оценки коэффициента детерминации R^2 , показывающего долю влияния установленных предикторов модели на дисперсию зависимой

переменной. Результаты построения регрессионной модели представлены в таблице 7.

Таблица 7.

Показатели регрессионной модели определения наиболее значимых факторов развития анемии хронических заболеваний (АХЗ) при хронической болезни почек (ХБП) у больных первичным хроническим гломерулонефритом (ХГН) и ГН при системных заболеваниях (СКВ, гранулематоз Вегенера) на ранних стадиях течения (ХБП 1 и 2 стадий).

Предикторы	Коэфф. регрессии (b)	Станд. ошибка	χ^2	p	Exp (b)	95% Доверительный интервал для Exp (b)	
						Нижнее знач.	Верхнее знач.
Гепсидин (пг/мл)	0,517	0,175	8,687	0,003	1,189	1,189	2,363
СКФ по CKD EPI	(-)0,090	0,045	4,056	0,004	0,914	0,837	0,998
Константа	(-)0,061	1,907	0,001	0,074	0,941		

Конкордантность двух анализируемых предикторов – гепсидина и скорости клубочковой фильтрации (СКФ) составила 92,5%, при этом вклад гепсидина в вероятность развития анемии хронических заболеваний (АХЗ) составил 86,6%, СКФ только 5,9%.

Следовательно, наиболее значимыми предикторами развития АХЗ у обследованных больных являлись гепсидин и СКФ, однако вклад последней на начальных стадиях ХБП минимален.

Статистически значимые для анализа параметры - чувствительность и специфичность предикторов была оценена при помощи ROC-анализа (рисунок 14).

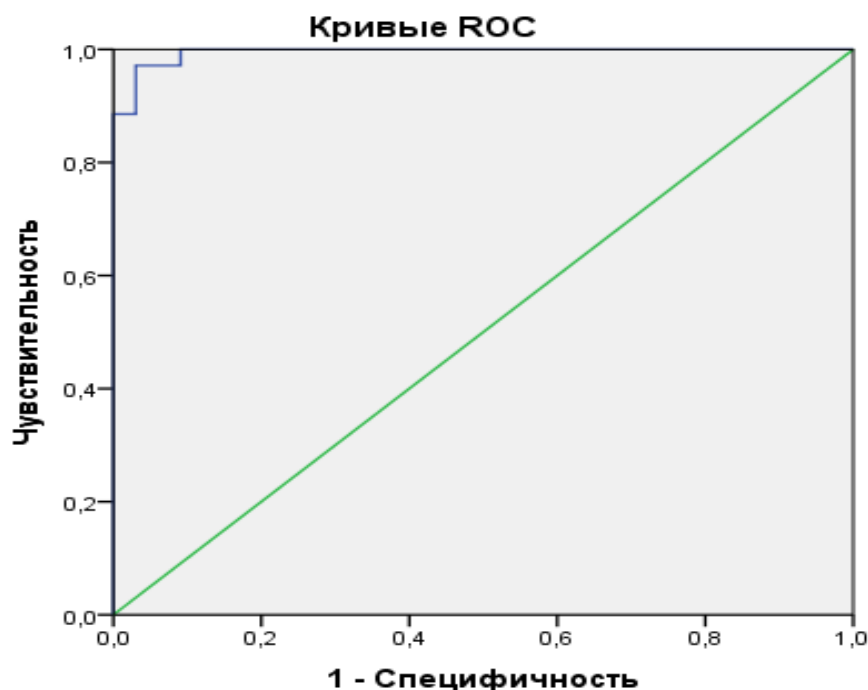


Рисунок 14. Результаты ROC- анализа для определения повышения сывороточной концентрации гепсидина в качестве предиктора развития АХЗ на ранних стадиях (1-2 стадиях) течения ХБП

Результаты ROC-анализа, в частности, показатель AUC (площадь под кривой) составил $0,995 \pm 0,005$ (ДИ 95% 0,985 - 1,000; $p < 0,001$), что свидетельствует о определяющем влиянии повышения сывороточной концентрации гепсидина > 25 пг/мл на риск развития анемии хронических заболеваний (АХЗ) у больных хронической болезнью почек (ХБП) на ранних стадиях течения (ХБП 1 и 2 стадий). Чувствительность гепсидина как предиктора (предсказателя) АХЗ составила 97,1%, специфичность – 96,7%. Общий процент корректного предсказания развития АХЗ у этой категории больных составил 96,9%.

Мы оценили также роль анемии (гемоглобин < 120 г/л) и СКФ в качестве прогностических факторов снижения продукции

нефрокардиопротективного белка s-Klotho по данным логистической регрессионной модели (таблица 8) на ранних стадиях ХБП (1-2 стадии).

Таблица 8.

Показатели регрессионной модели для определения роли анемии и СКФ в качестве диагностических предикторов снижения сывороточной концентрации белка s-Klotho при ХБП 1 и 2 стадий

Предикторы	Коэфф. регрессии (b)	Станд. ошибка	χ^2	p	Exp (b)	95% Доверительный интервал для Exp (b)	
						Нижнее знач.	Верхнее знач.
Анемия (гемоглобин < 120 г/л)	0,033	0,024	1,901	0,048	1,034	1,006	1,084
СКФ по СКД EPI	0,022	0,009	5,529	0,019	1,022	1,004	1,041
Константа	-2,473	0,865	8,165	0,004	0,084		

Конкордантность двух анализируемых предикторов – анемии и скорость клубочковой фильтрации (СКФ) составила 95,2%, при этом вклад анемии в вероятность развития снижения продукции белка Klotho составил 75,1%, СКФ на ранних стадиях ХБП (ХБП 1-2 стадий) только 20,1%.

По результатам ROC-анализа показатель AUC составил $0,733 \pm 0,060$ (ДИ 95% 0,616 – 0,849; $p=0,001$) (рисунок 15). Чувствительность модели с включением гемоглобина < 120 г/л в качестве предиктора снижения сывороточной концентрации s-Klotho при ХБП 1-2 стадий составила 70,3%,

специфичность – 61,8%. Общий процент корректных предсказаний развития АХЗ у этой категории больных составил 66,2%.

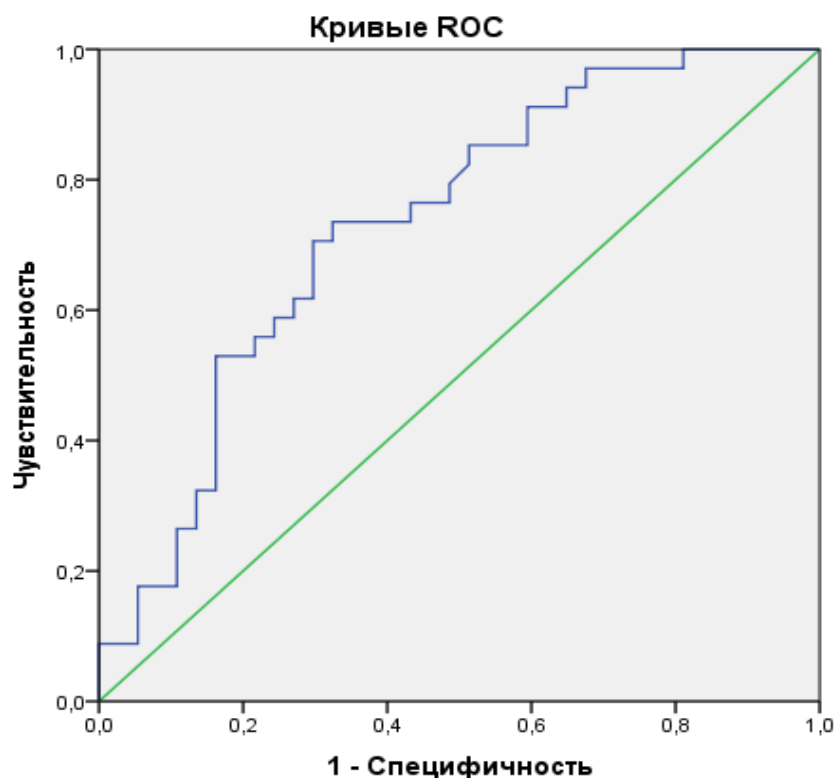


Рисунок 15. Результаты ROC-анализа для определения диагностического маркера снижения продукции s-Klotho у больных ХБП 1-2 стадий

Наряду с этим мы оценили влияние анемии и систолического АД (САД) на ранних стадиях ХБП на увеличение индекса массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ) у этой группы больных. По данным однофакторного регрессионного анализа наиболее значимыми факторами, коррелирующими с ИММЛЖ у больных ХБП 1-2 стадий являются уровень САД, гемоглобина и s-Klotho. Как следует из данных, представленных в таблице 9, при многофакторном анализе сохраняет свою значимость анемия и s-Klotho.

Таблица 9.

Независимые факторы, коррелирующие с ИММЛЖ у больных ХБП 1-2 стадий с АХЗ

Параметры	Линейный однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
	Beta	t	p	Beta	t	p
САД, мм рт. ст.	0,36	3,61	<0,001	0,29	2,99	0,06
Гемоглобин, г/л	(-)0,21	2,05	0,03	(-)0,29	1,99	0,04
s-Klotho	(-)0,34	2,01	0,04	(-)0,44	2,17	0,02

Несмотря на результаты многофакторного анализа, показавшего недостаточную значимость артериальной гипертензии ($p=0,06$) в формировании гипертрофии левого желудочка (ГЛЖ), не следует полностью отрицать ее роль как в формировании ГЛЖ, так и возможно - в снижении циркулирующей формы белка Klotho, поскольку известно, что ангиотензин II – установленный фактор риска снижения продукции почками белка Klotho [2. 6]. Это подтверждают результаты ранее проведенного в нашей клинике исследования показавшего, что в группе больных скорректированной АГ по сравнению с группой больных некорректированной АГ, отмечены более высокие показатели s-Klotho и менее выраженная степень ремоделирования миокарда, причем преимущественно среди тех больных, которым назначались ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) или сартаны [6].

3.5. Минимизация снижения сывороточной концентрации белка s-Klotho путем воздействия на активность основного заболевания и ранней коррекции относительного дефицита железа у больных хронической

болезнью почек (ХБП) 2 стадии с анемией хронических заболеваний (АХЗ)

Среди 43 больных ХБП 1-2 стадий с АХЗ, которым по результатам скрининга потребовалась оптимизация проводимой поддерживающей иммуносупрессивной терапии, у 22 больных ХБП 2-й стадии (все с системными заболеваниями) была также проведена коррекция относительного дефицита железа (повышение уровня TSAT > 20%) путем внутривенного введения железа. У всех 22 больных ХБП 2 стадии удалось быстро достичь целевого уровня гемоглобина (> 120 г/л). У этих же больных достоверно реже ($\chi^2 = 7,2$; $p < 0,05$) выявлялось снижение продукции белка Klotho и ремоделирование ЛЖ, чем среди больных, которым коррекция относительного дефицита железа не проводилась и восстановление уровня гемоглобина наблюдалось в более поздние сроки (таблица 10).

Таблица 10.

Преимущества ранней коррекции анемии хронических заболеваний (АХЗ) для предупреждения снижения продукции белка s-Klotho и формирования гипертрофии левого желудочка (ГЛЖ)

Показатель	Ранняя коррекция относительного дефицита железа (n=22)	Коррекция относительного дефицита железа не проводилась (n=21)
Гемоглобин, г/л	122±8,9	109±11,3
TSAT, %	35±6,2	17±3,4*
АД систолическое, мм рт. ст.	135±11,6	149±14,9
Эксцентрическая ГЛЖ, %	4,5	14,2*
s-Klotho, нг/мл	10±0,5	3,9±0,9*

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с больными, которым коррекция относительного дефицита железа не проводилась

Эффективность коррекции доступного для эритропоэза железа путем внутривенной инфузии венофера подтверждают следующие клинические наблюдения.

Клинические наблюдения

Клиническое наблюдение 1:

Больной М, 22 лет (история болезни (и/б.) 2704/34825) госпитализирован в нефрологическое отделение УКБ № 3 в связи с жалобами на общую слабость, усиление артериальной гипертензии (АД до 180 и 90 мм рт. ст.) при регулярном длительном приеме эналаприла в дозе 5 мг/сутки. Из анамнеза известно, что у пациента с мая 2009 года наблюдается следовая протеинурия, умеренная эритроцитурия. После эпизодов ОРВИ отмечалось усиление протеинурии до 1.25 г/сут и эритроцитурии (в общем анализе мочи по Нечипоренко 12 000), повышение уровня IgA до 2.5 норм. В 2015 г. во время очередного обострения нефрита при морфологическом исследовании ткани почки, полученной при биопсии, выявили гранулярные депозиты IgA в мезангиальной области клубочков. Заболевание почек было расценено как первичная IgA-нефропатия. Была начата иммуносупрессивная терапия ПЗ внутрь максимально 60 мг/сутки, плюс сочетанные «пульсы» ПЗ и ЦФА до ноября 2016 года суммарно введено 7 г ЦФА без эффекта. В июне 2016 года проведено лечение селлсептом (2 г/сут) в течение 4 мес, с эффектом: достигнута ремиссия заболевания. Проводилась поддерживающая терапия - метипред внутрь 8 мг/день, циклофосфан 100 мг/день.

При повторной госпитализации пациента в нефрологическое отделение УКБ № 3 в июне 2016 г.: общее состояние удовлетворительное, АД 150/90 мм рт.ст., пульс 76 уд. в мин, анемия (Hb 90 г/л), СОЭ 23 мм/ч, креатинин 100 мкмоль/л, СКФ (СКД-EP1) 75 мл/мин., протеинурия 0,9 г/сут, эритроцитурия 4 000 (в анализе мочи по Нечипоренко), IgA – 1,5 нормы, выявлен относительный железодефицит – сывороточное железо - 10 мкмоль/л, ферритин - 130 мкг/мл, % насыщения трансферрина железом - 16 %, ЛДГ - 125 ед/л (норма 135-225 Ед/л), гепсидин - 27 нг/мл (норма 0,6-10 нг/мл), Klotho (s-Klotho) – 0,02 нг/мл (норма 0,08-10 нг/мл), интерферон-γ - 26 нг/мл (норма 0,4-25 нг/мл); ИММЛЖ 155 г/м², почки по данным УЗИ

нормальных размеров, контуры ровные. Снижение гемоглобина и относительный железodefицит расценены как АХЗ вследствие сохраняющейся умеренной активности IgA-нефропатии, проявляющейся персистированием протеинурии, артериальной гипертонии, повышением сывороточного уровня интерферона – γ , гепсидина-25, повлекшая снижение продукции циркулирующей формы белка Klotho.

Проведена коррекция терапии, включающая увеличение дозы метипреда до 20 мг/сут, циклофосфана до 200 мг/сут, эналаприла до 10 мг/сутки. Проведено восполнение относительного железodefицита (TSAT повысился более 20%) путем в/в введения венофера в дозе 5 мл 1 раз в 2 недели в течение 1 мес. Проводимая терапия была эффективной: протеинурия снизилась до 0.07 г/сут., исчезла эритроцитурия, нормализовались уровень IgA, обмен железа и гемоглобина, достигнут целевой уровень АД.

Клиническое наблюдение 2.

Больная С. 32 лет (и/б. 2705/34832) госпитализирована в нефрологическое отделение УКБ № 3 с жалобами на отеки лица, голеней, общую слабость, артралгии кистей и стоп. В анамнезе субфебрилитет в течение многих лет, осложненный акушерский анамнез, тромбоз вен нижних конечностей и таза, кава-фильтр.

При осмотре: состояние средней степени тяжести, гиперстенического телосложения (ИМТ 28 кг/м²). АД 150/90 мм рт.ст., пульс 68 уд. в мин. При обследовании: Нв 95 г/л, СОЭ 20 мм/ч, креатинин 60 мкмоль/л, ЛДГ 156 ед/л, железо 6 мкмоль/л (норма 8,95- 30,43 мкмоль/л), ферритин 130 мкг/мл (норма более 100 мкг/мл), % насыщения трансферрина железом 6 % (норма более 20%), суточная протеинурия 1.0 г, эритроцитурия до 15 в п/з, ИММЛЖ - 132 г/м², по данным УЗИ размеры почек в норме, СКФ (СКД-ЕРІ) 120 мл/мин, повышение АТ к нативной ДНК до 2 норм, положительный АНФ, положительный волчаночный антикоагулянт, тромбоцитопения (100 тыс.

Ед/мкл). На основании клинических и лабораторных показателей у больной диагностирована СКВ с вторичным АФС-синдромом, цитокин-медиированная анемия (АХЗ). Проводимая терапия, включающая преднизолон 20 мг в сут, ранитидин 300 мг в сут, плаквенил 0,2 г/сут, антикоагулянты (прадакса 0,220 г/сут) внутрь, дезагреганты (курантил 75 мг х 2 раза в сутки) были эффективны в отношении активности основного заболевания: исчезли артралгии, протеинурия снизилась до 0,3 г/сутки, с помощью эналаприла достигнут целевой уровень АД, также нормализовался уровень АНФ, титр антител к ДНК, СОЭ снизилась до 15 мм/час, уровень гемоглобина повысился до 100 г/л. Доза преднизолона была постепенно снижена до 10 мг/день.

Через 3 мес пациентка была повторно госпитализирована для контрольного обследования и коррекции терапии. При обследовании: Нв- 99 г/л, СОЭ 22 мм/час, железо 5 мкмоль/л, ферритин 120 мкг/мл, % насыщения трансферрина железом 8 %, ЛДГ 150 ед/л, протеинурия 0,6 г/сутки, эритроциты 2000 (по Нечипоренко), креатинин 98 мкмоль/л, СКФ 72 мл/мин, гепсидин-25 30 нг/мл, s-Klotho 0,05 нг/мл, интерферон- γ - 28 нг/мл, АД 145/90 мм рт. ст., сохранялись нормальные титры АНФ, комплемента, анти-ДНК-антител. Учитывая сохраняющуюся активность заболевания, было рекомендовано повысить дозу преднизолона до 20 мг/сут, продолжить прием плаквенила в дозе 0, 2 г/сут, прадакса и курантила, оставить прежней дозу эналаприла. В связи с сохраняющейся анемией и относительным железодефицитом при наличии повышенного уровня гепсидина и интерферона- γ проведена коррекция железодефицита в/в введением железа (венофер в/в в дозе 5 мл 1 раз в 2 недели в течение 1,5 мес) с эффектом: насыщение трансферрина железом повысилось до 25%, а уровень гемоглобина достиг 110 г/л, отмечена ремиссия основного заболевания.

Клиническое наблюдение 3.

Больная С. 37 лет (и/б. 602/6778) госпитализирована в ревматологическое отделение УКБ№3 с жалобами на затруднение носового дыхания, образование корок на слизистой носа, миалгии, боли в суставах кистей, усиливающиеся после физической нагрузки, высыпания на коже предплечий, туловища, бедер в виде крапивницы, обильное шелушение кожи волосистой части головы, общую слабость и повышенную утомляемость, вариабельность АД (максимально до 150/80 мм рт. ст., адаптирована к 110/70 мм рт. ст.).

Состояние средней тяжести. ИМТ 19,8 кг/м². Отеков нет. Периферические л/узлы не пальпируются. Носовое дыхание затруднено. В легких дыхание везикулярное, хрипы и крепитация не выслушивается. ЧДД – 17 в мин. Границы сердца не расширены. Тоны сердца приглушены, ритмичные ЧСС=PS=66 в мин., АД 150/90 мм рт. ст. Живот при пальпации мягкий, безболезненный. Размеры печени по Курлову 9-8-7 см, селезенка не пальпируется, длинник селезенки 8 см.

НЬ - 80 г/л, СОЭ - 20 мм/ч, креатинин - 90 мкмоль/л, СКФ (СКД-ЕРІ) 70 мл/мин, ЛДГ 165 ед/л, сывороточное железо - 7 мкмоль/л, ферритин - 145 мкг/мл, % насыщения трансферрина железом 17 %, суточная протеинурия 0,9 г/сутки, ИММЛЖ - 155 г/м², по данным УЗИ размеры почек нормальные, контуры ровные.

Обнаружено увеличение в крови сANCA до 8,01 Ед/мл (норма 0-5); по данным КТ изменения в придаточных пазухах носа в рамках основного заболевания. При биопсии почки выявлен некротизирующий васкулит, ассоциированный с ANCA. Решено применить комбинированную иммуносупрессивную терапию, в т. ч. с использованием высоких доз глюкокортикоидов и цитостатиков (ритуксимаба).

Проводимая терапия, включала ритуксимаб (суммарно 6000 мг) в/в капельно, лозартан - 12.5 мг/сутки, бисопролол 10 мг/сутки, бисептол - 960 мг/сутки 3 дня в неделю, была эффективной: исчезли высыпания на коже,

артралгии, миалгии, восстановилось дыхание через нос, нормализовался уровень сANCA, уровень гемоглобина повысился до 90 г/л, однако сохранялся относительный дефицит железа.

Через 3,5 мес. госпитализирована повторно. При поступлении: отмечает слабость, Hb - 89 г/л, СОЭ - 22 мм/ч, креатинин - 100 мкмоль/л, СКФ (CKD-EPI) 69 мл/мин, ЛДГ 160 ед/л, сывороточное железо - 8 мкмоль/л, ферритин - 135 мкг/мл, % насыщения трансферрина железом 15 %, суточная протеинурия 0,5 г/сутки, АД на фоне приема лозартана 135/80 мм рт. ст., ИММЛЖ - 156 г/м², по данным УЗИ размеры почек нормальные, контуры ровные. С целью уточнения цитокин-медиированного генеза анемии дополнительно исследованы плазменные уровни гепсидина-25 и интерферона- γ .

Выявлено увеличение гепсидина до 30 нг/мл, интерферона- γ до 27 пг/мл, при этом уровень s-Klotho был снижен относительно нижней границы нормы до 0,04 нг/мл. Анемия расценена как АХЗ с характерным для нее нарушением обмена железа. Для коррекции относительного дефицита железа использовали венофер в/в в дозе 5 мл 1 раз в неделю в течение 1,5 месяца, Также при достижении целевого уровня насыщения трансферрина железом (TSAT 25%) отмечено повышение уровня гемоглобина до 115 г/л.

Таким образом, у всех 3-х пациентов обострение основного заболевания повлекло развитие АХЗ, что подтверждалось характерным для нее нарушением обмена железа – снижением уровня сывороточного железа и процента насыщения железом трансферрина при нормальном или даже повышенном уровне ферритина. Лечение АХЗ включало воздействие на основное заболевание, а также внутривенное введение железа в целях повышения содержания железа доступного для эритропоэза. В литературе также обсуждается применение препаратов эритропоэтина при значительном снижении уровня гемоглобина. В представленных наблюдениях, как и во

всей обследованной нами группе больных с АХЗ применения эритропоэтина в ее лечении не потребовалось.

Необходимо отметить, что у всех, обследованных больных с АХЗ была минимальная степень активности основного заболевания, при этом ни у кого не было низких показателей гемолитической активности комплемента, антител к кардиолипину, а также никаких других проявлений тромботической микроангиопатии (ТМА), что часто встречается у этой категории больных. Данные клинические примеры подчеркивают практическую направленность данной НИР. Лечение активности заболевания проводилось у этих пациентов до включения в исследование, что позволило достигнуть субклинической ремиссии заболевания, однако сохранялась анемия, которая была успешно скорректирована после оптимизации лечения основного заболевания и коррекции доступного для эритропоэза железа (TSAT > 20%).

Таким образом своевременная ранняя диагностика и применение разработанного метода может сделать прогноз благоприятным.

Обсуждение

По данным нашего исследования среди 79 больных хронической болезнью почек (ХБП) при первичном хроническом гломерулонефрите (ХГН) и ГН при системных заболеваниях (СКВ, гранулематоз Вегенера) на ранних стадиях течения (ХБП 1 и 2 стадий) более, чем у половины - 43 (54,4%) диагностирована анемия хронических заболеваний (АХЗ). У всех больных ХБП с АХЗ отмечались значимо ($p < 0,001$) более высокие показатели суточной протеинурии и артериальной гипертензии, СОЭ, а также сывороточной концентрации интерферона γ и гепсидина, чем у 36 больных без анемии. Диагностика АХЗ среди других, наблюдаемых у наших больных с ХБП форм анемии (ЖДА, Кумбс-положительной гемолитической анемии) нами традиционно основывалась на анализе особенностей метаболизма железа, свойственного этой форме анемии – низкий уровень сывороточного железа и насыщения железом трансферрина, при нормальном или повышенной уровне сывороточного ферритина.

На основании литературных данных известно, что выраженность анемии на ранних стадиях хронической болезни почек (ХБП) зависит от первичного заболевания почек. Например, для больных ревматоидным артритом характерно развитие анемии на фоне сохранной азотовыделительной функции почек и относительная устойчивость к общепринятым схемам терапии [4, 6-8]. Однако публикаций, где проводился сравнительный анализ частоты анемии хронических заболеваний (АХЗ) и особенностей ее диагностики и лечения у больных первичным ГН и ГН при системных заболеваниях в доступной литературе мы не обнаружили. В нашем исследовании, у всех 43 обследованных нами больных с АХЗ частота ее выявления среди больных системными заболеваниями была в 2,7 раза больше по сравнению с частотой анемии среди больных первичным ГН (27,8% против 10,1%, $p < 0,05$). Известно также, что для пациентов, принимавших ранее цитостатические препараты по поводу активности

паранеопластического процесса, ревматоидного артрита типично снижение чувствительности костного мозга к средствам, стимулирующим гемопоэз, а именно ЭСС [4, 9], что учтено нами при формировании обследуемых групп больных с АХЗ при проведении данного исследования.

Ведущее значение воспалительного (цитокин-опосредованного, цитокинмедиированного) механизма в развитии анемии хронических заболеваний (АХЗ) отчетливо прослеживается у наблюдаемых нами больных ХБП 1-2 стадий. Так, частота и тяжесть анемии у данной категории больных четко коррелировала с персистирующей активностью предрасполагающего заболевания. Несмотря на сохраняющуюся в период скрининга у обследованных больных с АХЗ субклиническую ремиссию гломерулонефрита и нефрита при системных заболеваниях, тем не менее у большинства из них уровень протеинурии, СОЭ, интерферона- γ и гепсидина-25 были значимо выше, нежели у пациентов без наличия анемии. Характерным признаком АХЗ у больных ХБП 1-2 стадий также являлось низкое содержание ретикулоцитов в связи с нарушением созревания эритроцитов. Известно, что при АХЗ отмечается недостаточная реакция клеток-предшественниц на стимуляцию эндогенным эритропоэтином, что соответствует тяжести системного заболевания и концентрации циркулирующих цитокинов [2, 6, 8, 25].

В настоящее время утвердилось представление об анемии хронических заболеваний (АХЗ) как иммунокомплексном процессе, при котором изменения в гомеостазе железа, пролиферативной активности эритроидных клеток-предшественниц и продукции эритропоэтина индуцируется цитокинами и клетками ретикулоэндотелиальной системы [6, 25].

Длительно (более 3-х мес) не корригируемая и выраженная анемия у больных ХБП, как известно, способствует формированию гиперкинетического типа кровообращения, характеризующегося увеличением венозного возврата к сердцу, сердечного выброса и усилением

артериальной гипертонии [2-5, 7]. За последнее время опубликованы данные двух рандомизированных контролируемых исследований о влиянии оптимизации уровня гемоглобина на показатели сердечной деятельности и структуру миокарда [26, 43]. McMahon и соавт. [52] выявили выраженное снижение увеличенного сердечного выброса при поддержании концентрации гемоглобина в физиологических условиях по сравнению с больными с уровнем гемоглобина ≤ 100 г/л. В исследовании Foley R.N. и соавт. [34] также обнаружено положительное влияние достижение целевого уровня гемоглобина (115 г/л) на показатели сердечного выброса, однако авторы работы не наблюдали признаков обратного развития тоногенной либо миогенной дилатации миокарда левого желудочка. В нашем исследовании среди пациентов с АХЗ более часто, чем у больных без анемии отмечалось значимое увеличение систолического артериального давления и показателей индекса массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ).

В основе АХЗ у наблюдаемых нами больных лежит многофакторный механизм - повышение уровня интерферрона γ и белка острой фазы воспаления (гепсидина-25), а у части больных гранулематозом Вегенера С-реактивного протеина, вызванный сохраняющейся даже минимальной активностью основного заболевания. С помощью коэффициентов парной корреляции Пирсона установлена ассоциация каждого из этих факторов с развитием АХЗ. Уже на ранних стадиях ХБП установлена также слабая прямая корреляция СКФ с уровнем гемоглобина.

По данным однофакторного регрессионного анализа значимыми факторами, ассоциированными с ИММЛЖ у больных хронической болезнью почек (ХБП) 1-2 стадий с АХЗ являлись уровень систолического АД, уровень гемоглобина и s-Klotho. При многофакторном анализе сохраняет свою значимость анемия и s-Klotho. Эти результаты позволяют обсуждать вклад анемии в формирование как дефицита белка Klotho, так индуцируемой ими ГЛЖ у наблюдаемых нами больных ХБП.

Возможно эти механизмы и объясняют высокую частоту ССО у больных ХБП уже на ранних стадиях ее течения. Важным является тот факт, что анемия, как и артериальная гипертензия – потенциально модифицируемые факторы риска.

При прогнозировании риска развития анемии хронических заболеваний (АХЗ) у больных ХБП 1-2 стадий у больных первичным гломерулонефрите (ГН) и ГН при системных заболеваниях (СКВ, гранулематоз Вегенера) по данным составленной нами логистической регрессионной модели, среди многообразия факторов вклад в ее развитие повышения более 25 нг/мл в сыворотке крови гепсидина составил 86,6%, скорость клубочковой фильтрации (СКФ) более 60 мл/мин, рассчитанной по уравнению СКД EPI - 5,9%. Поэтому, мы полагаем, что повышение сывороточной концентрации гепсидина обладает более полной прогностической информацией риска развития АХЗ среди больных ХБП 1-2 стадий, по сравнению с другими маркерами - обострением основного заболевания (протеинурией, артериальной гипертензией) и системного воспаления – интерфероном γ , С-реактивным протеином, а также СКФ.

По данным этой же логистической регрессионной модели снижение гемоглобина < 120 г/л с 70,3% чувствительностью и 61,8% специфичностью предсказывает снижение сывороточной концентрации белка s-Klotho у этой категории больных. Возможно это вызвано влиянием таких факторов, как усугубление гипоксией тубулоинтерстициальной ткани почек при анемии. Эти данные позволяют предположить, что уровень гемоглобина у больных хронической болезнью почек (ХБП) имеет прогностическое значение касательно сохранности или усиления способности почек к продукции Klotho как возможного гомеостатического фактора в условиях нарастания дисфункции почек. На основании полученных данных правомочен вывод о том, что сывороточная концентрация Klotho может служить диагностическим

маркером не только почечного повреждения, но и предсказателем анемии и отражать ее тяжесть у больных ХБП.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что анемия и снижение продукции белка s-Klotho развиваются параллельно, взаимно отражая степень нарушения и эритропоэза и дисфункции почек. Механизмы снижения продукции белка s-Klotho на ранних стадиях ХБП изучены недостаточно.

По-видимому анемия - это лишь один из факторов снижения продукции s-Klotho. В последнее время обсуждается роль и других не менее значимых факторов - оксидативного стресса, повышения ангиотензина II и непосредственно воспаления [9]. Установлено, что адекватная продукция Klotho обеспечивает антиоксидантный, антиапоптозный эффекты и препятствует преждевременному старению организма [6, 9].

В недавних экспериментальных исследованиях, подтверждено, что циркулирующая форма белка Klotho (s-Klotho) может функционировать как гуморальный фактор, который защищает сердечно-сосудистую систему [9]. Сверхэкспрессия Klotho обеспечивает как почечную, так и кардиоваскулярную протекцию. Высвобождение гена Klotho, запускаемое аденовирусом в модели атеросклероза у крыс, повышение эндотелий-зависимого синтеза NO-синтеза предотвращает неблагоприятное ремоделирование сосудистой стенки [6, 9].

В ранее проведенном в нашей клинике исследовании показано, что циркулирующая форма Klotho (s-Klotho) оказывает плеiotропные эффекты, функционируя как гуморальный фактор, защищающий сердечно-сосудистую систему. Полагают, что адекватная экспрессия s-Klotho обеспечивает как почечную, так и кардиоваскулярную протекцию [9]. У наблюдаемых нами больных ХБП и АХЗ с дефицитом s-Klotho отмечались более высокий уровень протеинурии и стойкое повышение уровня АД. С другой стороны, в экспериментальных исследованиях показано, что повышение выработки

Klotho сопровождалось уменьшением протеинурии и существенным снижением ангиотензина II у гипертензивных мышей с ХГН [9, 17]. При этом увеличенная выработка Klotho сочеталась с лучшей функциональной способностью почек.

Мы полагаем, что профилактика дефицита s-Klotho путем ранней коррекции анемии у пациентов с ХБП является перспективным направлением в совершенствовании методов кардио-нефропротективной стратегии.

Основным терапевтическим принципом в лечении анемии хронических заболеваний (АХЗ), в том числе и у больных с ХБП является лечение основного заболевания, приведшего к развитию анемии. Так, на примере ревматоидного артрита Moreland R.W. et. al. [56] продемонстрировано увеличение уровня гемоглобина у пациентов, успешно леченных антителами к фактору некроза опухолей - α (инфликсимаб – «Ремикейд»). Эффективность коррекции АХЗ путем подавления активности некротизирующего васкулита, ассоциированного с ANCA ритуксимабом демонстрирует и представленное нами наблюдение (клиническое наблюдение № 3).

В настоящее время назначение препаратов железа считают показанным у больных анемией хронических заболеваний (АХЗ), сочетающейся с абсолютным и даже с относительным дефицитом железа с целью улучшения снабжения им костного мозга. Однако терапия железом имеет противопоказания, так назначение препаратов железа не следует рекомендовать больным АХЗ, имеющим высокий уровень ферритина, из-за опасности осложнений. Следует иметь в виду, что назначения железа внутрь при АХЗ малоэффективно, учитывая большое значение нарушений всасывания Fe^{2+} в 12-перстной кишке при АХЗ, при этом избыток железа в просвете кишечника продуцирует рост бактерий и способствует появлению эпизодов бактериемий, особенно опасных у больных с тяжелой анемией. Кроме того, терапия железом в условиях продолжительной иммунной

активности может способствовать образованию высокотоксичных гидроксильных радикалов, приводящих к повреждению тканей и дисфункции эндотелия с повышением риска острых кардиоваскулярных осложнений [6, 8, 25].

Имеется достаточно публикаций, свидетельствующих о том, что парентеральная терапия железом, а при необходимости и рекомбинантным эпоэтином, ингибируя образование ФНО- α , уменьшала активность заболевания у больных ревматоидным артритом и с ХБП [Kaltwasser J.P. et al. [44].

Результаты, полученные в экспериментальных исследованиях, свидетельствуют о возможности с помощью анти-гепсидин антител подавлять гиперпродукцию гепсидина при анемии хронических заболеваний, тем самым профилактировать развитие АХЗ, а также оптимизировать лечение анемии [6, 8, 25, 60].

Таким образом, патогенез анемии хронических заболеваний (АХЗ) характеризуется многофакторностью при ведущем значении гиперпродукции интерферона γ и контролируемого им белка острой фазы воспаления гепсидина. Наиболее характерным признаком этой анемии является ретенция восстановленного железа в ретикулоэндотелиальной системе под влиянием активированных цитокинов. Трактовка анемии как АХЗ предполагает, в первую очередь, проведение дифференциального диагноза с железодефицитной анемией из-за свойственного обеим формам снижения содержания сывороточного железа и насыщения железом трансферрина. Важным показателем ретенции железа при АХЗ является повышение в крови ферритина или снижение отношения уровня в крови растворимого рецептора трансферрина к логарифму концентрации ферритина менее 1, особенно у больных со смешанными формами анемии [4, 6, 70].

Основным принципом лечения АХЗ является подавление хронического воспаления, приведшего к ее развитию. Определение показаний к назначению препаратов железа и эпоэтина требует дифференцированного подхода в каждом отдельном случае [6, 10].

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что у больных первичным гломерулонефритом (ГН) и ГН при системных заболеваниях на ранних стадиях ХБП при наличии персистирующей активности поражения почек (протеинурия, артериальная гипертензия, снижение СКФ) выявляется анемия хронических заболеваний (АХЗ), чаще при системных заболеваниях (СКВ, гранулематоз Вегенера), чем при первичном ГН. Наличие АХЗ ассоциировано со снижением циркулирующей формы белка Klotho (s-Klotho), как показателя (критерия) кардиоваскулярного риска при ХБП. Ранняя коррекция анемии с поддержанием целевого уровня гемоглобина и железа замедляет снижение sKlotho, прогрессирование ХБП и формирование ГЛЖ.

Исследование сложных патогенетических механизмов формирования АХЗ при хронической болезни почек (ХБП) и их взаимодействия представляет важную клиническую и научно-исследовательскую задачу, что обусловлено существенной ролью анемии в отношении прогрессирования ХБП, а также ее осложнений, в первую очередь сердечно-сосудистых осложнений, представляющих серьезную угрозу жизни пациентов. Одним из важных механизмов анемии при ХБП является изменение метаболизма железа за счет нарушения регуляции транспортных систем, знание о взаимодействии которых в последние годы расширилось за счет выявления новых маркеров и понимания их роли в обмене железа. Вследствие этого изучение новых и детализация значения традиционных патогенетических связей позволит усовершенствовать стратегию прогнозирования и диагностики анемии при ХБП[16].

Полученные нами данные по маркерам иммунного воспаления и гематологическим показателям кроветворения позволяют рекомендовать разработанный метод оценки сывороточных уровней гепсидина, гамма-интерферона, s-Klotho для выявления АХЗ и ее дифференциальной диагностики уже на ранних стадиях ХБП у больных первичным гломерулонефритом (ГН) и ГН при системных заболеваниях с дальнейшей коррекцией противоанемической терапии с нефрокардиопротективной целью.

Однако необходимо отметить, что многое в отношении определения статуса метаболизма железа и применения железа, особенно – внутривенно – у больных с ХБП на 1-2 стадиях остается неизвестным, поэтому важный вопрос о том, что лежит в основе ответа на терапию препаратами железа, то есть какие лабораторные тесты являются лучшими для принятия решения в отношении коррекции лечения анемии препаратами железа – остается открытым. Возможно потому что данное исследование небольшое, короткое и фокусируется на суррогатном исходе, таком как увеличение уровня гемоглобина. Возможным вариантом отсутствия ответа на внутривенную терапию препаратами железа является наличие у больного гепсидинпродуцирующей аденомы, или коморбидности. Помимо этого возможны мутации гена гемоглобина или токсичность препаратов железа, как варианты позднего ответа на терапию препаратами железа.

Возможно, что оценка данных маркеров иммунного воспаления станет легкодоступным клиническим методом определения относительного и абсолютного дефицита железа (ДЖ), который могли бы использовать в качестве «золотого стандарта». В некоторых исследованиях, кроме маркеров депонирования (ферритин) и возможности транспортировки (КНТ) железа, использовались функциональные маркеры содержания железа в эритроцитах, таких как гипохромные эритроциты или содержание гемоглобина в

ретикулоцитах. Однако эти маркеры трудно использовать в клинических исследованиях, они не измеряются в повседневной практике и их превосходство по сравнению с общепринятым клиническим определением ДЖ не установлено, что является не только важным в отношении АХЗ, но и нефрогенной анемии, присоединяющейся на поздних стадиях ХБП (3-4 стадии ХБП), а также в отношении посттрансплантационной анемии.

Выводы

1. У больных первичным гломерулонефритом (ГН) и ГН при системных заболеваниях на ранних стадиях хронической болезни почек (ХБП) (1-2 стадии ХБП) при наличии активности ГН (протеинурия $> 0,5$ г/сут, артериальная гипертензия $> 140/80$ мм рт. ст., снижение СКФ < 90 мл/мин) выявляется анемия, отвечающая критериям анемии хронических заболеваний (АХЗ), частота которой в 3.3 раза больше чем среди больных первичным ГН.
2. Для больных с АХЗ характерно выявление биомаркеров активного иммунного воспаления – повышение интерферона- γ и гепсидина-25 в сыворотке крови, своеобразие нарушений обмена железа.
3. Наличие АХЗ уже на ранних стадиях ХБП ассоциируется с уменьшением продукции белка s-Klotho ($r=0,356$; $p<0,001$) - показателя (критерия) кардиоваскулярного риска при ХБП. Снижение гемоглобина и уменьшение сывороточной концентрации Klotho сопровождаются усилением артериальной гипертензии и коррелирует со степенью ремоделирования миокарда ЛЖ – величиной ИММЛЖ (соответственно $r= (-) 0,452$; $p<0,01$ и $r= (-)0,587$; $p<0,001$).
4. Повышение сывороточной концентрации гепсидина (> 25 нг/мл) является независимым предиктором развития анемии хронических заболеваний (АХЗ) на ранних стадиях (1-2 стадиях) течения ХБП (вклад гепсидина в вероятность развития АХЗ - $86,6\%$, тогда как СКФ – $5,9\%$). Снижение продукции белка s-Klotho также ассоциировано с повышением уровня гепсидина в сыворотке крови.
5. Ранняя коррекция АХЗ с поддержанием целевого гемоглобина ≥ 120 г/л и относительного дефицита железа – TSAT $\geq 20\%$ позволяет обеспечить профилактику снижения продукции белка s-Klotho и формирование ГЛЖ.

Практические рекомендации

1. У больных хроническим гломерулонефритом (ГН) и ГН при системных заболеваниях уже на ранних стадиях течения (хроническая болезнь почек (ХБП) 1-2 стадий) при развитии анемии помимо определения традиционных показателей целесообразно оценивать динамику в сыворотке крови гепсидина и s-Klotho, являющихся информативными маркерами развития анемии хронических заболеваний (АХЗ) и предикторами неблагоприятного прогноза.
2. Ранняя коррекция дефицита железа доступного для эритропоэза (сывороточное железо и насыщение трансферина железом) с нормализацией уровня гемоглобина (более 120 г/л) снижает риск увеличения систолического АД и формирования ГЛЖ.
3. У больных ХБП 1-2 стадий с АХЗ, которым удастся достичь и поддерживать целевой уровень гемоглобина (> 120 г/л) возможно увеличение продукции кардио-нефропротективного фактора белка s-Klotho, причем, как правило, среди тех больных, у которых для коррекции сопутствующего дефицита железа, учитывая особенности обмена железа при АХЗ (ретенция в РЭС и нарушение всасывания в ЖКТ), использовался внутривенный способ его введения.
4. Определение сывороточного уровня гепсидина можно использовать в качестве раннего биомаркера иммунного воспаления, а также патогенетического фактора, выявление которого позволит проводить дифференциальный диагноз между анемией, связанной с воспалением и эпоэтиндефицитной анемией.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Милованова, Л.Ю., Милованов, Ю.С., Кудрявцева, Д.В., Маркина, М.М., Милованова, С.Ю., Козловская, А.В., Лебедева, М.В., Бекетов, В.Д., Моисеев, С.В., Мухин, Н.А., Фомин, В.В., Свистунов, А.А. Роль морфогенетических белков FGF-23, Klotho и гликопротеина склеростина в оценке риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и прогноза хронической болезни почек/ Л.Ю. Милованова, Ю.С. Милованов, Д.В. Кудрявцева, М.М. Маркина, С.Ю. Милованова, А.В. Козловская, М.В. Лебедева, В.Д. Бекетов, С.В. Моисеев, Н.А. Мухин, В.В. Фомин, А.А. Свистунов// Терапевтический архив.- 2015.- Том 87(№ 6).- С. 10-16. – 10 февраля DOI:10.17116/terarkh201587610-16
2. Милованов, Ю.С., Мухин, Н.А., Козловская, Л.В., Милованова, С.Ю., Маркина, М.М. Влияние коррекции анемии на продукцию циркулирующей формы морфогенетического белка α -Klotho у больных с ЗБ-4 стадиями хронической болезни почек: новое направление кардионефропротекции/ Ю.С. Милованов, Н.А. Мухин, Л.В. Козловская, С.Ю. Милованова, М.М. Маркина//Терапевтический архив.- 2016.- Том 88(№ 6)- С.21-25. -25 февраля DOI:10.17116/terarkh201688621-25
3. Милованов, Ю.С., Козловская, Л.В., Милованова, Л.Ю., Маркина, М.М., Козлов, В.В., Таранова, М.В., Фомин, В.В. Факторы риска развития анемии на ранних стадиях хронической болезни почек/ Ю.С. Милованов, Л.В. Козловская, Л.Ю. Милованова, М.М. Маркина, В.В. Козлов, М.В. Таранова, В.В. Фомин// Терапевтический архив.- 2017.- Том 89(№ 6).- С.41-47.-14 февраля <https://doi.org/10.17116/terarkh201789641-47>
4. Markina M, Milovanova L, Kozlovskaya L, Mukhin N, Milovanova S, Fomin V, Milovanov Yu. Impact of anemia correction therapy on cardiovascular risk marker-serum soluble alpha Klotho protein in chronic kidney disease patients. Nephrology Dialysis Transplantation 2016 May; 31 (suppl 1): i197-i198

doi:10.1093/ndt/gfw166.15

Список литературы

- 1 Автореферат: Будылев С.А. – «Особенности коморбидного статуса у пациентов с хронической почечной недостаточностью», М., 2012 – автореферат доступен на страницах сайта: <http://medical-diss.com/medicina/>
- 2 Автореферат диссертации: Пчелин И.Ю. и соавторы – «Патогенетические факторы и клинические особенности анемии у пациентов с ранними стадиями диабетической нефропатии»-СПб, 2012 – автореферат доступен на страницах: <http://medical-diss.com/medicina/>
- 3 Андреевич Н.А, Балева Л.В. Анемия хронических заболеваний. Российский медицинский журнал. 2014; 2: 50-55.
- 4 Добронравов В. А., Смирнов А. В. Анемия и хроническая болезнь почек // Анемия. 2005
- 5 Клинические практические рекомендации KDIGO по анемии при хронической болезни почек 2012 - Перевод с английского А.Ю. Земченкова под редакцией Е.В. Захаровой; Нефрология и диализ Т.15, № 1 2013, С. 14-53
- 6 Козловская (Лысенко) Л.В., Милованов Ю.С. Анемии. Краткое руководство. Под ред. Акад. РАН Н.А. Мухина. 2016. 120 с.
- 7 Козловская Л.В., Милованов Ю.С., Милованова С.Ю. Особенности течения и лечения анемии у больных с поражением почек при системных заболеваниях. Клиницист. 2008; 2: 16-22
- 8 Козловская Л.В., Рамеев В.В., Чеботарева Н.В, Милованов Ю.С., Саркисова И.А. Анемия хронических заболеваний. Врач. 2006; 4:17-20.
- 9 Милованова Л.Ю., Милованов Ю.С., Козловская Л.В. Нефрокардиопротективная роль циркулирующей формы белка Klotho при хронической болезни почек. Клиническая нефрология. 2013; 3: 7-9.
- 10 Милованов Ю.С., Милованова Л.Ю., Добросмыслов И. А. Железа (III)

- гидроксид сахарозный комплекс (венофер) и его копии в лечении анемии у больных хронической болезнью почек: на что ориентироваться при выборе препарата? Клин. Мед. 2012; 1: 49-50.
- 11 Милованов Ю.С., Милованова С.Ю. – Анемия при диабетической нефропатии –Лечащий врач- Медицинский научно-практический портал: <https://www.lvrach.ru/2008/03/4906372/>
 - 12 Национальные клинические рекомендации по лечению отдельных нефропатий/Под.ред.: Е.М. Шилова. Сборник клинических рекомендаций: Аспекты лечения ХБП: Лечение анемии – Ассоциация нефрологов, М.: «Белый ветер», с. 230-231
 - 13 Обновленные Российские национальные рекомендации по диагностике и лечению анемии при хронической болезни почек в редакции 2014 г. РДО и Общество нефрологов России. 32 с.
 - 14 Рукавицин О.А. Анемия хронических заболеваний: отдельные аспекты патогенеза и пути коррекции. Онкогематология. 2016; 11: 37-45.
 - 15 Румянцев А.Г., Масчан А.А. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению анемии хронических болезней. ФГБУ ФНКЦ ДГОП им. Дмитрия Рогачева МЗ России. 2014: 1-9.
 - 16 Лапина, Е.С. Особенности феррокинетики и течения анемии у пациентов с хронической болезнью почек, получающих гемодиализ: дис. ...канд.мед.наук; 14.01.04 / Лапина Екатерина Сергеевна. - Ростов-на-Дону, 2016.- 129с.
 - 17 Плотникова, А.А. Клиническое значение определения сывороточной концентрации морфогенетических белков FGF-23b, KLOTNO у больных хронической почечной недостаточностью - автореферат дис. ... канд.мед.наук: 14.01.29 / Плотникова Александра Александровна – М., 2015.- 25с.

- 18 Парсункова, К.А. Цитокиновый профиль у больных с диссеминированной меланомой в ходе вакцинотерапии: автореферат дис. ... канд.мед.наук: 14.01.12 / Парсункова Кармен Анатольевна –М., 2010.- 26с.

- 19 Лобанова, Н.А. Значение метаболических нарушений в генезе анемии у больных с хронической почечной недостаточностью: автореферат дис. ... канд.мед.наук: 14.01.04 / Лобанова Надежда Анатольевна. - Нижний Новгород, 2010. - 24 с.

- 20 Гусева, В.М. Прогнозирование исходов хронической болезни почек у больных с сердечно-сосудистой патологией в старческом возрасте–дис. ...канд.мед.наук: 14.01.30/ Гусева Виктория Михайловна.- Самара, 2016. -184с.

- 21 Милованов, Ю.С. Оптимизация лечения больных хроническим гломерулонефритом и нефритом при системных заболеваниях с почечной недостаточностью на додиализном этапе- автореферат дис. докт.мед.наук: 14.00.48/Милованов Юрий Сергеевич.- Москва, 2007.- 41с.

- 22 Милованова, Л.Ю., Милованов, Ю.С., Козловская, Л.В., Мухин, Н.А. Сывороточные уровни морфогенетических белков – фактора роста фибробластов-23 (FGF-23) И Клото (KLOTНО) при ХБП клиническое значение/ Л.Ю. Милованова, Ю.С. Милованов, Л.В. Козловская, Н.А. Мухин// Клиническая нефрология.- 2013.- № 2.- С. 10-18.

- 23 http://www.rusmedserv.com/files/labdiag/07_Anemii.pdf [Электронный ресурс]

- 24 Al–Ahmad A, Rand WM, Manjunath G, Konstam MA, Salem DN, Levey AS, Sarnak MJ. Reduced kidney function and anemia as risk factors for

- mortality in patients with left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2001 Oct; 38(4):955–62.
- 25 Agarwal N., Prchal J.T. Anemia of chronic disease (anemia of inflammation). *Acta Haematol*. 2009; 122(2–3): 103–108.
 - 26 Armitage A.E., Eddowes L.A., Gileadi U. et al. Hepcidin regulation by innate immune and infectious stimuli. *Blood*. 2011; 118:4129.
 - 27 Bertero M.T., Caligaris-Cappio F. Anemia of chronic disorders in systemic autoimmune disease. *Hematologica*. 1997; 82: 375-381.
 - 28 Boyce M, Warrington S, Cortezi B, et al. Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of the anti-hepcidin Spiegelmer lexaptepid pegol in healthy subjects. *Br J Pharmacol* 2016; 173:1580
 - 29 Brugnara C. Iron deficiency and erythropoiesis: new diagnostic approaches. *Clin Chem* 2003; 49:1573
 - 30 Cash J.M., Slars D.A. The anemia of chronic disease: spectrum of associated diseases in series of unselected hospitalized patients. *Am. J. Med*. 1989; 87: 638.
 - 31 Cooke K.S., Hinkle B., Salimi-Moosavi H. et al. A fully human anti-hepcidin antibody modulates iron metabolism in both mice and nonhuman primates. *Blood*. 2013; 122:3054.
 - 32 Cullis J.O. Diagnosis and management of anaemia of chronic disease: current status. *Br. J. Haematol* 2011; 154:.289.
 - 33 Felker G.M., Shaw L.K., Stough W.G., O'Connor C.M. Anemia in patients with heart failure and preserved systolic function. *Am Heart J*. 2006 Feb; 151 (2): 457-62.
 - 34 Foley R.N., Parfrey P.S., Morgan J. et al. Effect of hemoglobin levels in hemodialysis patients with asymptomatic cardiomyopathy. *Kidney Int* 2000; 58: 1325–1335
 - 35 Fung E, Nemeth E. Manipulation of the hepcidin pathway for therapeutic

- purposes. *Haematologica* 2013; 98:1667
- 36 Ganz T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood* 2011; 117:4425
- 37 Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Annu. Rev. Med.* 2011; 62: 347-360.
- 38 Ganz T. Molecular pathogenesis of anemia of chronic disease. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 46:554
- 39 Ganz T., Nemeth E. Iron sequestration and the anemia of inflammation. *Semin. Hematol.* 2009; 46: 387-393.
- 40 Ganz T, Olbina G, Girelli D, et al. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood* 2008; 112:4292
- 41 Girelli D, Nemeth E, Swinkels DW. Hepcidin in the diagnosis of iron disorders. *Blood* 2016; 127:2809
- 42 Gardenghi S., Renaud T.M., Meloni A. et al. Distinct roles for hepcidin and interleukin-6 in the recovery from anemia in mice injected with heat-killed *Brucella abortus*. *Blood*. 2014; 123:1137
- 43 Infusino I, Braga F, Dolci A, Panteghini M. Soluble transferrin receptor (sTfR) and sTfR/log ferritin index for the diagnosis of iron-deficiency anemia. A meta-analysis. *Am J Clin Pathol* 2012; 138:642
- 44 Kaltwasser JP, Hansen C, Oebike Y, Werner E: Assessment of iron availability using stable Fe. *Eur J Clin Invest* 21 : 436 –442, 1991
Cross Ref Medline Google Scholar
- 45 Kemna E, Pickkers P, Nemeth E, et al. Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood* 192005; 106:1864.
- 46 Kim A, Fung E, Parikh SG, et al. A mouse model of anemia of inflammation: complex pathogenesis with partial dependence on hepcidin. *Blood*. 2014; 123:1129
- 47 Kozlovskaya L.V., Milovanov Yu.S., Milovanova L.Yu. Optimal target Hemoglobin level in patients with chronic kidney disease and anemia treated

- with erythropoiesis-stimulating agents: controversial issues. *Arh. Evromed.* 2011; 3: 87-91.
- 48 Koulaouzidis A, Said E, Cottier R, Saeed AA. Soluble transferrin receptors and iron deficiency, a step beyond ferritin. A systematic review. *J Gastrointestin Liver Dis* 2009; 18:345
 - 49 Lasocki S., Longrois D., Montravera P., Beaumont C. Hepcidin and anemia in the critically ill patient: bench to bedside. *Anesthesiol.* 2011; 114: 688-694.
 - 50 Libregts S.F., Gutiérrez L., de Bruin A.M. et al. Chronic IFN- γ production in mice induces anemia by reducing erythrocyte life span and inhibiting erythropoiesis through an IRF-1/PU.1 axis. *Blood* 2011; 118:2578.
 - 51 Ludwiczek S., Aigner E., Theurl I., Weiss G. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood* 2003; 101:4148.
 - 52 McMahon S, Peto R, Cutler J, et al. Blood pressure, stroke and coronary heart disease. Part 1. Prolonged differences in blood pressure: Prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet* 1990; 335: 765-74
 - 53 Means RT Jr. Advances in the anemia of chronic disease. *Int J Hematol* 1999; 70:7
 - 54 Means R.T. Jr. Recent developments in the anemia of chronic disease. *Curr. Hematol. Rep.* 2003; 2:116.
 - 55 Means R.T. Jr., Krantz S.B., Luna J. et al. Inhibition of murine erythroid colony formation in vitro by interferon gamma and correction by interferon receptor immunoadhesin. *Blood.* 1994; 83:911.
 - 56 Moreland LW, Heck L W Jr, Koopman WJ. Biologic agents for treating rheumatoid arthritis. Concepts and progress. *Arthritis Rheum.* 1997;40:397–409.
 - 57 Mozaffarian, D. Anemia predicts mortality in severe heart failure: the prospective randomized amlodipine survival evaluation (PRAISE) / D.

- Mozaffarian, R. Nye, W.C. Levy // J Am Coll Cardiol. - 2003. – Vol. 41 (11). – P. 1933-1939
- 58 Murphy S.T., Parfrey P.S. The impact of anemia correction on cardiovascular disease in end-stage renal disease. *Semin. Nephrol.* 2000; 20: 350-355.
- 59 Nemeth E., Valore E.V., Territo M. et al. Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood.* 2003; 101:2461.
- 60 Nemeth E., Ganz T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu. Rev. Nutr.* 2006; 26 (1): 323–42.
- 61 Nemeth E., Rivera S., Gabayan V., Keller C., Taudorf S., Pedersen B.K., Ganz T. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J. Clin. Invest.* 2004; 113 (9): 1251–3.
- 62 Nicolas G., Chauvet C., Viatte L. et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J. Clin. Invest.* 2002; 110:1037
- 63 NKF-K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Anemia of Chronic Kidney Disease: update. *Am. J. Kidney Dis.* 2001;37(Suppl. 1):182-238.
- 64 Price E.A., Schrier S.L. Unexplained aspects of anemia of inflammation. *Adv Hematol* 2010; 2010:508739
- 65 Punnonen K, Irjala K, Rajamäki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997; 89:1052
- 66 Raj DS. Role of interleukin-6 in the anemia of chronic disease. *Semin Arthritis Rheum* 2009; 38:382
- 67 Reduced kidney function and anemia as risk factors for mortality in patients with left ventricular dysfunction / A. Al-Ahmad [et al.] // J Am Coll Cardiol. – 2001. - Vol. 38 (4). – P. 955-962
- 68 Revised European Best Practice Guidelines for the Management of anemia in Patients with Chronic Renal Failure. *Nephrol. Dial. Transplant.*

- 2004;19(Suppl. 2):ii2-ii45
- 69 Roy CN. Anemia of inflammation. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2010; 2010: 276
 - 70 Sasu B.J., Cooke K.S., Arvedson T.L.. et al. Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and is effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. Blood. 2010; 115:3616
 - 71 Sasu BJ, Li H, Rose MJ, et al. Serum hepcidin but not prohepcidin may be an effective marker for anemia of inflammation (AI). Blood Cells Mol Dis 2010; 45:238
 - 72 Schilling RF. Anemia of chronic disease: a misnomer. Ann Intern Med 1991; 115:572
 - 73 Steinbicker AU, Sachidanandan C, Vonner AJ, et al. Inhibition of bone morphogenetic protein signaling attenuates anemia associated with inflammation. Blood 2011; 117:4915
 - 74 Theurl I, Aigner E, Theurl M, et al. Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications. Blood 2009; 113:5277
 - 75 Theurl I, Mattle V, Seifert M, et al. Dysregulated monocyte iron homeostasis and erythropoietin formation in patients with anemia of chronic disease. Blood 2006; 107:4142
 - 76 Theurl I., Schroll A., Sonnweber T. Pharmacologic inhibition of hepcidin expression reverses anemia of chronic inflammation in rats. Blood. 2011; 118:4977
 - 77 Theurl I., Theurl M., Seifert M. et al. Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. Blood. 2008; 111:2392
 - 78 Thomas C, Thomas L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. Clin Chem 2002; 48:1066
 - 79 van Eijk LT, John AS, Schwoebel F. et al. Effect of the antihepcidin Spiegelmer lexaptetid on inflammation-induced decrease in serum iron in

- humans. *Blood* 2014; 124:2643
- 80 Voulgari P.V., Kolios G., Papadopoulos G.K. et al. Role of cytokines in the pathogenesis of anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis. *Clin. Immunol.* 1999; 92:153.
- 81 Weng, CH; Chen JB; Wang J; Wu CC; Yu Y; Lin TH. Surgically Curable Non-Iron Deficiency Microcytic Anemia: Castleman's Disease.. *Onkologie.* 2011; 34 (8-9): 456–8.
- 82 Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* 2006; 108:3204
- 83 Zager RA. Parenteral iron compounds: potent oxidants but mainstays of anemia management in chronic renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006; 1 Suppl 1: S24–31.
- 84 Zhao N, Zhang AS, Enns CA. Iron regulation by hepcidin. *J Clin Invest* 2013; 123:2337
- 85 <http://www.findpatent.ru/patent/242/2429785.html>
- 86 Michele F. Eisenga, Isidor Minovic, Stefan P. Berger, Jenny E. Kootstra-Ros, Else van den Berg, Ineke J. Riphagen, Gerian Navis, Peter van der Meer, Stefan J. L. Bakker and Carlo A. J. M. Gaillard. Iron deficiency, anemia, and mortality in renal transplant recipients. *Transplant International* 2016; v. 29, P.1176-1183
- 87 Prikhodko M.A. Gladilin G.P. Senotova M.V. Regulation of iron metabolism in patients with chronic pyelonephritis. *Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Saratov, Russia Modern problems of science and education.* – 2011. – № 4

Список используемых сокращений

АД – артериальное давление

АХЗ – анемия хронических заболеваний

ГН - гломерулонефрит

ГЛЖ – гипертрофия левого желудочка

ЖДА – железодефицитная анемия

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИММЛЖ – индекс массы миокарда левого желудочка

иАПФ – ингибитор ангиотензин-превращающего фермента

НАДФН-оксидаза - клеточный мембрано-связанный мультимолекулярный ферментный комплекс

НИР – научно-исследовательская работа

ОЖСС - общая железосвязывающая способность сыворотки крови

ПЗ - преднизолон

РЭС – ретикуло-эндотелиальная система

ТМА- тромботическая микроангиопатия

ХБП – хроническая болезнь почек

ХГН – хронический гломерулонефрит

ХПН – хроническая почечная недостаточность

СКФ – скорость клубочковой фильтрации

СКВ – системная красная волчанка

ССО – сердечно-сосудистые осложнения

УКБ – Университетская клиническая больница

ЦФА- циклофосфамид

ЭДТА- этилендиамидтетрауксусная кислота

ЭСС – эритропоэтин-стимулирующее средство

DMT-1 – двухвалентный металл 1 типа

RPI – Reticulocyte Production Index (индекс продукции ретикулоцитов)

TSAT – Transferrin Saturation (насыщение трансферрина железом)

ПРИЛОЖЕНИЕ 1, в котором под термином пептид (peninsula) определяется либо гепсидин-25, либо интерферон гамма.

**ОБЩИЙ ПРОТОКОЛ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕПТИДОВ
ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ МЕТОДОМ (ИФА)**

Набор предназначен только для исследовательских целей.

Не использовать для диагностики.

Замечание от ЗАО «БиоХимМак»

Уважаемые коллеги! Русская версия инструкции переведена с английского варианта. Обратите внимание на соответствие номера и даты версии английской инструкции, вложенной в набор, с русским переводом. Если версии на русском и английском языках не совпадают, обратитесь в ЗАО «БиоХимМак» за исправленным русским вариантом или используйте инструкцию на английском языке.

ХРАНЕНИЕ

После получения набора храните, лиофилизированные компоненты при постоянной температуре -20°C до одного года с момента производства набора. Остальные компоненты должны храниться охлажденными ($2-4^{\circ}\text{C}$), также в течение 1 года. Длительное хранение или несоответствующие условия хранения и большие колебания температуры могут привести к накоплению преципитатов в растворе ТМВ и концентрате ИФА буфера. Эти преципитаты не должны значительно влиять на результаты анализа. Однако, если образовались видимые преципитаты, рекомендуется избегать их использования, т.е. позволить им осесть на дно флаконов.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Концентрат Рабочего буфера (50 мл концентрата 20X).
- Один микропланшет на 96 лунок с пленкой для запечатывания планшета.
- Один флакон антител к пептиду (лиофилизированных)
- Одни флакон стандарта пептида (1 мг, лиофилизированный)

- Один флакон биотинилированного пептида (лиофилизированного)
- Концентрат конъюгата пероксидазы хрена со стрептавидином (100 мкл концентрата 200X).

- Раствор хромогенного субстрата (11мл ТМБ и перекиси водорода)
- Стоп-раствор 2N HCl (15 мл)
- Один флакон буфера для разведения стандарта (свободная от пептида крысиная или человеческая сыворотка), только для наборов без экстракции (8 мл)

Материалы, требуемые для наборов с экстракцией:

- Набор для экстракции (кат.№ S-5000, на 50 образцов, с буферами А и В).
- Колонка SEP-COLUMN, содержащая 200 мг C18 (кат. № Y-1000).
- Адаптер для колонки SEP-COLUMN (кат. № Y-1010)
- Буфер А (кат. № Y-1040)
- Буфер В (кат. № Y-1045)

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетный ридер с фильтром 450 нм и 650 нм.
- Микропланшетный вошер и шейкер (орбитальный).
- Стерильная деионизированная вода или вода для инъекций (UPS очищенная вода).
- Программное обеспечение для построения калибровочной кривой (опционально).
- Пробирки, пипетки и другие различные стандартные лабораторные принадлежности.

ИФА НАБОРЫ – ОСНОВНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ И ПРИНЦИП МЕТОДА

Данные ИФА наборы основаны на конкурентном иммуноферментном анализе, проиллюстрированном на диаграмме:

Антисыворотка иммобилизована в лунках 96- луночного микропланшета. Бт-трейсер (биотинилированный трейсер) в постоянной концентрации и немеченый стандарт или образец, содержащий пептид, с различными концентрациями, конкурируют за специфическое связывание с антисывороткой. Захваченный Бт-трейсер затем связывается с SA-HRP (конъюгатом стрептавидинпероксидаза хрена), который, в свою очередь, при добавлении ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин дигидрохлорид), образует растворимый голубой продукт.

Последовательность стандартного пептида приведена в листе данных, а также в каталоге и на сайте производителя (www.USBACHEM.com), как "антигенная последовательность" (последовательности больших белков обычно не приводятся).

Стандарт используется для построения калибровочную кривой в диапазоне, указанном в характеристике набора. Калибровочные кривые S-образные (строятся с полулогарифмических координатах), но для некоторых наборов калибровочная кривая может оказаться практически линейной на всем диапазоне измеряемых значений. Диапазон измеряемых значений – это диапазон концентраций стандартов, около середины или около IC50 калибровочной кривой. Типичные калибровочные кривые для большинства наборов приведены в каталоге производителя, но также могут быть заказаны по электронной почте (immunology@usbachem.com). Неизвестные концентрации в исследуемых образцах определяются сравнением абсорбций образцов с калибровочной кривой.

В наборы включены реагенты, в количествах, достаточных для выполнения 96 определений, включая тестирование в дублях 6 или 10 стандартов для построения калибровочной кривой и анализ до 41 образца, в дублях.

ВАРИАЦИИ · ТОЧНОСТЬ · ЭКСТРАКЦИЯ · ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ

IC50 набора, или вид калибровочной кривой, могут несколько различаться, но это не влияет на точность определения в диапазоне измеряемых значений. Набор точно измеряет концентрацию пептидов в образцах, если выполняются следующие условия:

А) Образцы и стандарты должны анализироваться в одном и том же разбавителе при одних и тех же условиях (один и тот же микропланшет).

В) Антисыворотка, используемая в наборе, не должна существенно перекрестно реагировать с другими факторами, присутствующими в образце.

Таблицы перекрестной реактивности включены в каждый набор. Пользователи могут пожелать протестировать перекрестную реактивность с другими пептидами, которые приведены в каталоге производителя.

С) Пептиды в образце должны быть идентичны стандарту набора. В идеале синтетический стандарт из набора прекрасно имитирует нативный пептид. Иногда, однако, существуют семейства нативных пептидов, обладающих общей или близкой последовательностью. Кроме того, нативные пептиды могут быть энзиматически или спонтанно модифицированы, могут существовать комплексы, могут существовать другие структурные формы. В этих случаях данный набор может не определять точную концентрацию конкретного вида нативного пептида, но он может быть использован для измерения относительной концентрации.

Д) Экстракция образцов. Факторы, присутствующие в сыворотке, могут связываться с компонентами набора и влиять на измерения. Таким образом, целесообразно экстрагировать пептиды из образцов сыворотки перед измерениями.

Экстракция может быть не так важна, если образец разводится перед тестированием, но, в общем случае, можно ожидать низкой чувствительности или высокого фонового окрашивания, если не выполнять экстракцию перед тестированием. Концентрации некоторых антигенов могут быть измерены непосредственно в сыворотке, без экстракции. В этом случае в каталоге производителя указан специально разработанный набор без экстракции, который может быть использован для анализа образцов человеческой, мышиной или крысиной сыворотки.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Различные протоколы и бланки данных. Существует 7 протоколов анализа (I - VII). Для каждого необходимо использовать свой бланк данных.
- Рабочий буфер и разбавитель. Антитела и биотинилированный пептид всегда разводятся и используются в Рабочем буфере. Стандарты и образцы готовят в разбавителе. В случае наборов с экстракцией в качестве разбавителя используется Рабочий буфер, а в случае наборов без экстракции разбавитель входит в состав наборов.
- Комнатная температура. Все реагенты перед анализом должны достичь комнатной температуры.
- Встряхивание. Шейкирование (опционально) может помочь снизить разброс дублей (рекомендуется 60 rpm).
- Ячейки Бланк. Бланк – это фоновое значение, которое необходимо вычесть из всех полученных результатов. Значения бланка не влияют на результаты анализа.

Схема микропланшета для постановки с калибровочной кривой из 7 точек:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	Blk	U1	U1	U9	U9	U17	U17	U25	U25	U33	U33
B	S1	S1	U2	U2	U10	U10	U18	U18	U26	U26	U34	U34
C	S2	S2	U3	U3	U11	U11	U19	U19	U27	U27	U35	U35
D	S3	S3	U4	U4	U12	U12	U20	U20	U28	U28	U36	U36
E	S4	S4	U5	U5	U13	U13	U21	U21	U29	U29	U37	U37
F	S5	S5	U6	U6	U14	U14	U22	U22	U30	U30	U38	U38
G	S6	S6	U7	U7	U15	U15	U23	U23	U31	U31	U39	U39
H	S0	S0	U8	U8	U16	U16	U24	U24	U32	U32	U40	U40

Blk =бланк, S = стандарты, U = образцы с неизвестными концентрациями.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗОВ

1- Экстракция образцов. Экстракцию особенно рекомендуется проводить в образцах сыворотки. Это может быть не так важно для некоторых образцов культур клеток. Подробности смотрите в разделе "Рекомендуемый протокол экстракции образцов". Набор может быть использован без экстракции, но это может привести к получению неожиданных результатов из-за возможного связывания между сывороточными белками и компонентами набора.

Если приобретен «набор без экстракции», то он может быть использован для измерений в человеческой или крысиной сыворотке или плазме (согласно назначению) без проведения экстракции.

2 – Концентрации в образцах. Концентрация молекула аналита должна лежать в диапазоне измеряемых значений (в области около IC50). Если невозможно установить диапазон концентраций в образце, его можно приготовить в нескольких разведениях, так, чтобы одна из концентраций попадала в диапазон измеряемых значений.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ НАБОРА

Лиофилизированные компоненты набора не должны быть растворены до тех пор, пока они не используются для постановки. В частности, стандарт и трейсер могут быть не нужны до этапа после инкубации. Пожалуйста, проверьте соответствующий протокол.

1 – Все реагенты должны достичь комнатной температуры в невскрытом виде. Не вскрывайте реагенты или микропланшет пока они находятся в охлажденном состоянии. Они должны достичь комнатной температуры до вскрытия, чтобы избежать накопления влаги.

2 – Приготовление ИФА буфера. Разведите концентрат ИФА буфера до 1000 мл стерильной деионизированной водой или водой для инъекций (18 МОм) и тщательно перемешайте.

3 – Растворение стандарта. Внесите 1мл буфера для разведения стандарта во флакон с лиофилизированным стандартом пептида (1 мг) и перемешайте на вортексе. Если образцы экстрагированы и ресуспендированы в ИФА буфере, как описано ниже, используйте для разведения ИФА буфер. В противном случае используйте собственный буфер, так, чтобы стандарты и образцы обрабатывались одинаково. Вне зависимости от используемого буфера, оптическая плотность (ОП) "нулевого стандарта" должна быть близка к ОП бланка. В «наборах без экстракции» для разведения поставляется человеческая или крысиная сыворотка, не содержащая пептида, но все же при постановке необходимо использовать свой собственный буфер для разведения, в том случае, если он не связывается существенно с антисывороткой.

4 – Приготовление стандартов. Выполните серийные разведения стандарта в пределах диапазона измеряемых значений набора. Соответствующий диапазон указан в бланке данных.

5 – Растворение антисыворотки. Внесите 5 мл (10 мл для протокола VII) ИФА буфера и перемешайте на вортексе.

6 - Растворение Бт-трейсера. Внесите 5 мл ИФА буфера во флакон с лиофилизированным биотинилированным пептидом и перемешайте на вортексе.

ПРОТОКОЛ IV (Std.AbON.Bt)

1 - Внесите в каждую лунку микропланшета:

По 50 мкл стандарта или образца (в разбавителе)

По 25 мкл антисыворотки (в ИФА буфере)

Внесите 50 мкл разбавителя и 25 мкл ИФА буфера в ячейки Бланк.

2 - Инкубируйте при 4°C в течение ночи. Более короткое время преинкубации может привести к низкой чувствительности.

3 - Инкубируйте при комнатной температуре 1 час. За это время Микропланшет достигнет комнатной температуры.

4 - Растворите Бт-трейсер (в ИФА буфере) и внесите по 25 мкл на лунку.

5 - Инкубируйте при комнатной температуре 2 часа.

6 - Промойте микропланшет ИФА буфером 5 раз, по 300 мкл на лунку. Промывайте лунки аккуратно, не допускайте перекрестной контаминации в лунках, особенно во время первого цикла промывки. Полностью удаляйте жидкость из лунок на каждом цикле промывки, резким движением запястья переверните планшет и сбросьте содержимое планшета в раковину, затем аккуратно постучите перевернутым микропланшетом по сухой фильтровальной бумаге. Внесите 300 мкл ИФА буфера в каждую лунку и аккуратно потрясите микропланшет в течение нескольких секунд. Тщательная промывка очень важна.

7 - Внесите по 100 мкл на лунку конъюгата стрептавидин-HRP.

Встряхните или центрифугируйте флакон с конъюгатом SA-HRP, для того чтобы собрать всю жидкость на дне флакона. Разведите 1/200 в ИФА буфере (60 мкл / 12 мл) и перемешайте на вортексе. Внесите по 100 мкл во все лунки, включая лунки бланка.

8 - Инкубируйте при комнатной температуре 1 час.

9 - Промойте микропланшет ИФА буфером 5 раз (см. шаг 6).

10 - Внесите по 100 мкл на лунку раствора ТМВ. Внесите во все лунки, включая лунки бланка.

11 - Инкубируйте при комнатной температуре (обычно 30 - 60 минут). Вы можете считать ОП развившегося окрашивания при длине волны 650 нм и использовать полученные данные для расчетов.

12 - Остановите реакцию внесением по 100 мкл 2 N HCl на лунку.

13 - Считайте абсорбцию при длине волны 450 нм в течение 10 минут.

АНАЛИЗ

Постройте калибровочную кривую и рассчитайте результаты.

Для построения калибровочной кривой рекомендуется использовать соответствующее программное обеспечение. Микропланшетные ридеры обычно имеют такое программное обеспечение. Это, однако, не обязательно, и можно построить калибровочную кривую вручную, используя полулогарифмическую графическую бумагу. Также можно использовать табличную программу. Для последнего варианта рекомендуется использовать следующую процедуру.

Установите таблицу, как показано ниже (рис.2) (значения в таблице приводятся только как иллюстрация и не обязательно типичны для конкретного набора).

Выделите область 8 x 12, соответствующую схеме микропланшета (в данном примере использована схема с калибровочной кривой из 6 точек) и внесите данные по ОП с ридера с соответствующие клетки.

Рассчитайте среднее значение ОП лунок бланка в другой клетке (указано стрелками от клеток A1 и A2).

Введите концентрации стандартов (см в нг/мл на рисунке).

Рассчитайте средние значения ОП стандартов и вычтите значение фонового окрашивания (бланк), как указано стрелками для последнего стандарта (клетки H1 и H2).

Постройте точки калибровочной кривой в полулогарифмической системе координат.

Откладывайте средние значения ОП по оси Y (за вычетом среднего значения бланка) и оп оси X концентрации стандартов в нг/мл.

Используйте уравнение, приведенное ниже, для расчета значений в колонке "FIT" и постройте гладкую линию по значениям FIT против концентраций стандартов.

Затем изменяйте параметры a (max), b (угол наклона), c (IC50), и d (min), до тех пор, пока не получите удовлетворительную аппроксимацию.

$$y = \frac{a - d}{1 + (x/c)^b} + d$$

Затем рассчитайте средние значения ОП образцов и вычтите среднее значение бланка (см. стрелки от клеток A3 и A4, и стрелки ведущие к "Average").

Для расчета концентраций в образцах, в нг/мл, можно использовать обратное уравнение.

$$(y - a)^{1/b}$$

$$x = c \text{ -----}$$

$$(d - y)^{1/b}$$

Внимание: При расчете концентраций образцов в помощью обратного уравнения, если $y = d$ или $y > a$ или $y < d$, значение лежит вне измеряемого диапазона и расчет даст либо ошибку либо будет получена бессмысленная отрицательная концентрация.

ПРЕДЛАГАЕМЫЙ ПРОТОКОЛ ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ ОБРАЗЦОВ

В наборе поставляется избыточное количество стандарта, который можно использовать для определения, если требуется экстракция. Например, при работе с сывороткой, ее можно обогатить известным количеством стандарта и проверить точность измерений с и без экстракции. Процедура экстракции элиминирует потенциально влияющие вещества, такие как альбумин.

Экстракция может быть также необходима для концентрирования образца до диапазона измеряемых значений. Как и при любых процедурах очистки, извлечение определенного вещества не является полным.

Таким образом, для более точных измерений рекомендуется оптимизация и количественная оценка процедуры экстракции. Так как невозможно предоставить точный протокол оптимизации и количественной оценки экстракции, в набор включено достаточное количество стандарта, которое может быть использовано в этих целях.

Метод экстракции на колонке C18 Sep

Данный базовый протокол предназначен помочь пользователям, у которых небольшой опыт экстракции образцов. Он может быть применен к образцам различных биологических жидкостей, но не является оптимизированным протоколом для какого-либо конкретного антигена.

Необходимые материалы:

- Колонка SEP-COLUMN, содержащая 200 мг C18, кат. № Y-1000.
- Буфер А (BUFF-A): 1% трифторуксусная кислота (TFA, HPLC чистая).

(Для подкисления образцов плазмы для удаления влияющих белков, таких как альбумин).

- Буфер В (BUFF-B): 60% ацетонитрил (HPLC чистый), 1% TFA и 39% дистиллированной воды. (Для элюирования пептида с колонки C18).
- Можно заказать набор для экстракции (кат. №. S-5000), который включает SEP-колонки и буферы.

Получение и подготовка образцов плазмы:

- Соберите образцы крови (2 - 6 мл) в охлажденный шприц и перенесите в полипропиленовую пробирку, содержащую ЭДТА (1 мг/мл крови) в качестве антикоагулянта и аprotинин (500 КМЕ/мл крови) в качестве ингибитора протеаз, при 4°C. Не используйте гепарин в качестве антикоагулянта, так как он может влиять на результаты анализа. Возможно использовать вакутейнеры с ЭДТА.
- Центрифугируйте кровь при 1,600xg в течение 15 минут при 4°C.
- Соберите верхний слой (плазму).
- Переходите к процедуре экстракции немедленно или замораживайте образцы при -70°C для хранения.

Процедура экстракции:

- Добавьте равный объем буфера А к образцу плазмы.
- Центрифугируйте при 6,000xg - 17,000xg в течение 20 минут при 4°C.
- Перенесите супернатант в новую пробирку, удалив любой возможный осадок.

- Уравновесьте колонку SEP-COLUMN, промыв ее 1 мл буфера В, а затем 3 х 3 мл буфером А.
- Нанесите полученный супернатант плазмы на уравновешенную колонку SEP-Column.
- Медленно промойте колонку буфером А (3 мл, дважды) и выбросите смыв. Можно использовать вакуумный насос (10 сек/капля).
- Медленно элюируйте пептид буфером В (3 мл, один раз) и соберите элюант в полипропиленовую пробирку.

Можно использовать вакуумный насос, как описано в предыдущем шаге.

- Лيوфилизируйте элюант используя сухой лед /метаноловую баню для замораживания образца и центрифужный концентратор для выпаривания.
- Растворите сухой остаток в нужном объеме ИФА буфера, так, чтобы концентрация определяемого пептида была близка к IC50 (в диапазоне измеряемых значений).

ПОИСК И РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМ

Большая часть проблем вызвана плохой техникой выполнения или изменениями протокола. Кроме того, необходимо убедиться в том, что срок годности набора не истек и что набор хранился в соответствующих условиях. Пожалуйста, внимательно прочитайте раздел «ХРАНЕНИЕ» данной инструкции.

- Можно ли выполнить больше одной постановки данным набором?
- о. Хотя производитель не гарантирует характеристики данного набора при повторной или последующей постановках, пользователь может попробовать использовать набор в нескольких постановках, при условии, что растворенные специфическая антисыворотка, стандарт и Бт-трейсер хранятся при температуре -20°C или ниже, а остальные компоненты набора

хранились охлажденными (2-4°C), в сухом месте. Замораживание аликвот растворенных компонентов может позволить увеличить количество постановок.

Какие могут быть причины неточного считывания?

- Значения ОП, превышающие диапазон измеряемых значений микропланшетного ридера.
- Грязные или жирные доньшки лунок – протрите 70% спиртом.
- Пузырьки воздуха или пена в лунках.
 - Калибровочная кривая не выглядит правильной.
- Если считывание проводилось не сразу, то верхняя часть калибровочной кривой сглаживается. Рекомендуется проводить считывание несколько раз в период развития голубого окрашивания (при 650 нм). Голубое окрашивание будет менее интенсивно по сравнению с окрашиванием остановленной реакции (желтое, 450 нм), но данные будут достоверны и снижается риск потери данных нижней части калибровочной кривой.
- Некоторые калибровочные кривые могут быть практически линейны, это возможно для отдельных анализов, сравните с типичными графиками для некоторых продуктов, приведенными в каталоге производителя.
 - Значение IC50 не такое, как ожидается.
- Значение IC50, приводимое для каждого продукта, основывается на концентрации приготовленных стандартов до того, как они добавлены в рабочий буфер.
- Разница в 2 -3 раза может быть нормальной для некоторых наборов и может быть вызвана временем, необходимым для уравнивания связывания трейсера и стандарта. Это особенно верно для протоколов с преинкубацией. Если возможно, всегда включайте собственный

проверенный стандарт с концентрацией, близкой к IC50 для проверки точности метода.

- В случае, если калибровочная кривая практически линейная, точное значение IC50 не может быть рассчитано.
- Использование избыточных количеств антисыворотки или трейсера, или использование деградировавшего стандарта повышает значение IC50.

- Слишком высокий коэффициент вариации в дублях.

Существуют только простые объяснения этого факта:

- (a) плохое смешивание,
- (b) некачественная техника пипетирования или неточные пипетки,
- (c) наборы реагентов не достигли комнатной температуры перед использованием,
- (d) перекрестное загрязнение образцов, например, попадание капель или разбрызгивание,
- (e) пузыри или пена в лунках, следы пальцев или грязь на донышках лунок, и т.д.
- ОП ниже, чем ожидается.

Интенсивность окрашивания не значительно влияет на точность определений, до тех пор, пока угол наклона в измеряемом диапазоне нормальный, но, если интенсивность окрашивания очень низкая, при условии, что прошло достаточно времени, это может означать, что было добавлено недостаточное количество одного из компонентов (антисыворотка, Бт-трейсер, SA-HRP или TMB) или один из этих компонентов деградировал из-за неправильного хранения или повторных циклов замораживания/оттаивания.

Калибровочная кривая выглядит правильной, но результаты неправдоподобные.

- Возможно использование различных растворителей или разные условия анализа образцов и стандартов.
- Антисыворотка может связываться с другим пептидом со схожими антигенными свойствами.
- Потеря антигена в процессе экстракции или при экстракции не были элиминированы влияющие вещества.
- Убедитесь, что антиген, для измерения которого предназначен набор (антигена набора) тот же, который требуется определить. Иногда антиген набора является только частью целого нативного белка.

В этом случае набор может быть использован для определения относительной концентрации, но неполностью целого белка.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Были протестированы физические и химические свойства реагентов, входящих в состав набора. Реагенты не содержат ингредиентов, классифицируемых как опасные для здоровья и составляющих более 1% от смеси или которые можно выделить из смеси в концентрациях, превышающих допустимые пределы согласно OSHA (Закон о технике безопасности и гигиене труда, США).

Опасные вещества

Стандарт поставляется в лиофилизированном виде. Лиофилизированная антисыворотка содержит Твин-20 и тимерозал. Концентрат ИФА буфера содержит Tris и тимерозал. Буфер поставляется в жидком виде. SA-HRP содержит 0.01% метилизотиазолин, 0.01% бромнитродидоксан и 10 ppm Proclin 300 в качестве консерванта.

Физические и химические данные

Компоненты стабильны в закрытых контейнерах при нормальных температуре и давлении. Опасная полимеризация не известна.

Данные о пожарной опасности

Компоненты не являются горючими веществами и обладают ничтожной способностью воспламеняться при нагревании или при нахождении рядом с огнем. Противопожарные действия должны соответствовать воспламенившимся материалам.

Опасность для здоровья

Компоненты могут быть вредными при проглатывании, ингаляции или попадании на кожу и могут вызывать раздражения кожи или глаз. При попадании в глаза промойте глаза большим количеством воды и обратитесь к врачу. При попадании на кожу, промойте большим количеством воды с мылом.

Реактивность

Компоненты стабильны в закрытых контейнерах при нормальных температуре и давлении.

Разбрызгивание (проливание) и утилизация

При разбрызгивании (проливании) проветрите помещение или промойте место разбрызгивания (пролива). Утилизируйте согласно национальным требованиям.

Хранение и использование

Для предотвращения нежелательных контактов носите защитные очки, перчатки и лабораторную одежду.

Указанная информация считается достоверной, но не является всеобъемлющей и должна использоваться только как рекомендации. Решение

и ее пригодности для принятия необходимых мер предосторожности остается в ответственности пользователя.

Производитель Peninsula Laboratories, LLC не несет какой-либо ответственности за повреждения, возникшие в результате использования данного продукта.

ГАРАНТИЯ И ОГРАНИЧЕНИЕ

ОТВЕТСТВЕННОСТИ

Смотри инструкцию на английском языке.

119991, Москва, Ленинские горы,

ЗАО «БиоХимМак»

тел. (495) 647-2740 (многоканальный),

9392421, 9395808,

факс (495) 939-09-97

info@biochemmack.ru

www.biochemmack.ru

PENINSULA LABORATORIES, LLC, GENERAL PROTOCOL FOR Peptide Enzyme Immunoassay (EIA)

☐ Перевод на русский язык

ЗАО «БиоХимМак», Москва, 22.11.2012

тел. 647-27-40

E-mail: elisa@biochemmack.ru www.biochemmack.ru

ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ IFN- γ

Иммуноферментный набор для количественного определения человеческого IFN- γ в человеческой сыворотке, плазме, синовиальной жидкости, культуральной среде и других биологических жидкостях

Кат. № BMS228 – 96 определений

Версия: 09.07.12 (22)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор предназначен для количественного определения человеческого IFN- γ в человеческой сыворотке, плазме, синовиальной жидкости, культуральной среде и других биологических жидкостях.

Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в рутинных диагностических процедурах.

2. ВВЕДЕНИЕ

IFN- γ , также называемый интерфероном II типа, представляет собой гомодимерный гликопротеин, содержащий субъединицы массой примерно 21-24 kDa. Ген человеческого IFN- γ , расположенный в 12-ой хромосоме, содержит три интрона, 4 экзона кодируют полипептид из 166 аминокислот, 20 из которых составляют сигнальный пептид (11).

В отличие от синтеза IFN- α и IFN- β , который может протекать в любых клетках, продукция IFN- γ осуществляется Т-лимфоцитами и НК-клетками. Все индукторы IFN- γ активируют Т-лимфоциты либо поликлональным (митогены, антитела) либо клонально-определенным, антиген-специфичным путем.

IFN- γ продуцируется при инфицировании CD8⁺ Т-лимфоцитами (цитотоксические клетки/клетки-супрессоры) и Т-хелперами первого типа (Th1). Th1 секретируют IL-2, IL-3, TNF- β и IFN- γ , в то время как Th2 в

основном продуцируют IL-3, IL-4, IL-5 и IL-10, но не продуцируют (или продуцируют мало) IFN- γ (9). IFN- γ избирательно ингибирует пролиферацию Th2, но не Th1, что подтверждается избирательной пролиферацией Th1-клеток в иммунном ответе в присутствии IFN- γ .

Интерферон II типа или IFN- γ представляет собой лимфокин, не обнаруживающий молекулярной гомологии с интерфероном I типа, однако сходный с ним по ряду биологических свойств. В частности, свойствами IFN- γ являются индукция противовирусной защиты и анти-пролиферативное действие. Также IFN- γ обладает иммунорегуляторными свойствами.

- 1) IFN- γ является мощным активатором моноклеарных фагоцитов, т.к. IFN- γ стимулирует экспрессию Mac-1, усиливает эндоцитоз и фагоцитоз моноцитов (15), активирует киллерную функцию макрофагов путем высвобождения активных форм кислорода и TNF- α (21).
- 2) IFN- γ индуцирует или модулирует экспрессию антигенов МНС на макрофагах, Т- и В-клетках и на опухолевых клетках некоторых линий. (3)
- 3) IFN- γ стимулирует дифференцировку Т- и В-клеток. Он усиливает пролиферацию активированных В-клеток и может действовать синергично с IL-2, усиливая синтез легких цепей иммуноглобулинов (8, 13). IFN- γ является одним из естественных факторов дифференцировки В-клеток (17).
- 4) Наконец, IFN- γ активирует нейтрофилы, NK-клетки и эндотелиальные клетки сосудов (6).

Роль IFN- γ как маркера заболевания продемонстрирована для ряда патологических состояний:

Инфекционные заболевания:

IFN- γ продуцируется при вирусных инфекциях (4).

IFN- γ является средством дифференциального диагноза туберкулезного и нетуберкулезного асцитов (5, 18).

Значения IFN- γ в плевральном выпоте значительно выше у пациентов с туберкулезным плевритом по сравнению с нетуберкулезными плевритами, причем чувствительность и специфичность метода составляют 100% (1,2).

Облегчение клинических симптомов узелковой лепротической эритемы при лечении талидомидом коррелирует с уровнями IFN- γ и TNF- α (14).

У пациентов с туберкулоидной формой лепры обнаруживают рост пролиферации лимфоцитов и продукции IFN- γ в ответ на стимуляцию *Mycobacterium leprae* по сравнению с пациентами с лепроматозной формой лепры и здоровыми индивидами (16).

Аутоиммунные заболевания:

Точное определение клеточной продукции цитокинов, в том числе IFN- γ , важно для планирования и контроля терапии рассеянного склероза (12)

Отторжение трансплантата:

Экспрессия мРНК IFN- γ в трансплантате наблюдается при остром отторжении трансплантата перед клиническими проявлениями отторжения, что является ранним средством диагностики отторжения трансплантата (10).

Аллергия:

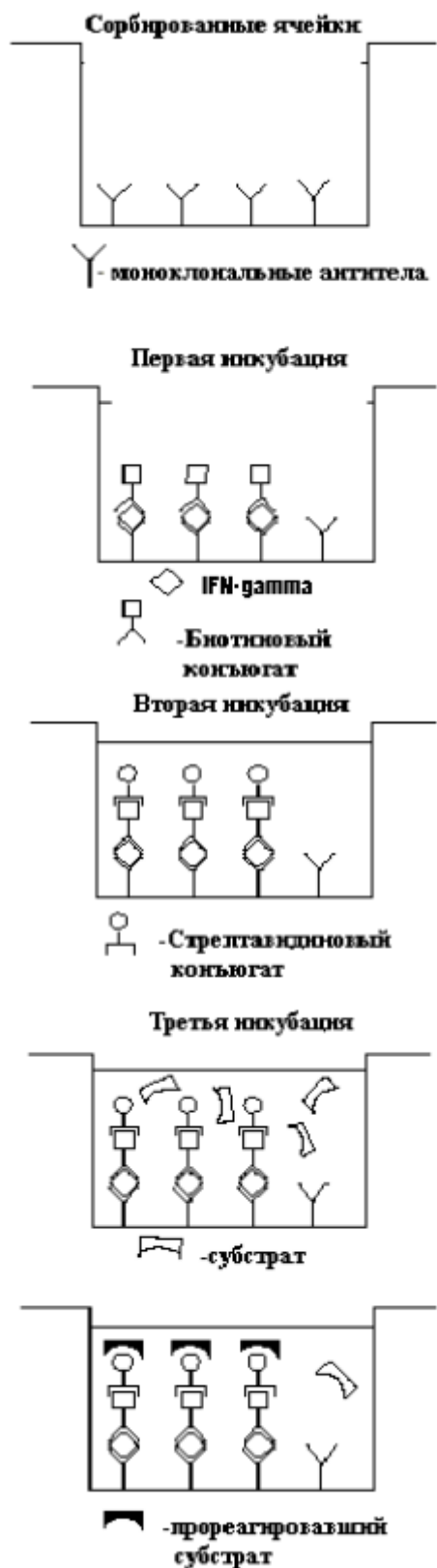
Продукция IFN- γ выделенными лимфоцитами не обнаруживается у пациентов с аллергией на коровье молоко по сравнению с здоровыми индивидами (19).

У новорожденных с атопией уровень продукции IFN- γ значительно ниже по сравнению с здоровыми новорожденными (20).

Диабет:

Лимфоциты и мононуклеары периферической крови пациентов с недавним диабетом I типа продуцируют значительно меньше IFN- γ по сравнению с здоровыми пациентами и лицами, страдающими диабетом длительное время (4).

3. ПРИНЦИП МЕТОДА



Антитела, специфичные к IFN- γ , сорбированы в ячейках планшета.

IFN- γ неизвестных образцов, стандартов и контрольных образцов связывается с антителами в ячейках планшета. Добавляемый конъюгат Биотин-моноклональные анти-IFN- γ -антитела связывают IFN- γ , захваченный первыми антителами.

После инкубации и промывки из ячеек удаляется несвязавшийся биотиновый конъюгат, и в ячейки добавляется конъюгат стрептавидин-пероксидаза, связывающий биотин, конъюгированный с IFN- γ .

После второй инкубации и промывки из ячеек удаляется несвязавшийся стрептавидиновый конъюгат, и в ячейки добавляется субстратный раствор, который взаимодействует с ферментным комплексом с образованием окрашенного раствора.

Интенсивность окраски, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации IFN- γ , присутствующего в образцах.

Концентрация IFN- γ в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по 7 приготовленным разведениям стандарта.

4. РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Реагент Набор	96 тестов
96-луночный микропланшет, покрытый мышиными моноклональными антителами к человеческому IFN- γ	1 планшет
Конъюгат моноклональных мышиных анти- IFN- γ антител и биотина, 100 мкл.	1 флакон
Конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, 150 мкл 1 флакон Стандарт IFN- γ , лиофилизированный, 200 нг/мл (после растворения) IFN- γ	2 флакона
Промывающий раствор, концентрат 20х (ФСБ с 1% твином 20), 50 мл.	1 флакон
Концентрат Рабочего буфера 20х (ФСБ с 1% твином 20 и 10%БСА), 5 мл	1 флакон
Разбавитель образцов, 12 мл (допускается наличие белого осадка, не влияющего на качество анализа)	1 флакон
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл.	1 флакон
Стоп-раствор (1М фосфорная кислота), 15 мл.	1 флакон
Голубой краситель, 0,4 мл	1 флакон
Зелёный краситель, 0,4 мл	1 флакон
Красный краситель, 0,4 мл	1 флакон
Плёнки для заклеивания стрипов	4

5 ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Храните компоненты набора при температуре 2-8 °С. Сразу после использования верните реагенты в холодильник. Храните до даты, указанной на упаковке реагентов.

Только при соответствующем хранении и исключении контаминации во время предыдущего использования набора гарантируется качественная работа реагентов.

6. СБОР ОБРАЗЦОВ

Для анализа могут использоваться супернатант клеточных культур, человеческая сыворотка, ЭДТА- или гепариновая плазма или другие биологические образцы. Отделите сыворотку от сгустка эритроцитов как можно скорее после свёртывания крови.

Образцы, содержащие видимый преципитат, необходимо отделить от него до анализа. Не используйте сильно гемолизированные или липемические образцы.

Для хранения образцов более 24 часов следует использовать температуру -20 °С и ниже. В этом случае удаётся избежать потерь активности IFN-γ. Если анализ будет выполнен в ближайшие 24 часа, образцы могут храниться при 2-8 °С.

Избегайте повторных циклов замораживания – размораживания образцов. До начала анализа медленно разморозьте образцы и осторожно перемешайте.

7. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Калиброванные микродозаторы одноканальные переменного объема с одноразовыми наконечниками на 5 – 1000 мкл, 5 – 10 мл
- Многоканальные микродозаторы на 50 – 300 мкл

- Ванночка для реагентов для использования с многоканальной пипеткой
- Калиброванные стаканы и цилиндры, необходимые для приготовления реактивов
- Ручное или автоматическое промывающее устройство
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и фильтром сравнения 620 нм
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Программное обеспечение для обработки результатов (регрессия)

8. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все химические реагенты должны рассматриваться как потенциально опасные. Рекомендуется, чтобы данный продукт был использован только персоналом, прошедшим специальное обучение лабораторным методам и в строгом соответствии с принципами хорошей лабораторной практики. Одевайте подходящую защитную лабораторную одежду, такую, как лабораторные халаты, защитные очки и перчатки.

Необходимо избегать контактов с кожей и глазами. При попадании на кожу или в глаза немедленно промыть водой.

Специфические рекомендации приведены в инструкции по технике безопасности и/или положении о безопасности.

2. Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в рутинных диагностических процедурах.

3. Не смешивайте разные лоты и реагенты из разных лотов.

4. Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения.

5. Избегайте облучения реагентов сильным источником света во время хранения и инкубации.

6. Не пипетируйте ртом.

7. Нельзя есть или курить в месте, где хранятся реагенты и образцы или в месте, где проводится анализ.
8. Избегайте контакта реагентов с кожей и слизистыми.
9. При ручном методе анализа пользуйтесь латексными перчатками для защиты рук.
10. В состав реагентов в качестве консерванта входит токсичное вещество тимерозал.
11. Избегайте контакта субстратного раствора с металлами и окислителями.
12. Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей.
13. Чтобы избежать микробного загрязнения или загрязнения реактивами и получения в результате недостоверных результатов, пользуйтесь одноразовыми наконечниками.
14. Используйте чистую, специально выделенную посуду для конъюгатов и субстратного раствора.
15. Загрязнение кислотой инактивирует конъюгат.
16. Для приготовления реактивов используйте дистиллированную или деионизированную воду.
17. Субстратный раствор должен иметь комнатную температуру перед использованием
18. Обеззараживайте после работы образцы, так как они могут быть инфицированы, предпочтительно автоклавированием не менее 1 часа при 121.5 °C
19. Жидкие отходы, не содержащие кислоту, и нейтрализованные необходимо смешать с раствором гипохлорита натрия таким образом, чтобы получился в итоге 1% р-р гипохлорита. Оставьте полученную смесь на 30

минут для эффективного обеззараживания. Жидкие отходы, содержащие кислоту, необходимо нейтрализовать до обеззараживания р-ром гипохлорита натрия.

9. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

9.1 Разведение Промывающего раствора

Позвольте концентрату Промывающего раствора достичь комнатной температуры и перемешайте, убедившись, что кристаллы соли, выпавшие в осадок, полностью растворились.

Разбавьте 50 мл концентрата дистиллированной водой в мерном цилиндре до конечного объёма 1,0 л. Перемешайте, избегая вспенивания.

Храните Промывающий раствор при 2-25 °С. Промывающий раствор стабилен 30 дней.

Таблица. Расход концентрата Промывающего раствора.

Количество используемых стрипов	Концентрат Промывающего раствора, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	25	475
1-12	50	950

9.2 Разведение Рабочего буфера

Хорошо перемешайте концентрат Рабочего буфера. Внесите в чистый градуированный цилиндр 5 мл концентрата рабочего буфера и доведите до конечного объёма 100 мл. Перемешайте, избегая вспенивания. Храните Разбавитель образцов при 2-8 °С.

Разбавитель образцов стабилен 30 дней.

Таблица. Расход концентрата Разбавителя образцов.

Количество используемых стрипов	Концентрат Разбавителя образцов, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

9.3 Приготовление Конъюгата анти- IFN- γ с биотином

Разбавьте концентрат Конъюгата Рабочим буфером (Реагент В) в 100 раз в чистой пластиковой посуде

Таблица. Расход концентрата конъюгата.

Кол-во стрипов	Концентрат конъюгата, мл	Рабочий Буфер, мл
1-6	0,03	2,97
1-12	0,06	5,94

9.4 Приготовление Конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена.

Разбавьте концентрат Конъюгата Рабочим буфером (Реагент В) в 100 раз в чистой пластиковой посуде

Таблица. Расход концентрата конъюгата.

Кол-во стрипов	Концентрат конъюгата, мл	Рабочий Буфер, мл
1-6	0,06	5,94
1-12	0,12	11,88

9.5 Приготовление Стандартов

Растворите лиофилизированный стандарт дистиллированной водой (точный объем стандартного раствора, который должен получиться в результате растворения, указан на этикетке флакона), концентрация полученного

Стандарта составляет 200 нг/мл. Далее полученный стандарт 200 нг/мл следует разбавить по следующей схеме:

Разведение I: 100 мкл стандарта 200 нг/мл + 900 мкл рабочего буфера = 20 нг/мл

Разведение II: 10 мкл разведения I (20 нг/мл) + 990 мкл рабочего буфера = 0,2 нг/мл.

После использования выбросьте остаток реагента. Разбавленный стандарт не храните.

Альтернативно, разведения стандарта могут быть приготовлены в пробирках (см. 9.5.1).

9.5.1 Приготовление разведений стандартов

Промаркируйте 7 пробирок, одну для каждой стандартной точки.

S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7

Затем приготовьте серию разведений 1:2 для стандартной кривой следующим образом:

Добавьте 225 мкл разбавителя образцов в каждую пробирку.

Добавьте 225 мкл разведенного стандарта в первую пробирку, маркированную как S1, и перемешайте (концентрация стандарта 1 = 100 пг/мл).

Далее добавьте 225 мкл полученного раствора во вторую пробирку, маркированную как S2, и тщательно перемешайте перед приготовлением следующего разведения.

Повторите разбавления далее, получив, таким образом, необходимые точки для стандартной кривой (см. рисунок 1).

В роли бланка выступает разбавитель образцов.

Рисунок 1. Приготовление разведений стандарта



растворенный 225 мкл	Разбавителя образцов	удалить
1:1000 стандарт		225 мкл
IFN- γ		

9.6 Добавление окрашивающих реагентов: голубого, зеленого и красного

Для исключения ошибок в пипетировании при работе с иммуноферментными наборами фирма Bender MedSystems теперь предлагает дополнительное средство для контроля пипетирования даже очень маленьких объемов реагентов – каждый реагент будет отличаться от других цветом.

Эта процедура необязательна, она не влияет на результаты анализа и предназначены для облегчения работы лаборанта, поэтому можно этот шаг инструкции пропустить (не выполнять).

Альтернативно, можно использовать основные растворы красителей (голубой, зелёный, красный), добавляя их к соответствующему реагенту согласно протоколу (смотри Таблицы ниже).

1. Разбавитель образцов: перед разбавлением образцов добавьте голубой краситель в соотношении 1:250 (смотри Таблицу) в рабочий раствор Разбавителя образцов (1x) и выполняйте дальше исследование, следуя инструкции.

5 мл Разбавителя образцов	20 мкл голубого красителя
12 мл Разбавителя образцов	48 мкл голубого красителя
50 мл Разбавителя образцов	200 мкл голубого красителя

2. Конъюгат биотина: перед разбавлением концентрата биотинового конъюгата добавьте зелёный краситель в соотношении 1:100 (смотри таблицу) к Рабочему буферу, используемому для разбавления конъюгата, окрашенный биотиновый конъюгат используйте согласно инструкции.

3 мл Рабочего буфера	30 мкл зелёного красителя
6 мл Рабочего буфера	60 мкл зелёного красителя

3. Конъюгат стрептавидина: перед разбавлением концентрата конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена добавьте красный краситель в соотношении 1:250 (смотри таблицу) к Рабочему буферу, используемому для разбавления конъюгата, окрашенный стрептавидиновый конъюгат используйте согласно инструкции.

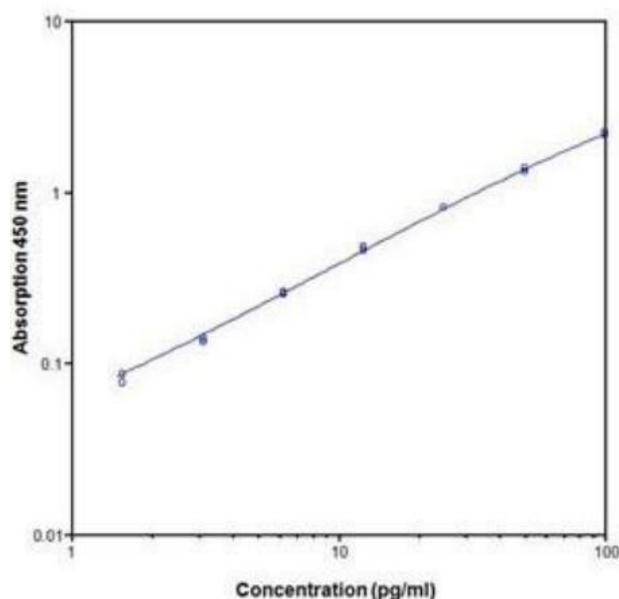
6 мл Рабочего буфера	24 мкл красного красителя
12 мл Рабочего буфера	48 мкл красного красителя

10. РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Рассчитайте результаты. Для этого рассчитайте среднее значение поглощения для каждого стандарта и образца. Отклонение от среднего не должно быть более 20%.
- Постройте калибровочную кривую, отложив по оси ординат значение абсорбции для каждого значения концентрации стандарта, а по оси абсцисс значения концентраций IFN- γ . Проведите оптимальную кривую через полученные точки.
- Определите концентрации IFN- γ в образцах из стандартной кривой.

- Для образцов, разбавленных согласно инструкции, умножьте результат на 2, т.к. они разводились в 2 раза во время анализа.
- Замечание: Расчёт образцов с оптической плотностью выше стандарта 1 некорректен – результаты будут занижаться (Хук-эффект). Для подобных образцов необходимо выполнить повторный анализ, разведя предварительно образец Разбавителем образцов для получения результата, отражающего точно концентрацию IFN- γ .
- Подразумевается, что в каждую серию анализа включается контрольный образец с известной концентрацией IFN- γ . Если значения контроля не укладываются в ожидаемый диапазон, результаты анализа могут быть недостоверны.
- Пример стандартной кривой показан на Рисунке 3. Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.

Рисунок 3. Пример стандартной кривой для IFN- γ . IFN- γ , был разбавлен в серии двукратных последовательных шагов титрования Разбавителем образцов. Здесь представлены средние значения из трех параллельных титрований. Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.



Типичные результаты, полученные с использованием данного набора.

Измерение на 450 нм, длина волны сравнения 620 нм.

Значения оптической плотности могут сильно зависеть от условий проведения анализа (человека, проводящего анализ, техники пипетирования, промывки или температуры). Кроме того, просроченные компоненты набора могут отрицательно влиять на ферментативную активность и, таким образом, на интенсивность окрашивания.

11. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Методика

Убедитесь, что Вы полностью ознакомились со всеми деталями протокола перед выполнением анализа.

a. Достаньте требуемое для проведения анализа число стрипов. Поместите требуемое количество стрипов в держатель (к необходимому числу ячеек для Образцов добавьте ячейки для Бланка, Стандартов и Контроля). Все Стандарты, Бланк и Образцы необходимо анализировать в дублях. Неиспользованные стрипы сразу уберите в пакет с осушителем и храните при 2-80C.

b. Промойте ячейки 2 раза 400 мкл Промывочного Буфера на лунку, полностью удаляя жидкость между промывками. Избегайте царапин на поверхности ячеек. Выдерживайте лунки в промывочном буфере 10-15 секунд перед аспирацией. Высушите планшет на фильтровальной бумаге после последней промывки. Используйте стрипы немедленно после высушивания или максимум через 15 минут при условии, что стрипы уложены на влажную фильтровальную бумагу в перевёрнутом виде. Не позволяйте ячейкам высохнуть!

с. Разведение стандартов в микропланшете (альтернативно разведения могут быть приготовлены в пробирках, см. главу 9.4.1): Внесите по 100 мкл Разбавителя образцов в ячейки, предназначенные для Стандартов. Приготовьте стандартные разведения добавлением по 100 мкл Стандарта IFN- γ 0,2 нг/мл (раздел «Приготовление реагентов» 9.5) в ячейки A1 и A2 (см. табл. 1 и рис. 2). Перемешайте содержимое ячеек A1 и A2 и перенесите по 100 мкл раствора из ячеек A1 и A2 в ячейки B1 и B2 соответственно. Во время этих манипуляций постарайтесь не поцарапать внутреннюю поверхность ячеек. Перемешайте содержимое ячеек B1 и B2 (несколько раз отсасывая и выливая обратно содержимое пипетированием) и перенесите по 100 мкл в ячейки C1 и C2 соответственно. Повторите перенос и разведение стандартов 4 раза, получив в итоге 2 ряда разведений стандарта IFN- γ в диапазоне от 100 до 1.6 пг/мл. Удалите и выбросьте 100 мкл жидкости из последних ячеек (G1, G2).

d. Внесите по 100 мкл Разбавителя образцов в ячейки «Бланк».

e. Внесите по 50 мкл Разбавителя образцов в ячейки, предназначенные для образцов.

f. Внесите по 50 мкл каждого образца в дублях в соответствующие ячейки.

g. Приготовьте биотиновый конъюгат (раздел «Приготовление реагентов» 9.3).

h. Добавьте по 50 мкл разбавленного биотинового конъюгата во все ячейки.

i. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18–25 °C), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.

j. Приготовьте стрептавидиновый конъюгат (раздел «Приготовление реагентов» 9.4).

к. Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). Промойте ячейки 3 раза как указано в шаге в настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.

л. Внесите по 100 мкл разбавленного стрептавидинового конъюгата во все ячейки, включая бланк.

м. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18–25 °C), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.

н. Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). Промойте ячейки 3 раза как указано в шаге в настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.

о. Внесите по 100 мкл Субстратного раствора ТМБ во все ячейки.

р. Инкубируйте при комнатной температуре в темноте 10 минут. Для подобных фотометров реакция должна быть остановлена до достижения наиболее ярко окрашенными ячейками предела измерения инструмента.

q. Добавьте по 100 мкл стоп-раствора во все ячейки, включая «Бланк», чтобы полностью инактивировать фермент в ячейках. Важно вносить стоп-реагент быстро и с той же скоростью, что и субстратный раствор. Стоп-раствор рекомендуется добавлять тогда, когда максимальный стандарт окрасится в темно голубой цвет. Альтернативно, развитие окрашивания можно мониторировать с помощью ридера при длине волны 620 нм. Субстратная реакция должна быть остановлена, как только достигается ОП 0.9 – 0.95.

г. Определите оптическую плотность ячеек при 450 нм против «Бланка», желательно использовать длину волны сравнения 620 нм (допустима длина волны сравнения в диапазоне 610- 650 нм).

Замечание: если инкубация проводилась без встряхивания, значения могут быть ниже, чем в примере, приведённом ниже. Тем не менее, эти результаты также считаются достоверными.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- Так как условия могут меняться от анализа к анализу, стандартная кривая должна быть включена в каждую серию анализа.
- Бактериальное или грибковое загрязнение образцов или реактивов может привести к недостоверным результатам.
- Используйте одноразовые наконечники.
- Стеклянная посуда должна быть тщательно вымыта.
- Неполная промывка негативно влияет на точность результатов. Полностью удаляйте Промывочный буфер из ячеек между циклами промывки. Не позволяйте ячейкам высыхать между шагами анализа.
- Использование радиоиммунотерапии значительно увеличило число пациентов с человеческими антимышиными IgG (НАМА). НАМА могут интерферировать в анализе, использующем мышиные моноклональные антитела, приводя к ложно положительным и ложно отрицательным результатам.

Образцы сыворотки, содержащие антитела к мышинным иммуноглобулинам, могут быть проанализированы в случае, когда мышинные иммуноглобулины (сыворотка, асцитная жидкость или моноклональные антитела другой специфичности) добавляются к Разбавителю образцов.

13. СТАБИЛЬНОСТЬ ОБРАЗЦОВ

13.1.1 Стабильность при замораживании-размораживании

Аликвоты сывороточных образцов хранились при температуре -20°C и размораживались до 5 раз, после чего определялись уровни IFN- γ . Не наблюдалось значительных потерь IFN- γ после 1 цикла повторного

замораживания-размораживания. Дальнейшее замораживание-размораживание показало потерю до 30% иммунореактивности IFN- γ .

13.1.2 Стабильность при хранении

Аликвоты сывороточных образцов и супернатантов культур клеток хранились при температуре -20°C , $2-8^{\circ}\text{C}$, комнатной температуре и при 37°C в течение 24 часов, после чего определялись уровни IFN- γ . Значительных потерь активности IFN- γ в условиях хранения при -20°C , 4°C и комнатной температуре не наблюдалось. Хранение образцов при 37°C показало потерю до 50% иммунореактивности IFN- γ .

13.2 Сравнение сыворотки и плазмы

У 2 индивидуумов сравнивались концентрации IFN- γ в сыворотке и плазме, стабилизированной ЭДТА, цитратом и гепарином. Существенных различий в уровнях IFN- γ в определяемых образцах не наблюдалось, следовательно, все эти образцы пригодны для анализа. Однако настоятельно рекомендуется использовать однородные образцы для унификации исследований.

13.3 Специфичность

Влияние циркулирующих факторов иммунной системы было оценено путем добавления к образцам с известной концентрацией IFN- γ физиологически значимых количеств исследуемых факторов. Перекрестная реактивность не была выявлена ни для одного исследованного вещества.

14. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Были проанализированы 40 образцов сыворотки и ЭДТА и цитрат плазмы, взятые у случайных здоровых доноров (мужчины и женщины).

Образец	Кол-во образцов	Диапазон (пг/мл)	% детекции	Детектируемое значение (пг/мл)

Сыворотка	40	nd* - 188.9	10.0	55.7
Плазма (ЭДТА)	40	nd* - 9.1	7.5	6.0
Плазма (цитрат)	40	nd* - 4.0	2.5	--
Плазма (гепарин)	40	nd* - 4.3	2.5	--

n.d. = недетектируемо

15. СТАНДАРТИЗАЦИЯ

Набор прокалиброван по высоко очищенному рекомбинантному IFN- γ , стандартизованному относительно Международного стандарта NIBSC 82/587. Международный стандарт NIBSC 82/587 калиброван в международных единицах (МЕ), 1 МЕ соответствует 50 пг IFN- γ .

16. ЛИТЕРАТУРА

1. Capobianchi, M. R., Ameglio, F., Tosi, R., and Dolei, A. (1985). Differences in the expression and release of DR, BR, and DQ molecules in human cells treated with recombinant interferon gamma: comparison to other interferons. Hum. Immunol. 13, 1-11.
2. Ciampolillo, A., Guastamacchia, E., Caragiulo, L., Lollino, G., De Robertis, O., Lattanzi, V., and Giorgino, R. (1993). In vitro secretion of interleukin-1 beta and interferon-gamma by peripheral blood lymphomononuclear cells in diabetic patients. Diabetes Res. Clin. Pract. 21, 87-93.
3. Cunningham, A. L., Nelson, P. A., Fathman, C. G., and Merigan, T. C. (1985). Interferon gamma production by herpes simplex virus antigen-specific T cell clones from patients with recurrent herpes labialis. J. Gen. Virol. 66, 249-258.
4. Davidson, P. M., Creati, L., Wood, P. R., Robertson, D. M., and Hosking, C. S. (1993). Lymphocyte production of gamma-interferon as a test for non-tuberculous mycobacterial lymphadenitis in childhood. Eur.J.Pediatr.152,31-35.
5. Edwards, B. S., Merritt, J. A., Fuhlbrigge, R. C., and Borden, E. C. (1985). Low doses of interferon alpha result in more effective clinical natural killer cell activation. J. Clin. Invest. 75, 1908-1913.
6. Gajewski, T. F., and Fitch, F. W. (1993). Anti-proliferative effect of IFN-

- gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J. Immunol.* 140, 4245-4252.
7. Le thi Bich Thuy, Queen, C., and Fauci, A. S. (1986). Interferon-gamma induces light chain synthesis in interleukin 2 stimulated human B cells. *Eur. J. Immunol.* 16, 547-550.
 8. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., and Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136, 2348-2357.
 9. Nast, C. C., Zuo, X. J., Prehn, J., Danovitch, G. M., Wilkinson, A., and Jordan, S. C. (1994). Gamma-interferon gene expression in human renal allograft fine-needle aspirates. *Transplantation* 57,498-502.
 10. Naylor, S. L., Sakaguchi, A. Y., Shows, T. B., Law, M. L., Goeddel, D. V., and Gray, P. W. (1983). Human immune interferon gene is located on chromosome 12. *J.Exp.Med.* 157, 1020-1027.
 11. Olsson, T. Multiple sclerosis,cerebrospinal fluid. (1994). *Ann. Neurol.* 36 Suppl, 100-102.
 12. Romagnani, S., Giudizi, M. G., Biagiotti, R., Almerigogna, F., Mingari, C., Maggi, E., Liang, C. M., and Moretta, L. (1986). B cell growth factor activity of interferon-gamma. Recombinant human interferon-gamma promotes proliferation of anti-mu-activated human B lymphocytes. *J. Immunol.* 136, 3513-3516.
 13. Sampaio, E. P., Kaplan, G., Miranda, A., Nery, J. A., Miguel, C. P., Viana, S. M., and Samo, E. N. (1993). The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *J. Infect. Dis.* 168,408-414.
 14. Sastre, L., Roman, J. M., Teplow, D. B., Dreyer, W. J., Gee, C. E., Larson, R. S., Roberts, T. M., and Springer, T. A. (1986). A partial genomic DNA clone for the alpha subunit of the mouse complement receptor type 3 and cellular adhesion molecule Mac-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 5644-5648.

15. Shinde, S. R., Chiplunkar, S. V., Butlin, R., Samson, P. D., Deo, M. G., and Gangal, S. G. (1993). Lymphocyte proliferation, IFN-gamma production and limiting dilution analysis of T-cell responses to ICRC and *Mycobacterium leprae* antigens in leprosy patients. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 61, 51-58.
16. Sidman, C. L., Marshall, J. D., Shultz, L. D., Gray, P. W., and Johnson, H. M. (1984). Gamma-interferon is one of several direct B cell-maturing lymphokines. *Nature* 309, 801-804.
17. Soliman, A. A., el Aggan, H. A., el Hefnawy, A. M., Mahmoud, S. A., and Abo Deya, S. H. (1994). The value of ascites adenosine deaminase activity and interferon gamma level in discriminating tuberculous from non-tuberculous ascites. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 24, 93-105.
18. Suomalainen, H., Soppi, E., Laine, S., and Isolauri, E. (1993). Immunologic disturbances in cow's milk allergy, 2: Evidence for defective interferon-gamma generation. *Pediatr. Allergy Immunol.* 4, 203-207.
19. Tang, M. L. K., Kemp, A. S., Thorburn, J., and Hill, D. J. (1994). Reduced interferon-gamma secretion in neonates and subsequent atopy. *Lancet* 344, 983-985.
20. Urban, J. L., Shepard, H. M., Rothstein, J. L., Sugarman, B. J., and Schreiber, H. (1986). Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 5233-5237.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Результаты исследования сывороток пациентов на "Гамма ИНФ" и "Klotho", на "гепсидин".

Было исследовано 71 проба.

Порядковый номер больного	Гамма ИНФ	Klotho	Гепсидин 25
1	0,05	0,28	1,1
2	0,04	0,27	4,56
3	0,04	0,28	5,42
4	1,05	0,14	1,88
5	0,6	0,19	7,06
6	0,09	0,16	3,8
7	4,35	0,25	1,33
8	0,32	0,31	5,91
9	0,07	0,2	6,11
10	0,36	0,32	5,16
11	0,21	0,92	2,94
12	0,14	0,21	7,08
13	0,97	0,37	5,73
14	0,59	0,89	7,38
15	0,28	7,08	3,18
16	0,88	0,3	5,05
17	0,03	0,21	2,02
18	0,16	0,15	4,38
19	0,09	0,2	4,63
20	6,73	0,18	5,81
21	0,5	0,32	6,17
22	0,29	0,19	7,64
23	0,65	0,26	1,94
24	0,09	0,18	2,52
25	0,07	0,15	2,27
26	0,13	0,17	5,87
27	0,14	0,15	6,75
28	0,38	0,09	3,46
29	0,55	0,2	4,62
30	0,24	0,23	2,2
31	0,2	0,26	2,25
32	4,8	0,28	8,8
33	0,11	0,13	5,7
34	0,06	0,1	4,68
35	0,19	0,09	6,91

Продолжение

Порядковый номер больного	Гамма ИНФ	Klotho	Гепсидин 25
36	0,02	0,18	2,8
37	0,01	0,14	4,78
38	4,4	0,28	4,28
39	0,14	0,23	5,64
40	0,15	0,27	5,11
41	0,58	0,13	4,63
42	0,03	0,47	5,21
43	0,7	0,12	6,19
44	0,72	0,14	2,07
45	0,15	0,2	6,21
46	1,67	0,16	4,45
47	0,09	0,17	6,15
48	0,09	0,31	2,36
49	0,63	0,2	2,42
50	0,09	0,27	2,18
51	0,03	0,16	5,91
52	0,37	0,15	5,23
53	0,14	0,19	4,46
54	9,93	0,2	5,05
55	0,11	0,3	2,45
56	0,03	0,4	4,98
57	0,04	0,22	4,32
58	0,71	0,23	5,23
59	0,21	0,08	5,91
60	0,09	0,12	6,55
61	0,16	0,36	6,71
62	0,1	1,19	7,41
63	0,97	0,31	3,42
64	0,01	0,29	6,07
65	0,05	0,25	3,15
66	0,06	0,18	4,78
67	0,67	0,24	4,92
68	0,08	0,2	6,23
69	0,09	0,33	5,32
70	0,01	0,17	5,08
71	0,12	0,14	1,74
	клинические значения		

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Справочный материалы, взятый из Клинических практических рекомендаций KDIGO по анемии при хронической болезни почек 2012 - Том 15, № 1 2013
Нефрология и диализ С. 14-53

Дефицит железа

1. Функциональный дефицит железа

ферритин > 100 мкг/л

КНТ < 20% (КНТ= сыв. Fe x 100 / трансферрин x 1,41)

2. Абсолютный дефицит железа – это общее снижение запасов железа в организме, определяемое при снижении ферритина сыворотки ниже 100 мкг/л

Показатели обмена железа необходимо определять не реже одного раза в 3 мес.:

ферритин сыворотки

КНТ и/или % гипохромных эритроцитов

Причины дефицита железа при ХБП

Всасывание железа как у здоровых, так и у больных с ХБП определяется его запасами в организме

Потеря 1 мл крови сопряжена с потерей 0,5 мг железа

Потери железа у больных на ГД составляют 1200-1700 мг в год

У пациентов с преддиализной стадией ХБП и на перитонеальном диализе без учета крови, взятой на лабораторные исследования - 350 мг/год

Оптимальные и допустимые уровни показателей обмена железа

Показатель	Оптимальна	Допустима
Ферритин (мкг/л)	200-500	100-800
КНТ (%)	30-40	20-50

Перечень наиболее распространенных пероральных препаратов железа

Название препарата	Форма выпуска	Основа препарата	Ион Fe	Доза Fe	Добавки (микроэлементы не указаны)
Мальтофер	Табл. капли, сироп	Поли-мальтазный комплекс гидроокиси Fe	3+	100	
Мальтофер-фол	Табл.	Та же	3+	100	Фолиевая к-та 0,35
Сорбифер дурулекс	Табл.	Сульфат Fe	3+	100	Аскорбиновая к-та 30 мг Тиамин, Рибофлавин 2 мг Пиридоксин 1 мг Пантотеновая к-та 2,5 мг
Тотема	Раствор, капсулы	Глюконат Fe	2+	50	
Фенюльс	капсулы	Сульфат Fe	2+	45	Аскорбиновая к-та 30 мг
Ферлецит	Капсулы. раствор	Глюконат Fe	2+	62,5	

Применение препаратов железа у пациентов ХБП с анемией

Железа внутрь назначается из расчета 200 мг элементарного железа/сут:

- сульфат железа (ферраградумент) 1 драже 325 мг железа (II)
- мальтофер 1 табл. 100 мг железа (III)

Если не удастся достичь целевых значений (КНТ > 20%, уровень ферритина > 100 мкг/л) при приеме железа внутрь за 1-3 мес следует назначить железа внутривенно (1000 мг за 6 мес)

Практические рекомендации KDIGO по анемии (2012)

При назначении препаратов железа перорально необходимо соблюдать ряд условий:

Принимать препараты железа только за 2 часа до еды и приема фосфатсвязывающих гелей

Суточная доза элементарного железа должна быть не менее 200 мг

Следует избегать прописей, содержащих более 100 мг витамина С из-за опасности развития оксалоза

Не рекомендуется также назначать железо перорально больным, систематически принимающим антациды или другие препараты, снижающие кислотность

Необходимо учитывать, что двухвалентное железо всасывается лучше, чем трехвалентное

Препараты, применяемые для восполнения дефицита железа (для в/в введения)

Препараты	Состав	Стабильность/ токсичность	Максимальная доза (мг)
Ferrlecit	Fe ³⁺ -глюконат	-/+	62,5
Venofer	Fe ³⁺ -гидроксид сахарозный комплекс	+/-	500
CosmoFer (low iron dextran)	Fe ³⁺ -гидроксид Декстран	+/-	1000
MonoFer	Fe ³⁺ -гидроксид олигоизомальтозат	+/-	1000

Феномен «перенасыщения» трансферрина

Не связанное с трансферрином железо циркулирует в свободном состоянии, усиливая образование свободных радикалов кислорода, или реагирует с белками крови

«Перенасыщение» трансферрина железом вызывает у ряда больных тошноту, покраснение лица, гипотензию

У 20% диализных больных даже после однократного в/в введения препаратов железа в крови в течение длительного времени в повышенной концентрации выявляется лабильное, не связанное с трансферрином железо, образующее комплексы с альбуминами и другими отрицательно заряженными субстанциями

Частота мониторинга гемоглобина

Концентрация Hb	Частота определения	
	Фаза коррекции	Фаза поддерживающей терапии
На додиализном этапе	ежемесячно	1 раз в 3 мес
На диализе	ежемесячно	ежемесячно

У пациентов ХБП при системных заболеваниях, наличии воспаления бактериальной, вирусной этиологии почечная анемия может дополняться иммуноопосредованным (цитокиновым) механизмом.

Цитокины вызывают:

- снижение продукции и биологической активности эритропоэтина
- нарушения пролиферации эритроидных предшественников эритроцитов
- укорочение продолжительности жизни эритроцитов

- изменения в гомеостазе железа (маркер этого типа анемии)

Терапия препаратами железа с целью повышения доступного для эритропоэза железа

Показатели Hb и содержания железа у больных на додиализном этапе ХБП, получавших лечение анемии ($M \pm m$)

Показатели	Период исследования					
	Скрининг (1-2 нед)		Фаза коррекции анемии (3 мес)		Фаза поддерживающего лечения (24 мес)	
	I группа	II группа	I группа	II группа	I группа	II группа
Hb (г/дл)	10,3±0,48	9,6±0,49	12,4±0,22**	12,1±0,75**	12,4±0,21**	12,2±0,27**
Сывороточное железа (мкг/дл)	49,9±18,7	43,0±9,02	71,1±19,1	79,8±16,3	90,9±16,02	92,7±13,56**
КНТ (%)	21,1±2,83	17,7±2,97	26,8±4,36	23,6±3,29	30,6±3,82*	28,9±3,37*
Ферритин (мкг/л)	100,0±12,89	110,9±9,1 1	232,0±26,13**	222,7±23,53**	233,6±26,93**	234,7±26,04**
Доза эпоэтина ЕД/кг/нед., подкожно						

Примечание: Одна звездочка – различия с исходным уровнем статистически значимы при $p < 0,05$;
две звездочки – при $p < 0,01$