

РОЛЯ НА ХЕПСИДИНА В ПАТОГЕНЕЗАТА НА АТЕРОСКЛЕРОЗАТА

В. Манолов¹, Ю. Петрова², В. Василев³, М. Петрова², Т. Кунчев²,
К. Цачев¹, Я. Желев², П. Желязков⁴ и Л. Трайков²

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

²Катедра по неврология, МУ – София

³Клинична лаборатория и клинична фармакология, УМБАЛ „Александровска” – София

⁴МУ – София

ROLE OF HEPCIDIN IN PATHOGENESIS OF ATHEROSCLEROSIS

V. Manolov¹, J. Petrova², V. Vasilev³, M. Petrova², T. Kunchev²,
K. Tzatchev¹, Y. Jelev², P. Jeliakov⁴ and L. Traykov²

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

²Department of Neurology, MU – Sofia

³Clinical Laboratory and Clinical Pharmacology, University Hospital "Aleksandrovska" – Sofia

⁴MU – Sofia

<p>Резюме:</p> <p>Ключови думи:</p> <p>Адрес за кореспонденция:</p>	<p>Каротидната ултрасонография, чрез определяне на intima-media thickness (IMT), е добре доказан диагностичен метод за генерализирана атеросклероза, и е свързана с факторите за сърдечно-съдови заболявания (ССЗ). Преди няколко десетилетия е предложена хипотезата, че дефицитът на желязото има защитна роля срещу заболявания на сърцето. По този начин се обяснява междуполовата разлика при честотата на ССЗ и увеличаването на случаите на заболяемост при жените след настъпване на менопаузата. Понастоящем няколко проучвания съсредоточават вниманието си върху връзката между нивата на желязо в организма и ССЗ. Някои от тях потвърждават зависимостта между честото кръводаряване и (суб)клиничното развитие на атеросклероза, а не на ССЗ. Други автори установяват намалени нива на феритин в организма, намален оксидативен стрес и подобрена съдова функция, установена чрез медирано от кръвотока съдово разширение при хора, даряващи често кръв, в сравнение с по-рядко даряващите. През 2001 г. е открит пептид с антимикробно действие, наречен хепсидин. Тази малка 25-аминокиселинна молекула има ключова роля в системната регулация на хомеостазата на желязо. Хепсидинът се синтезира от редица клетки, но водещо значение имат хепатоцитите. Връзката между нивата на хепсидин и отношението хепсидин/феритин с наличието на плаки и АВІ, двата най-точни NIMA маркера за атеросклероза, потвърждава участието на хепсидина в развитието на атеросклерозата. Пептидът има установена роля при прогреса на сърдечно-съдови и метаболитни заболявания.</p> <p>хепсидин, атеросклероза, желязо, деменция, IMT, ССЗ, АВІ, NIMA</p> <p><i>Д-р Виктор Манолов, дм, Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, МУ, ул. „Св. Г. Софийски” № 1, 1431 София, тел. (359 2) 9230 928, e-mail: victhedoc4@abv.bg</i></p>
<p>Abstract:</p>	<p>Carotid ultrasonography by determining intima-media thickness (IMT) is a well-proven diagnostic method for generalized atherosclerosis and is associated with cardiovascular disease factors. A few decades ago, the hypothesis that iron deficiency has a defensive role against heart disease is suggested. This explains the gender difference in the cardio-vascular diseases (CVD) frequency and the increase in incidence of female morbidity after menopause. At present, several studies focus on the relationship between iron levels in organisms and CVD. Some of them confirm the dependence on frequent blood donation and (sub) clinical development of atherosclerosis, but not CVD. Other authors have found reduced body ferritin levels, reduced oxidative stress, and improved</p>

<p>Key words:</p> <p>Address for correspondence:</p>	<p>vascular function, as measured by blood-borne vascular expansion in people who often donate blood, compared to the less common donors. In 2001 a peptide with an antimicrobial action called hepcidin was discovered. This small, 25-amino acid molecule has a key role in the systemic regulation of iron homeostasis. Hepcidin is synthesized from a number of cells, but hepatocytes are with major importance. The relationship between hepcidin levels and hepcidin/ferritin ratio with plaques and ABI, (the two most accurate NIMA markers for atherosclerosis), confirms hepcidin involvement in the development of atherosclerosis. The peptide has an established role in the progression of cardiovascular and metabolic diseases.</p> <p>hepcidin, atherosclerosis, iron, demntion, IMT, CVD, ABI, NIMA</p> <p>Victor Manolov, MD PhD, Department of Clinical Laboratory and Clinical Immunology, MU, 1, Sv. G. Sofiyski St., Bg – 1431 Sofia, tel. +359 2 9230 928, e-mail: victhedoc4@abv.bg</p>
--	---

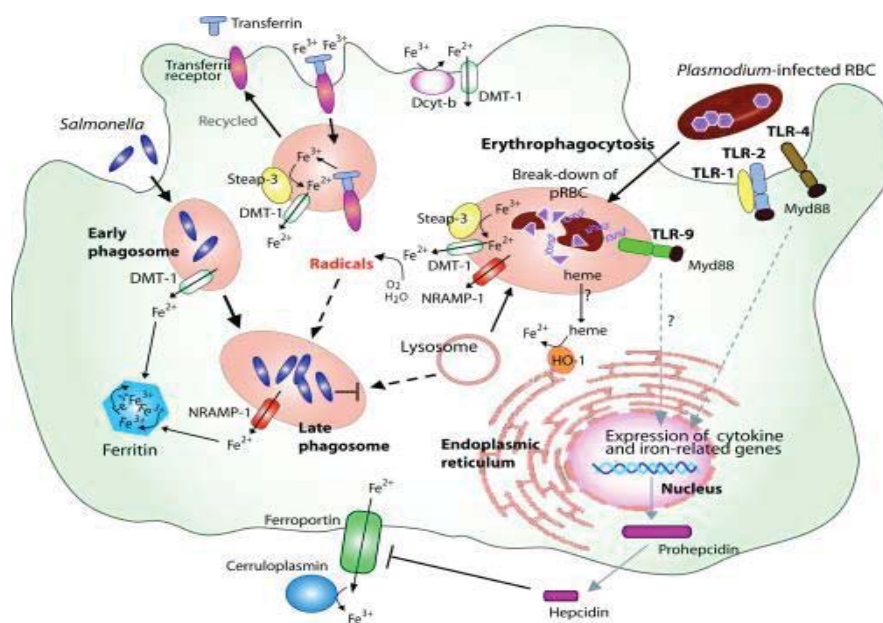
МАРКЕРИ ЗА СЪРДЕЧНО-СЪДОВ СТРЕС И СУБКЛИНИЧНА АТЕРОСКЛЕРОЗА

Каротидната ултрасонография, чрез определяне на intima-media thickness (IMT), е добре доказан диагностичен метод за генерализирана атеросклероза [1, 2] и е свързана с факторите за сърдечно-съдови заболявания (ССЗ) [3, 4]. Тя може да се използва също като предиктор за миокарден инфаркт, инсулт, коронарно съдово заболяване [5-7]. Каротидната IMT проследява субклиничната атеросклероза [4, 8].

Съществуват няколко маркера за оценка на кардиоваскуларен стрес – growth differentiation factor-15 (GDF-15), soluble ST2 (sST2), и high-sensitivity troponin I (hsTnI) [9-12]. Все по-голям интерес буди участието на хепсидина – пептида, регулиращ хомеостазата на желязо в атерогенезата и прогреса на атеросклеротичните изменения.

ХЕПСИДИНЪТ КОРЕЛИРА С НАЛИЧИЕТО НА АТЕРОСКЛЕРОТИЧНИ ПЛАКИ

Преди няколко десетилетия Съливан [13] предлага хипотезата, че дефицитът на желязо има защитна роля срещу заболявания на сърцето. С нея той целял да обясни междуполовата разлика в честотата на ССЗ и увеличаването на заболяемостта при жените след настъпване на менопаузата. Според тази хипотеза загубата на желязо по време на менструален цикъл се свързва с малкия риск от ССЗ при жените преди настъпване на менопаузата в сравнение с жени в менопауза и с мъже. Предполагало се е участие на редокс активността на желязото [14], катализиращо образуването на реактивни кислородни частици (ROS), които окислявали LDL холестерола. Това от своя страна пораждало формиране на пенести клетки и развитие на атеросклероза [15, 16].

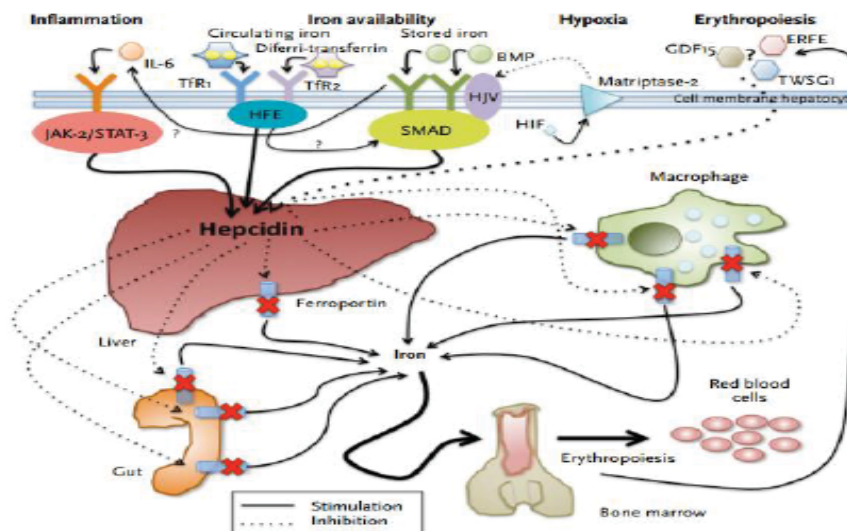


Фиг. 1. Регулация на метаболизма на желязото от хепсидина при различни състояния, вкл. хронични инфекции, хронично възпаление, туморни процеси (по Kroot JJ, 2011)

Няколко проучвания съсредоточават вниманието си върху връзката между нивата на желязо в организма и ССЗ. Някои от тях потвърждават вече съществуващата хипотеза [17-20], докато Ascherio и сътр. [21] показват силната връзка между ниските серумни нива на феритин в резултат на честото кръводаряване и продължителността на живот, но че те нямат отношение към развитието на фатални ССЗ. Други проучвания посочват зависимостта между често кръводаряване и (суб)клиничното развитие на атеросклероза, а не на ССЗ [22-24]. Zheng и сътр. [22] намират намалени нива на феритин в организма, понижен оксидативен стрес и подобрена съдова функция, установена чрез медирано от кръвотока съдово разширение при хора, даряващи често кръв, в сравнение с по-рядко даряващите. Engberink и сътр. [23] правят заключение, че intima-media thickness (IMT) на една и съща каротидна артерия е леко намалена при рядко даряващите кръв. Peffer и сътр. [24] установяват, че серумните нива на феритин са значително по-ниски при хора, които са чести кръводарители, спрямо тези, които даряват кръв рядко, но не са направили по-задълбочено разглеждане на връзката с IMT, pulse-wave velocity и ankle-brachial index (ABI).

През 2001 г. е открит пептид с антимикробно действие, наречен хепсидин [25]. Тази малка 25-аминокиселинна молекула има ключова роля в

системната регулация на хомеостазата на желязо [26]. Хепсидинът се синтезира от редица клетки, но водещо значение имат хепатоцитите. Неговият синтез нараства при повишени нива на желязо и от възпалителните цитокини, а концентрацията намалява при железен дефицит и ниско кислородно насищане. Хепсидинът се свързва с вътреклетъчния експортер на желязо, феропортина по мембраната на макрофагите, предизвиквайки промени в разпределението на желязото, блокирайки го в клетките [27]. Хепсидинът е допълнителен показател, необходим за оценка на обмяната на желязо, поради централната му роля в обмяната на микроелемента. Допълнително, отношенията хепсидин към феритин и хепсидин към трансфериново насищане (TS) са информативни при оценка на хомеостазата на желязо, представяйки зависимостта на хепсидиновата експресия от циркулиращото и съхранено желязо в организма [28, 29]. Предполага се, че повишеното ниво на хепсидин може да доведе до нарастване на риска от ССЗ чрез забавяне на мобилизацията на желязо от макрофагите. Самото желязо, натрупано в тези клетки, ги превръща в атерогенни [30, 31]. Съществуват доказателства за участието на хепсидина в развитието на атеросклеротичния процес при *in vitro* проучвания и при пациенти на хемодиализа [32-36].



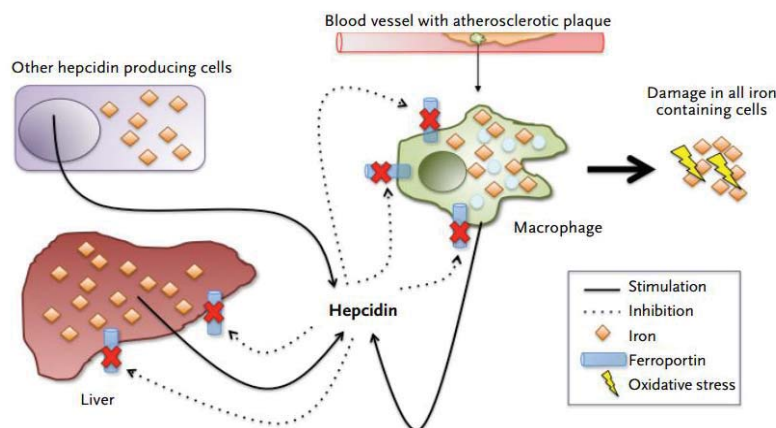
Фиг. 2. Участие на хепсидина в образуването на атеросклеротични плаки (по Van der Weerd NC, 2012)

Наличието на плаки е по-добър предиктор за риск от миокарден инфаркт (MI) спрямо IMT [37]. От друга страна, ABI се прилага рутинно в практиката по NIMA. Връзката между нивата на хепсидин и отношението хепсидин/феритин с наличието на плаки и ABI, двата най-точни NIMA мар-

кера за атеросклероза, потвърждава участието на хепсидина в развитието на атеросклерозата. Пептидът има установена роля при прогреса на сърдечно-съдови и метаболитни заболявания. При пациенти на хронична диализа хепсидинът се свързва с артериалната ригидност и ССЗ [32,

33]. Valenti и сътр. [26] установяват корелация между хепсидина и моноцитния хемоатрактантен протеин-1 при пациенти с метаболитни нарушения и тази връзка е независим предиктор на наличието на каротидни плаки. В друго проучване Valenti и сътр. [39] установяват връзката между

хепсидин и каротидни плаки при неалкохолно мастно заболяване на черния дроб. Допълнително е установено нарастване на серумните нива на хепсидин при пациенти със затлъстяване и други метаболитни нарушения, традиционно свързвани със ССЗ [40-42].



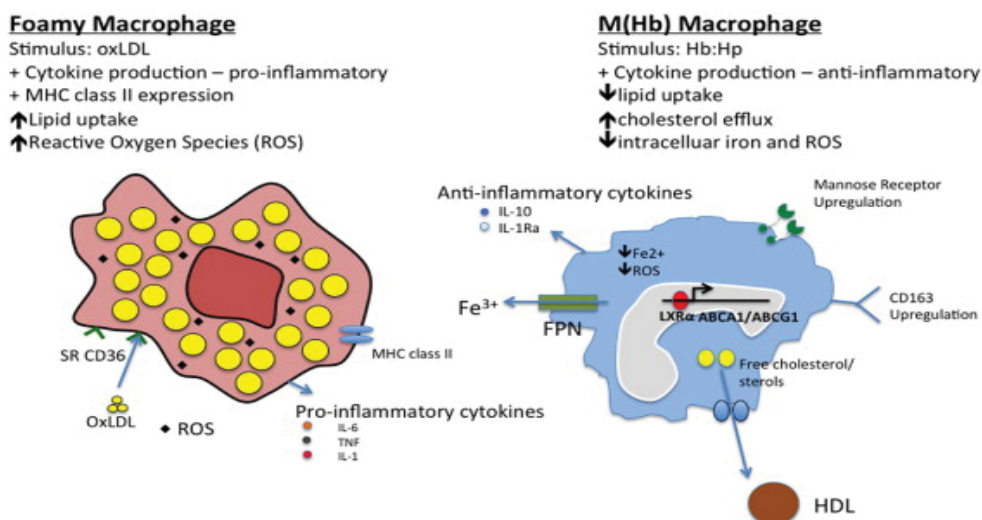
Фиг. 3. Участие на хепсидина в увреждането на клетките (по Ganz T, 2012)

Хепсидинът предизвиква отлагане на желязо в макрофагите в атеросклеротичните плаки с увеличаване на липидната пероксидация и прогресия на пенестите клетки [30], което води до риск от атеросклероза. Saeed и сътр. [35] демонстрират, че с потискане чернодробната секреция на хепсидин се намалява нивото на желязо в макрофагите, което понижава образуването на пенестите клетки и атеросклеротичните промени. Използвайки моноцити от атеросклеротични плаки, Finn и сътр. [36] доказват, че хепсидинът увеличава вътреклетъчното ниво на желязо, водейки до повишено образуване на ROS и намаляване на холестероловия ефлукс. Съотношението хепсидин/феритин е информативно относно вътреклетъчното ниво на желязо, което има значителна връзка с наличието на плаки и АВІ. Това доказва ролята на хепсидина и феритина в развитието на атеросклерозата [17-23]. Това би могло да обясни и парадокса от липсата на атеросклеротични промени при пациенти с хемохроматоза (HFE), въпреки значителното отлагане на желязо [30, 31, 43]. Ниското ниво на артериални коронарни заболявания при пациенти с β -таласемия майор и интермедия [44, 45] може да се свърже с повишените нужди от холестерол в резултат на еритроидна хиперплазия, и въпреки това в съчетание с ниски серумни нива на холестерол [44]. При тези пациенти ниските нива на хепсидин се счита, че имат протективна роля спрямо развитие на ССЗ [46, 47].

Хепсидинът би могъл да бъде нов маркер за ранна диагностика на ССЗ.

ХОМОЦИСТЕИНЪТ И РОЛЯТА МУ В ЕТИОЛОГИЯТА НА ССЗ

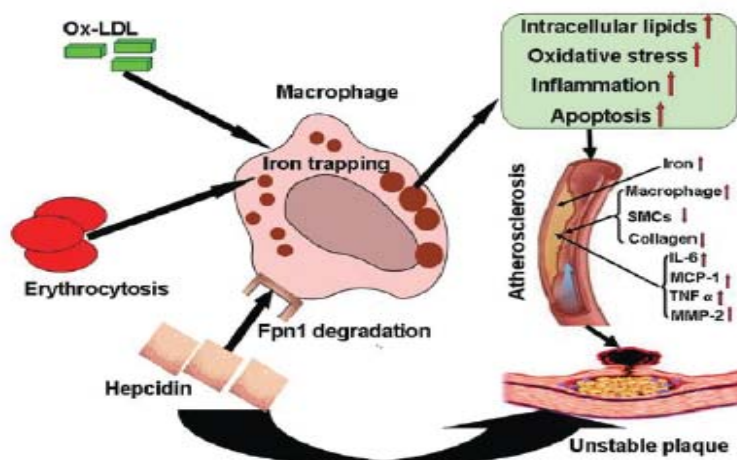
Хомоцистеинът (Hcy) се формира от метионина чрез пътя на трансметиране [48]. През 60-те години на миналия век, McCully [49] съобщава, че атеросклерозата и тромбозата са състояния, свързани с хомоцистеинурията (при вроден дефицит на цистатион β -синтаза) и значително високи нива на Hcy в кръвта (често $> 500 \mu\text{mol/L}$), и предполага, че това е свързано с нарушаване целостта на съдовата стена. Тази хипотеза търпи ново развитие през 1991 г., когато Clarke и сътр. [50] съобщават за хиперхомоцистеинемията като независим рисков фактор за сърдечно-съдови заболявания (ССЗ). Проведени са няколко проучвания, свързващи ниските концентрации на хомоцистеин при суплементиране с витамини от групата В (в частност фолиева киселина) с цел намаляване риска от ССЗ. За съжаление, те не успяват да докажат ролята на хомоцистеина в намаляването на риска от ССЗ [51]. Повечето проучвания стигат до извода, че намаляването на хомоцистеина не е пряко свързано с редуциране на риска от ССЗ, а че съществува зависимост между неговите нива и друг (по това време все още неустановен) маркер за ранна диагноза на ССЗ. Хомоцистеинът има пряка връзка с несвързаното желязо като независим рисков фактор за ССЗ [52].



Фиг. 4. Увреждане на клетките от ROS, окислен LDL (по Finn AV, 2012)

Повишените серумни нива на LDL холестерола (LDL-C) традиционно се свързват с настъпването на ССЗ. Нивото на окисления LDL холестерол се покачва в хода на атерогенезата. Окислително промененият LDL-C променя структурата и функцията на ендотелните клетки и чрез хемоатрактанти привличат моноцити в субендотелното пространство, където клетките се превръщат в липид-съдържащи пенести клетки на атерогенната плака [52]. Желязото катализира образуването на реактивни кислородни радикали (ROS). От друга страна, има доказателства, че и излишъкът на желязо води до повишен риск от ССЗ [53]. В крайна сметка както повишеното, така и намаленото ниво на желязо в организма се свързват по различни механизми с нарастване риска от развитие на ССЗ [54]. Обмяната на желязото се свързва с неговото освобождаване от

трансферина, феритина и секвестрираните еритроцити [55]. Свързването на желязо с трансферина и неговото освобождаване в ендозомите протича в почти всички клетки на организма. Това желязо е свободно и има функция да катализира оксидацията [56]. Около 50% от чернодробното желязо е под формата на феритин, открит в цитоплазмата и лизозомите [55]. Лизозомното усвояване на феритин в кисела среда води до освобождаване на малки количества свободно желязо. Процесът за рециклиране на желязото в ретикуло-ендотелната система е необходим за формиране на нови еритроцити в костния мозък [57]. Предполага се, че метионинът, S-аденозилхомоцистеинът и цистатинът са непрекъснато изложени на атаки от свободно желязо по време на неговата обмяна, което води до образуване на хомоцистеин.



Фиг. 5. Участие на хепсидина при дестабилизиране на атеросклеротичните плаки (по Li JJ, 2012)

Малко на брой са проведените проучвания, обясняващи връзката между хомоцистеина и желязото. Daher и Van Lente [58] установяват значителна положителна корелационна зависимост между хомоцистеина и желязото. Zheng и сътр. [59] доказват нарастване на хомоцистеиновите плазмени нива при пациенти, получаващи желязо и метионин, спрямо тези, получаващи допълнително само метионин. Съществуват и индиректни доказателства за връзката между хомоцистеин и желязо – с напредване на възрастта плазмените нива на Hcy се увеличават; подобна тенденция се наблюдава и при желязото в депата на организма. Плазмените нива на Hcy са по-високи при мъжете, което е установено и по отношение на серумните концентрации на желязото [59].

Mathioli и сътр. [60] установяват значителна корелационна зависимост между серумните нива на желязо и плазмения Hcy при мъже с миокарден инфаркт. Нивото на LDL-C също показва корелация с желязото. Schiepers и Durga [61] съобщават за значителна положителна корелация между плазмените нива на Hcy и феритин в серум. Liouris и сътр. [62] установяват значителна положителна зависимост между нивата на Hcy и желязо при плаки на каротидната артерия при пациенти, подложени на каротидендартеректомия. Те предполагат, че повишените плазмени нива на Hcy водят до образуване на ROS. Освен тях Pena-Duque и сътр. [63] установяват положителна корелация между плазмените нива на Hcy и желязото в аортата при пациенти, подлежащи на операция по повод коронароартериален байпас. Pimkova и сътр. [64] докладва за повишени плазмени нива на Hcy при пациенти с миелодиспластичен синдром (MDS) спрямо здрави контроли. При тях нивата на феритин в серум са по-високи при нормални концентрации на желязото. Плазмените нива на малоналдеhid (показател за оксидативен стрес) са значително повишени и в положителна зависимост с концентрациите на желязо и феритин, което предполага, че синтезът на ROS е свързан с нивата на желязо в депата на организма. При преглед на оксидативния стрес при болестта на Алцхаймер, Greenough и сътр. [65] установяват, че Hcy, ROS, оксидативното увреждане и нивата на желязо в депата са взаимно свързани. Плазмените нива на Hcy корелират положително с концентрацията на циркулиращо желязо и отлагането на желязо в артериалните плаки. Тези публикации потвърждават хипотезата за връзка между желязо и ССЗ [66], с участието на хомоцистеина.

Необходими са по-задълбочени изследвания за установяване на етиологичната роля на хиперхомоцистеинемията в риска от ССЗ, поради факта, че намаляването на нивата на Hcy не води до редуциране на риска от ССЗ. Brattström и Wilcken [67] предполагат, че антиоксидантната терапия би могла да намали Hcy-зависимото оксидативно увреждане на съдовата система.

ВРЪЗКАТА МЕЖДУ ЖЕЛЯЗОТО И ФЕРИТИНА СЪС ССЗ

Феритинът е протеин, под чиято форма се съхранява желязото в организма. Серумните концентрации на феритин са пропорционални на втърклетъчните феритинови нива; представлява най-добър индикатор за депото на желязо.

ССЗ имат най-голяма честота по отношение на смъртността в цял свят и са резултат от комбинацията между наследствени фактори и обкръжаваща среда [68, 69]. В този аспект, въпреки че желязото е есенциален микроелемент за голям брой физиологични процеси, неговото натрупване в организма е известно като рисков фактор за прогресията на атеросклерозата [70, 71]. Излишъкът от желязо стимулира развитието на атеросклеротични лезии, катализира продукцията на свободни радикали, води до липидна пероксидация чрез намаляване на антиоксидантите в плазмата; той се свързва и с повишен риск от развитие на исхемични сърдечно-съдови инциденти [72, 73]. Няколко проучвания представят връзката между натрупването на желязо и атеросклероза, coronary artery disease (CAD) [72, 74, 75]. Установена е ролята на феритина при каротидната атеросклероза [75]. Salonen и сътр. [76] показват, че високите феритинови концентрации (> 200 mg/L) са свързани с 2.2 пъти по-висок риск от остър миокарден инфаркт при мъже. Повишените нива на феритин допълнително увеличават възможността за развитие на атеросклероза в комбинация с други рискови фактори. Феритинът катализира синтеза на свободни кислородни радикали и липидната пероксидация, формирайки окислен LDL-C [77-79]. Окислението на LDL-C води до натрупване на липиди в ендотелните клетки и пречи на макрофагите да напуснат съдовата стена. Така настъпва атеросклеротичната лезия [68, 69, 80].

Благодарности

Настоящият проект е осъществен с финансовата подкрепа на Медицински университет – София, „Грант 2017“, Договор № Д-54/2017 г.

Библиографија

- Bots ML, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and lower extremity arterial atherosclerosis. The Rotterdam Study. *Arterioscler Thromb*, 1994; 14:1885-91.
- Bots ML, Witteman JC, Grobbee DE. Carotid intima-media wall thickness in elderly women with and without atherosclerosis of the abdominal aorta. *Atherosclerosis*, 1993; 102:99-105.
- Heiss G, Sharrett AR, Barnes R et al. Carotid atherosclerosis measured by B-mode ultrasound in populations: associations with cardiovascular risk factors in the ARIC study. *Am J Epidemiol*, 1991; 134:250-6.
- Polak JF, Pencina MJ, Meisner A et al. Associations of carotid artery intima-media thickness (IMT) with risk factors and prevalent cardiovascular disease: comparison of mean common carotid artery IMT with maximum internal carotid artery IMT. *J Ultrasound Med*, 2010; 29:1759-68.
- Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ et al. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation* 1997; 96:1432-7.
- Hodis HN, Mack WJ, LaBree L et al. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Med*, 1998; 128:262-9.
- O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA et al. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med*, 1999; 340:14-22.
- Chambless LE, Heiss G, Folsom AR et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study, 1987-1993. *Am J Epidemiol*, 1997; 146:483-94.
- Daniels LB, Clopton P, Laughlin GA et al. Growth-differentiation factor-15 is a robust, independent predictor of 11-year mortality risk in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. *Circulation*, 2011; 123:2101-10.
- Lind L, Wallentin L, Kempf T et al. Growth-differentiation factor-15 is an independent marker of cardiovascular dysfunction and disease in the elderly: results from the Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) study. *Eur Heart J*, 2009; 30:2346-53.
- Wang TJ, Wollert KC, Larson MG et al. Prognostic utility of novel biomarkers of cardiovascular stress: the Framingham Heart Study. *Circulation*, 2012; 126: 1596-604.
- de Filippi CR, de Lemos JA, Christenson RH et al. Association of serial measures of cardiac troponin T using a sensitive assay with incident heart failure and cardiovascular mortality in older adults. *JAMA*, 2010; 304:2494-502.
- Sullivan JL. Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet*, 1981; 1:1293-1294.
- Tuomainen TP, Loft S, Nyyssönen K et al. Body iron is a contributor to oxidative damage of DNA. *Free Radic Res*, 2007; 41:324-328.
- Kraml PJ, Klein RL, Huang Y et al. Iron loading increases cholesterol accumulation and macrophage scavenger receptor I expression in THP-1 mononuclear phagocytes. *Metabolism*, 2005; 54:453-459.
- Lapenna D, Pierdomenico SD, Ciofani G et al. Association of body iron stores with low molecular weight iron and oxidant damage of human atherosclerotic plaques. *Free Radic Biol Med*, 2007; 42:492-498.
- Kiechl S, Willeit J, Egger G et al. Body iron stores and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from the Bruneck study. *Circulation*, 1997; 96:3300-3307.
- Salonen JT, Tuomainen TP, Salonen R et al. Donation of blood is associated with reduced risk of myocardial infarction. The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Am J Epidemiol*, 1998; 148:445-451.
- Meyers DG, Jensen KC, Menitove JE. A historical cohort study of the effect of lowering body iron through blood donation on incident cardiac events. *Transfusion*, 2002; 42:1135-1139.
- Meyers DG, Strickland D, Maloley PA et al. Possible association of a reduction in cardiovascular events with blood donation. *Heart*, 1997; 78:188-193.
- Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci E et al. Blood donations and risk of coronary heart disease in men. *Circulation*, 2001;103:52-57.
- Zheng H, Cable R, Spencer B et al. Iron stores and vascular function in voluntary blood donors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005; 25:1577-1583.
- Engberink MF, Geleijnse JM, Durga J et al. Blood donation, body iron status and carotid intima-media thickness. *Atherosclerosis*, 2008; 196:856-862.
- Peffer K, den Heijer M, Holewijn S et al. The effect of frequent whole blood donation on ferritin, hepcidin, and subclinical atherosclerosis. *Transfusion*, 2013; 53:1468-1474.
- Ganz T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood*, 2011; 117:4425-4433.
- Kroot JJ, Tjalsma H, Fleming RE, Swinkels DW. Hepcidin in human iron disorders: diagnostic implications. *Clin Chem*, 2011; 57:1650-1669.
- Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta*, 2012; 1823:1434-1443.
- Fleming RE, Ponka P. Iron overload in human disease. *N Engl J Med*, 2012; 366:348-359.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*, 2010; 142:24-38.
- Sullivan JL. Macrophage iron, hepcidin, and atherosclerotic plaque stability. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2007; 232:1014-1020.
- Sullivan JL. Iron in arterial plaque: modifiable risk factor for atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta*, 2009; 1790:718-723.
- Kuragano T, Itoh K, Shimonaka Y et al. Hepcidin as well as TNF- α are significant predictors of arterial stiffness in patients on maintenance hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*, 2011; 26:2663-2667.
- Van der Weerd NC, Grooteman MP, Bots ML et al. CONTRAST Investigators. Hepcidin-25 is related to cardiovascular events in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, 2012; 0:1-8.
- Li JJ, Meng X, Si HP et al. Hepcidin destabilizes atherosclerotic plaque via overactivating macrophages after erythrophagocytosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012; 32:1158-1166.
- Saeed O, Otsuka F, Polavarapu R et al. Pharmacological suppression of hepcidin increases macrophage cholesterol efflux and reduces foam cell formation and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012; 32:299-307.
- Finn AV, Nakano M, Polavarapu R et al. Hemoglobin directs macrophage differentiation and prevents foam cell formation in human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*, 2012;59:166-177.
- Rundek T, Brook RD, Spence JD. Letter by Rundek et al regarding article, "Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis". *Circulation*, 2007; 116:e317; author reply e318.
- Valenti L, Dongiovanni P, Motta BM et al. Serum hepcidin and macrophage iron correlate with MCP-1 release and vascular damage in patients with metabolic syndrome alterations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011; 31:683-690.

39. Valenti L, Swinkels DW, Burdick L et al. Serum ferritin levels are associated with vascular damage in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2011; 21:568-575.
40. Aigner E, Theurl I, Theurl M et al. Pathways underlying iron accumulation in human nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr*, 2008; 87:1374-1383.
41. Swinkels DW, Drenth JP. Hpcidin in the management of patients with mild non-hemochromatotic iron overload: Fact or fiction? *J Hepatol*, 2008; 49:680-685.
42. Bekri S, Gual P, Anty R et al. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology*, 2006; 131:788-796.
43. Sullivan JL. Do hemochromatosis mutations protect against iron-mediated atherogenesis? *Circ Cardiovasc Genet*, 2009; 2:652-657.
44. Shalev H, Kapelushnik J, Moser A et al. Hypocholesterolemia in chronic anemias with increased erythropoietic activity. *Am J Hematol*, 2007; 82:199-202.
45. Crowley JP, Sheth S, Capone RJ, Schilling RF. A paucity of thalassemia trait in Italian men with myocardial infarction. *Acta Haematol*, 1987; 78:249-251.
46. Nemeth E. Hpcidin in beta-thalassemia. *Ann N Y Acad Sci*, 2010; 1202:31-35.
47. Origa R, Galanello R, Ganz T et al. Liver iron concentrations and urinary hepcidin in beta-thalassemia. *Haematologica*, 2007; 92:583-588.
48. Finkelstein, JD. Methionine metabolism in mammals. *J. Nutr. Biochem*, 1990, 1, 228-237.
49. McCully, KS. Homocystinuria, arteriosclerosis, methylmalonic aciduria, and methyltransferase deficiency: A key case revisited. *Nutr. Rev*, 1992, 50, 7-12.
50. Clarke R, Daly L, Robinson K et al. Hyperhomocysteinemia: An independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med*, 1991, 324, 1149-1155.
51. Yang H-T, Lee M, Hong K-S et al. Efficacy of folic acid supplementation in cardiovascular disease prevention: An updated meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Int Med*, 2012, 23, 745-754.
52. Holvoet P, Collen D. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *FASEB J*, 1994, 8, 1279-1284.
53. Lapice E, Masulli M, Vaccaro O. Iron deficiency and cardiovascular disease: An updated review of the evidence. *Curr Atheroscler Rep*, 2013, 15, 358.
54. Hsu H-S, Li C-I, Liu C-S et al. Iron deficiency is associated with increased risk for cardiovascular disease and all-cause mortality in the elderly living in long-term care facilities. *Nutrition*, 2013, 29, 737-743.
55. Bacon BR, Tavill AS. Role of the liver in normal iron metabolism. *Sem Liver Dis*, 1984, 4, 181-192.
56. Lamb DJ, Leake DS. Iron released from transferrin at acidic pH can catalyse the oxidation of low density lipoprotein. *FEBS Lett*, 1994, 352, 15-18.
57. Bothwell TH, Charlton RW, Motulsky AG. Hemochromatosis. In *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 7th ed.; Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Eds.; McGraw-Hill, NY, USA, 1995; 2237-2269.
58. Daher R, van Lente F. Relationship of increased homocysteine with copper, iron, and zinc concentrations in serum. *Irish J Med Sci*, 1995, 164 (Suppl. 15), 21.
59. Zheng H, Huang X, Zhang Q, Katz SD. Iron sucrose augments homocysteine-induced endothelial dysfunction in normal subjects. *Kidney Int*, 2006, 69, 679-684.
60. Mattioli AV, Benetti L, Zennaro M et al. Acute myocardial infarction in young patients: Nutritional status and biochemical factors. *Int J Cardiol*, 2005, 101, 185-190.
61. Schiepers OJG, Durga J. Response to Baggott and Tamura: "Serum iron parameters and plasma total homocysteine concentrations." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2011, 66A, 657-658.
62. Lioupis C, Barbatis C, Drougou A et al. Association of hepcidin genotype and common cardiovascular risk factors with the amount of iron in atherosclerotic carotid plaques. *Atherosclerosis*, 2011, 216, 131-138.
63. Peña-Duque MA, Baños-González, MA, Valente-Acosta B et al. Homocysteine is related to aortic mineralization in patients with ischemic heart disease. *J Atheroscl Thromb*, 2012, 19, 292-297.
64. Pinková K, Chrástínová L, Suttnar J et al. Plasma levels of aminothiols, nitrite, nitrate, and malondialdehyde in myelodysplastic syndromes in the context of clinical outcomes and as a consequence of iron overload. *Oxid Med Cell Long* 2014, 2014.
65. Greenough MA, Camakaris J, Bush AI. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 2013, 62, 540-555.
66. Sullivan JL. Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet*, 1981, 1, 1293-1294.
67. Brattström L, Wilcken DEL. Homocysteine and cardiovascular disease: Cause or effect? *Am J Clin Nutr*, 2000, 72, 315-323.
68. Meyers DG. The iron hypothesis: does iron play a role in atherosclerosis? *Transfusion*, 2000; 40(8): 1023-9.
69. Bozzini C, Girelli D, Tinazzi E et al. Biochemical and genetic markers of iron status and the risk of coronary artery disease: an angiography-based study. *Clin Chem*, 2002; 48(4): 622-8.
70. Day SM, Duquaine D, Mundada LV et al. Chronic iron administration increases vascular oxidative stress and accelerates arterial thrombosis. *Circulation*, 2003; 107(20): 2601-6.
71. Knuiman MW, Divitini ML, Olynyk JK et al. Serum ferritin and cardiovascular disease: a 17-year follow-up study in Busseton, Western Australia. *Am J Epidemiol*, 2003; 158(2): 144-9.
72. Kiechl S, Willeit J, Egger G et al. Body iron stores and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from the Bruneck study. *Circulation*, 1997; 96(10): 3300-7.
73. Zheng H, Cable R, Spencer B et al. Iron stores and vascular function in voluntary blood donors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005; 25(8): 1577-83.
74. Auer J, Rammer M, Berent R et al. Body iron stores and coronary atherosclerosis assessed by coronary angiography. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2002; 12(5): 285-90.
75. Klipstein-Grobusch K, Koster JF, Grobbee DE et al. Serum ferritin and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr*, 1999; 69(6): 1231-6.
76. Salonen JT, Nyyssonen K, Korpela H et al. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation*, 1992; 86(3): 803-11.
77. Balla J, Vercellotti GM, Jeney V et al. Heme, heme oxygenase, and ferritin: how the vascular endothelium survives (and dies) in an iron-rich environment. *Antioxid Redox Signal*, 2007; 9(12): 2119-37.
78. Liao X, Lv C, Zhang X et al. A novel strategy of natural plant ferritin to protect DNA from oxidative damage during iron oxidation. *Free Radic Biol Med*, 2012; 53(2): 375-82.
79. Kraml P, Potockova J, Koprivova H et al. Ferritin, oxidative stress and coronary atherosclerosis. *Vnitr Lek*, 2004; 50(3): 197-202.
80. de Valk B, Marx JJ. Iron, atherosclerosis, and ischemic heart disease. *Arch Intern Med*, 1999; 159(14): 1542-8.