

ИЗСЛЕДВАНЕ НА ХЕПСИДИН В БИОЛОГИЧНИ ТЕЧНОСТИ

В. Манолов, Б. Атанасова, М. Велизарова и К. Цачев

Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, МФ, МУ – София
Централна клинична лаборатория, УМБАЛ „Александровска” – София

HEPCIDIN MEASUREMENT IN BIOLOGICAL FLUIDS

V. Manolov, B. Atanasova, M. Velizarova and K. Tzatchev

Department of Clinical Laboratory and Clinical Immunology, MF, MU – Sofia
Central Clinical Laboratory, University Hospital “Aleksandrovska” – Sofia

<p>Резюме:</p> <p>Ключови думи:</p> <p>Адрес за кореспонденция:</p>	<p>Пептидният хормон хепсидин играе ключова роля в регулирането на обмяната на желязото. Синтезира се в черния дроб, експресията му се регулира от статуса на желязо в организма, еритропоетичната активност, налягането на кислорода и цитокините. Хепсидинът намалява серумното желязо, като блокира функцията на експортера феропортин, представен предимно в макрофагите, хепатоцитите и дуоденалните ентероцити. Въвеждането в клиничнолабораторната практика на достъпни и надеждни количествени методи за изследване на хепсидин в кръв и урина би позволило по-задълбочено опознаване на клиничните нарушения в обмяната на желязото. За да се използва хепсидинът като нов маркер в рутинната клинична практика, са необходими усилия да се хармонизират различните количествени техники, да се осигури висока степен на сравнимост на резултатите от различните лаборатории и да се дефинират общи граници на медицинско решение.</p> <p>обмяна на желязо, регулация на хомеостазата на желязото, клинични нарушения в обмяната на желязото, хепсидин, количествено изследване на хепсидин, хармонизиране на аналитичните методи</p> <p><i>Д-р Виктор Манолов, Централна клинична лаборатория, УМБАЛ „Александровска”, ул. „Св. Г. Софийски” № 1, 1431 София, тел. 02 9230 928, e-mail: victhedoc2@yahoo.com</i></p>
<p>Summary:</p> <p>Key words:</p> <p>Address for correspondence:</p>	<p>The peptide hormone hepcidin plays a central role in the regulation of iron metabolism. It is predominantly synthesized in the hepatocytes, where its expression is regulated by the body iron status, erythropoetic activity, oxygen tension and inflammatory cytokines. Hepcidin lowers serum iron concentration by counteracting the function of the cell exporter ferroportin, presented mainly in the membrane of macrophages, hepatocytes and duodenal enterocytes. There is a need of implementing available and reliable quantitative methods in the clinical-laboratory practice for measuring hepcidin in the blood and urine. Prior to the use of hepcidin as a new marker for iron disorders in the routine clinical practice, efforts are required to harmonize the various assays, to provide high result comparability between the different laboratories and to define the general lines of medical decision making.</p> <p>iron metabolism, regulation of iron homeostasis, clinical iron disorders, hepcidin, quantitative measurements of hepcidin, harmonization of analytical methods</p> <p><i>Victor Manolov, M. D., Central Clinical Laboratory, University Hospital “Aleksandrovska”, 1, Sv. G. Sofiyski St., Bg – 1431 Sofia, tel. + 359 2 9230 928, e-mail: victhedoc2@yahoo.com</i></p>

Хепсидинът е пептиден хормон, който системно управлява обмяната на желязото [2, 6]. Синтезира се в черния дроб, секретира се в плазмата и се свързва с клетъчния експортер на желязо феропортин, като общата структура се интернализира в лизозомалните участъци на

клетъчните мембрани и се индуцира разграждане на феропортина. Взаимодействието по оста хепсидин-феропортин намалява експорта на желязото от клетките и контролира три основни аспекта на хомеостазата: абсорбция в червата, рециклиране от ендотелната макрофагеална

система и освобождаване от депата. Известни са три изоформи на хепсидина: зрялата биологично активна форма е с 25-аминокиселинна последователност в структурата, а двете по-малки изоформи, 20- и 22-хепсидин, нямат биологични функции. Синтезът на пептида се модулира в зависимост от нуждите на организма от желязо. Повишеното желязо в депата и възпалението индуцират продукцията на хепсидин, докато синтезът е намален при хипоксия, железен дефицит и стимулирана и/или неефективна еритропоеза. Дефицитът на хепсидин играе централна роля в свръхнатрупването на желязо при хемохроматоза и таласемии. Повишеният хепсидин при инфекции намалява наличното в организма желязо, а това е част от вътрешната защита срещу външни патогени [14, 20].

Количествената оценка на хепсидиновите концентрации в кръв и урина би била полезно диагностично средство при клинични нарушения в обмяната на желязото. Фокусът на научния интерес в последните години се премества от физиологичните механизми на регулация върху възможността за нова терапия на базата на хепсидинови агонисти и хепсидинови антагонисти – в тези случаи хепсидиновите серумни концентрации биха били терапевтичен прицел [2]. Значим е интересът към възможността в клиничнолабораторната практика да навлязат достъпни надеждни методи за количествено изследване на хепсидин в биологични течности. Това би задълбочило познаването на клиничните нарушения в хомеостазата на желязото и би позволило пептидът да бъде полезно средство в диференциалната диагноза и клиничния мениджмънт на редица заболявания.

Досега в практиката се използват разнообразни методи за изследване на хепсидин. Установена е значима разлика в абсолютните концентрации, получени с различни аналитични техники при изследване на едни и същи проби. Важно е да се постигне хармонизиране между отделните количествени платформи. Така би се постигнала висока степен на сравнимост на резултатите, а това би позволило да се дефинират общи граници на медицинско решение и би утвърдило клиничната значимост на хепсидина като нов маркер при патология в обмяната на желязото.

МЕТОДИ ЗА КОЛИЧЕСТВЕНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ХЕПСИДИН

Разнообразните количествени методи за изследване на хепсидин в биологични матрици могат да се групират в три основни направления: 1. Масспектрометрични методи; 2. Лиганд-свързващи методи и 3. Индиректни имунохи-

мични методи с маркер: конкурентен имунохимичен метод с радиоизотопен маркер RIA и ELISA конкурентен и сандвичев имунохимичен метод с ензимен маркер.

Масспектрометрия (MS)

Масспектрометрията е аналитична техника за определяне на елементния състав и охарактеризиране на структурата на малки молекули (включително пептиди). Принципът включва йонизация на молекулата, генериране на електрически натоварени структури или молекулни фрагменти и измерване на съотношението маса/заряд.

SELDI/MALDI –TOF-MS (Surface Enhanced Laser Desorption/Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization MS)

MALDI подходът е йонизационна техника, която позволява детекция чрез масспектрометрия. Голяма част от матрикса се възбужда чрез прилагане на мощен пулсационен лазер за кратко време, това индуцира десорбция и йонизация едновременно и на матрикса, и на изследваната съставка. Образуваните йони се екстрахират, ускоряват се чрез силно електромагнитно поле в специална тръба и се насочват ("политат") към анализатора за количествена детекция. При еднаква плътност на заряда, най-бързо се придвижват най-леките йони.

SELDI е вариант на MALDI техниката, който включва взаимодействие между активна твърда повърхност и прицелния за анализ компонент (обмяна на катиони или захващане към метални йони, имобилизирани върху твърдата повърхност). Първоначално SELDI-TOF-MS технологията е разработена като полуколичествен метод за изследване на хепсидин в урина и серум [13, 24]. Включването на синтетичен hepcidin-24 като вътрешен стандарт дава възможност за количествено определяне [23]. Оценката на аналитичната откриваемост е направена при ниски, средни и високи концентрации на хепсидин и експериментално наблюдаваните стойности са сравнени с очакваните. При методологията, адаптирана от Swinkles et al. [23], мотив от N-края на хепсидина се свързва върху повърхността на протеинов чип, натоварен с имобилизирани йони $\text{Cu}^{2+}/\text{Ni}^{2+}$: последователността от хепсидиновата структура има афинитет за свързване с тези йони (IMAC30- $\text{Cu}^{2+}/\text{Ni}^{2+}$, immobilized metal-affinity capture ProteinChip arrays). Въз основа на различната изоелектрична точка > 8 , изоформите на хепсидина може ефективно да се захванат и разделят също и чрез слаб йонен обмен със свързващата повърхност на перлички. Вътрешният стандарт позволява да се повиши възпроизводимостта, да се подобри точността,

като се намалят интерференциите от страна на матрикса, да се контролират настройките на апаратурата и да се определи концентрацията на хепсидина в анализирани проби [23]. Този методологичен подход е свързан с определени ограничения: ниска разделителна способност по маса и ниска производителност. Вътрешният стандарт, различаващ се от нативния пептид, създава проблеми по отношение на точността на резултатите. Предварителното преципитиране с последваща екстракция на хепсидина би могло да намали ефектите на матрикса.

MALDI-TOF-MS има подобрена разделителна способност и повишена аналитична чувствителност при използване на вътрешен стандарт, белязан със стабилен изотоп [1, 3, 10]. Разработено е и ултрафино хомогенизиране на матрикса, което значително подобрява аналитичното качество на резултатите по отношение на чувствителност и възпроизводимост. Предимствата на тази модификация са автоматизирана подготовка на пробите *on line*, бърза детекция на сигналите чрез *MALDI* чипове и компютризиран количествен анализ. Високата производителност е подходяща за референтни лаборатории и би била полезна както за обширни клинични изпитания, така и за изследване на голям брой пациенти при сравнително ниска себестойност на анализа [1].

IC-TOF-MS (Immuno-capture TOF-MS method)

Този метод е комбинация от захващане на хепсидина чрез първичната имунологична реакция антиген-антияло и последваща детекция на изолираната хепсидинова структура с платформата *TOF-MS*. Антителата срещу хепсидина са натоварени върху перлички от протеин А-сефароза. Серумът и вътрешният стандарт се инкубират заедно с комплекса перлички-антияло. Хепсидинът се елуира от повърхността на перличките чрез ацетонитрил и трифлуороцетна киселина. Спектърът маса/заряд се генерира и детектира чрез *TOF-MS*.

Този подход е подходящ за изследване на много ниски концентрации на хепсидин – под границата на откриване за аналитичната платформа *WCX (Weak Cation Exchange) – TOF-MS* (< 0.5 pmol/L). Функционалната долна граница на откриване се определя като съотношение сигнал (интезитет на пика)/шум = 3 [17].

Течна хроматография-Масспектрометрия/ Масспектрометрия (LC-MS/MS)

При тази аналитична техника пробата се разделя чрез течна хроматография и елуентът се анализира директно за разлика от *SELDI* и

MALDI техниките, при които йонизацията е в кристални проби. Детекцията се постига чрез фрагментиране на прекурсорен йон (който е обикновено с няколко заряда) до крайната прицелна йонна структура. Процесът се нарича селективно мониториране на реакцията и е високо специфичен и чувствителен. Йонизацията при тези условия е по-стабилна. За предварителната екстракция на хепсидина могат да се използват магнитни наночастици. Вътрешен стандарт от синтетичен хепсидин, маркиран със стабилен изотоп, се добавя към изследваните проби. Методът има много добра способност да разделя биоактивната форма хепсидин-25 от другите две по-малки изоформи – 20- и -22, които нямат регулаторни ефекти по отношение на желязото. Тази високоспециализирана технология е изключително полезна за изследване на серумен хепсидин при заболявания, при които освен хепсидин-25, са повишени и двете по-малки бионеактивни изоформи [21]: остър миокарден инфаркт, сепсис, анемия на хроничното заболяване, метаболитен синдром, хронична бъбречна недостатъчност. Методът има добра производителност и възможност за едновременно изследване и в серум, и в урина. Изследователите наричат тандема “златен стандарт” за изследване на хепсидин в биологични матрици.

Лиганд-свързващи методи

Тези методи се основават на способността на нативния хепсидин в серума да се конкурира с ^{125}I -хепсидин за свързване с I-хепсидин-свързващ домейн (hepcidin-binding domain HBD) [7]. Идентифициран е хепсидин-свързващият домейн в структурата на феропортина и синтетичен лиганд със същата последователност се използва в конкурентния анализ за количествено изследване в малък обем биологична течност. Аналитичната надеждност на този количествен подход не е добре дефинирана. Методът би трябвало да бъде внимателно валидиран за стабилност, специфичност, точност и аналитична откриваемост.

Индиректен имунохимичен анализ с маркер

Индиректен имунохимичен анализ с радиоизотопен маркер RIA

Разработен е оптимизиран конкурентен *RIA* анализ за изследване на хепсидин в плазма. В количественото определяне участват поликлонално тяло и синтетичен хепсидин, маркиран с ^{125}I . Границата на откриване е 0.6 µg/L. Определени са линейността, възпроизводимостта и

аналитичната откриваемост. Сравняването със SELDI-TOF-MS технологията показва значима корелация ($r = 0.96$). Установени са референтни граници за клинично здрави индивиди 1.1-55 $\mu\text{g/L}$. Проучени са и клинични групи с улцеративен колит, с желязо-дефицитна анемия, с хронична бъбречна недостатъчност (ХБН) без диализа и с ХБН на диализа. Количественият анализ установява значима промяна в хепсидиновите концентрации при различните клинични нарушения в сравнение с контролната група ($P \leq 0.0001$). Установена е и денонощна вариация в хепсидиновите концентрации: разлика в 8.00 и в 16.00 ч. [4]. Разработеният метод е приложен и за изследване на хепсидин в асцит, слюнка, жлъчка и плеврален излив. Проучването на пептида в тези биологични течности потвърждава неговата антимикуробна активност. Хепсидинът би могъл да бъде част от вътрешната защита на организма като компонент от широкия спектър антимикуробни пептиди, осигуряващи мукозния имунитет срещу външни патогени [12].

Разработен е и високочувствителен (high sensitive) метод RIA за изследване на хепсидин. Поликлоналните антитела срещу хепсидина първо са пречистени чрез афинитетна хроматография в колони със синтетичен хепсидин-24 и после са прекоцентрирани чрез ултрацентрифугиране. Като маркер е използван ^{125}I . Границата на откриване ($0.02 \mu\text{g/L}$) е много по-ниска от тази на предишни имунохимични методи за серумен хепсидин. Като калибратор е използван човешки хепсидин. Висока степен на корелация е наблюдавана при сравнение с TOF-MS ($r = 0.92$; $P < 0.0001$). Методът се характеризира с висока аналитична и функционална чувствителност, добра възпроизводимост, добра точност и би бил особено полезен при проучване на патологичните и физиологичните стимули върху хепсидина в областта на ниските концентрации на хормона [11].

Индиректен имунохимичен анализ с ензимен маркер ELISA

Първоначално е разработен ELISA метод за количествено изследване в серум на прекурсора прохепсидин. Прохепсидиновите нива не показват добра корелация с други параметри за определяне статуса на желязо (серумен феритин, серумно желязо, трансфериново насищане). Очевидно серумните прохепсидинови нива не отразяват достоверно промените в обмяната на желязото при клинични нарушения, както това е характерно за биоактивния хормон хепсидин [8].

Впоследствие е разработен конкурентен ELISA метод с антитела срещу хепсидина, които са имобилизирани върху твърда повърхност [9]. Методът се характеризира с приемлива възпроизводимост, но е установена по-значима вариация в областта на по-високите концентрации до 50 ng/ml . Не е проучена крос-реактивността на антителата към изоформите на хепсидин-20 и -22 и към прохепсидина.

Конкурентният анализ с рекомбинантен хепсидин-25 като вътрешен стандарт и с поликлонални антитела показва приемлива аналитична надеждност: оценени са възпроизводимостта, линейността, аналитичната откриваемост и специфичността. Методът е лесен за изпълнение, използват се малки обеми серум и се избягват продължителни процедури в преданалитичния етап. Направеното сравнение с аналитичната платформа SELDI-TOF-MS установява значима корелация между двата метода (Pearson correlation 0.863; $p = 0.027$). Методът има способност да диференцира промени в серумния хепсидин при различни клинични нарушения: желязо-дефицитна анемия, ювенилна хемохроматоза и лимфом на Ходжкин [15].

Използването на 2 моноклонални антитела при сандвичевия вариант на ELISA повишава чувствителността и специфичността на количественото определяне за биоактивната изоформа [5]. Резултатите корелират значимо с тези от златния стандарт LC-MS. Изпълнението на анализа не изисква високоспециализирано оборудване и експертно ниво на квалификация на персонала, има добра производителност и е достъпна възможността за рутинната клиничнолабораторна практика.

Разработен е високочувствителен сандвичев метод с по-ниска граница на откриване 30 pg/ml , отколкото тази за тандема LCMS 2.5 ng/ml [22]. Чрез охарактеризиране на епитопа са идентифицирани 3 класа антитела. Антителата 19D12 (клас 1) и 23F11 (клас 2) са оптимални като двойка при сандвичевия принцип с диапазон на измерване $0.03\text{-}100 \text{ ng/ml h(human)}$ Нерс. Третият клас антитела демонстрират по-висока специфичност за биоактивната изоформа. Детекцията на хепсидина е направена чрез 2 метода: стандартен и такъв със стъпка на алкализиране. По-високата чувствителност позволява да се определят ниските хепсидинови концентрации при желязо-дефицитна анемия и хемохроматоза, които не се улавят от валидирания ортогонален маспектрометричен метод. Избраната оптимална двойка антитела за сандвича не разграничава напълно трите изоформи 25-, 20- и 22-хепсидин.

МЕТОДОЛОГИЧНИ ПРОБЛЕМИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНЕТО НА ХЕПСИДИН

Съществува разнообразие от методи за изследване на хепсидин, но не всички са валидирани в съответствие със стандартизираните процедури. При някои от методите се съобщават данни за аналитични граници на откриване, а при други са дефинирани само границите на количествено определяне. Би трябвало всички разработени методи да бъдат валидирани съгласно указанията на International Conference of the Harmonization of analytical procedures [19].

Първият етап на международната пръстеновидна оценка (round robin) установява значими разлики в абсолютните концентрации при различните методи [18]. Резултатите от сравнението подчертават нуждата от стандартизиране и хармонизиране на отделните аналитични техники за изследване и в плазма, и в урина. Различни обстоятелства биха могли да обяснят значимата междулабораторна вариация. Не е ясно дали някои от методите определят само хепсидина в анализирания проби. Склонността на пептида да агрегира в биологични течности и в калибрационни разтвори или да се прикрепва върху лабораторната пластмаса налага особено внимание при стандартизиране на условията на преданалитичния етап. Използването на невалидирани калибратори също създава условия за разлики между абсолютните концентрации при различните количествени подходи. Не винаги хепсиинът в калибратора и нативният пептид в биологичната проба са напълно заменяеми. При имунохимичните методи трудностите се свързват с генерирането на специфични антитела, тъй като структурата на пептида е малка и компактна и остава запазена във висока степен в различните биологични видове. Важно е да се изясни и дали различните методи измерват само свободната фракция, само свързаната с плазмен протеин (предимно с α_2 -макроглобулин) или общата концентрация на двете фракции. Двете малки изоформи -22 и -20, които нямат роля при регулацията на хомеостазата на желязото, могат да интерферират върху резултатите от имунохимичните методи, защото антителата не могат да диференцират напълно само биоактивната 25-изоформа. Интерференцията би била подчертана при патологии с повишение и на трите изформи в кръвообращението.

Вторият етап на международната пръстеновидна оценка на резултатите за плазмен хепсидин очертава първите сериозни крачки към хармонизирането на отделните аналитични методи. Проучена е заменяемостта на синтетич-

ния хепсидин, който се използва като калибратор, и пептида в нативните проби. Установени са значими разлики в абсолютните стойности и повторемостта на резултатите при различните методи. Предложени са алгоритми, които позволяват на лабораториите да изчисляват „консенсусни“ стойности (hepcidin consensus values HEPCON) на базата на собствените резултати за нативния пептид. Тези алгоритми значително намаляват вариацията между методите и позволяват хармонизиране като стъпка преди дефинирането на заменяеми с нативния пептид калибратори. Проучването позволява и да се натрупват сравними данни от разработките на различни проучвателски екипи [16]. Хармонизирането би позволило с използването на сравними и надеждни резултати за хепсидин в клиничната практика да се дефинират общи критерии за диагноза и мониториране на терапията при клинични нарушения в обмяната на желязото.

Благодарност: Този обзор е изготвен с финансовата подкрепа на Медицинския университет – София: Проект № 7/2012 г.

Библиография

1. Anderson, D. S. et al. High-throughput matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry method for quantification of hepcidin in human urine. – *Anal. Chem.*, **82**, 2010, № 4, 1551-1555.
2. Andrews, N. C. Forging a field: the golden age of iron biology. – *Blood*, **112**, 2008, № 2, 219-230.
3. Bansal, S. S. et al. Quantification of hepcidin using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. – *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, **23**, 2009, № 11, 1531-1542.
4. Busbridge, M. et al. Development of a novel immunoassay for the iron regulatory peptide hepcidin. – *Br. J. Biomed. Sci.*, **66**, 2009, № 3, 150-157.
5. Butterfield, A. et al. A dual monoclonal sandwich ELISA specific for hepcidin-25. – *Clin. Chem.*, **56**, 2010, № 11, 1725-1732.
6. De Domenico, I. et al. The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. – *Mol. Biol. Cell.*, **18**, 2007, № 7, 2569-2578.
7. De Domenico, I. et al. The hepcidin-binding site on ferroportin is evolutionarily conserved. – *Cell. Metab.*, **8**, 2008, № 2, 146-156.
8. Frazer, D. M. et G. J. Anderson. Hepcidin compared with prohepcidin: an absorbing story. – *Am. J. Clin. Nutr.*, **89**, 2009, № 2, 475-476.
9. Ganz, T. et al. Immunoassay for human serum hepcidin. – *Blood*, **112**, 2008, № 10, 4292-4297.
10. Gay, M. C. L. et al. Quantitative assay of urinary hepcidin using MALDI-TOF mass spectrometry. – *Anal. Methods*, **2**, № 3, 268-274.
11. Grebenchtchikov, N. et al. High-sensitive radioimmunoassay for human serum hepcidin. – *Br. J. Haematol.*, **146**, 2009, № 3, 317-325.

12. Jayantha, A. et al. Presence of hepcidin-25 in biological fluids: Bile, ascitic and pleural fluids. – World J. Gastroenterol., 16, 2010, № 17, 2129-2133.
13. Kemna, E. H. et al. Novel urine hepcidin assay by mass spectrometry. – Blood, 106, 2005, № 9, 3268-3270.
14. Kemna, E. H. et al. Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. – Haematologica, 93, № 1, 2008, 90-97.
15. Koliaraki, V. et al. A novel immunological assay for hepcidin quantification in human serum. – PLoS One, 4, 2009, № 2, e4581.
16. Kroot, J. J. et al. Second round robin for plasma hepcidin methods: First steps toward harmonization. – Am. J. Hematol., 87, 2012, № 10, 977-983.
17. Kroot, J. J. et al. Immunochemical and Mass-Spectrometry-based Serum Hepcidin Assays for iron Metabolism Disorders. – Clin Chem, 56, 2010, № 10, 1570-1579.
18. Kroot, J. J. et al. Results of the first international round robin for the quantification of urinary and plasma hepcidin assays: need for standardization. – Haematologica, 94, 2009, № 12, 1748-1752.
19. Macdougall, I. et al. Current status of the measurements of blood hepcidin levels in chronic kidney disease. – Clin. J. Am. Soc. Nephrol., 5, 2010, 1681-1689.
20. Nemeth, E. et T. Ganz. Hepcidin and iron-loading anemias. – Haematologica, 91, 2006, № 6, 727-732.
21. Murphy, A. T. et al. Quantitation of hepcidin from human and mouse serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry. – Blood, 110, 2007, №3, 1048-1054.
22. Salimi-Moosavi, H., T. Arvedson, G. Doellgast et al. Development of a Sandwich ELISA to Measure Hepcidin in Serum Samples. Amgen Inc. 2003. www.aapsj.org.
23. Swinkles, D. W. et al. Advances in quantitative hepcidin measurements by time-of-flight mass spectrometry. – PLoS One, 3, 2008, № 7, e2706.
24. Tomosugi, N. et al. Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. – Blood, 108, 2006, № 4, 1381-1387.

Постъпил за печат на 26 ноември 2012 г.

№ 7 Медицински преглед Стр. 97

Panflavin
Pestillen

Химотерапевтичната активност на урея и гурма се основава на Турбидитата.

Гарантът, натурално предизвикан от гурма.

Против болката от простуда и инфлуенца забележително чрез гурма дезинфекция на урея и сърдечна мускулатура.

Против на мурт.
Против на мурт.
Против на мурт.

NOVALGIN
спазмолитично, облекчаващо от спазми,
безвредно и за гурма и деца
ANALGETICUM

Против болката, нервна, мускулна и нервна.

Без гурма забележително облекчава от простуда, мурт и мурт при мурт мурт.

Действието на NOVALGIN се основава на мурт мурт и мурт мурт мурт, както и при гурма мурт мурт от мурт мурт мурт.

ОРИГИНАЛЕН ОБЛЕДНИК
Таблетки по 10 табл. / 100 гр.
Мурт по 1 и 10 мурт / 1 и 10 гр. мурт.
Мурт по 1 мурт по 1 гр. мурт.
Мурт мурт мурт по 10 гр. мурт.

BAYER -Bayer- — Дистрибуция на Ройба.

За гурма мурт мурт мурт и гурма мурт мурт мурт мурт.

БАЙЕРЪ-ФАРМА А. Д-во
на мурт мурт и фармационно мурт мурт мурт

София, бул. Димитров № 16. Тел. 21743.

Това не е реклама