

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 616.155.194-02:616-006.04]-074

В. Н. Блиндарь, Г. Н. Зубрихина, И. И. Матвеева

АЛГОРИТМ СОВРЕМЕННОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ АНЕМИЧЕСКОГО СИНДРОМА У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

На большом клиническом материале ($n = 284$) разработан алгоритм исследования крови онкологических больных с анемическим синдромом. Выявлено, что у большинства (72%) онкологических больных развивается анемия по типу анемии хронических заболеваний, однако у части больных анемический синдром был вызван дефицитом железа. Встречались случаи B_{12} -дефицитной, аутоиммунной гемолитической анемии, а также неэффективного эритропоэза при метастатическом поражении костного мозга и миелодиспластических синдромах. Показана высокая значимость методов объективной оценки запасов железа (определение уровня ферритина и растворимых рецепторов трансферрина), эритропоэтической активности костного мозга (ретикулоциты и ретикулоцитарные индексы) и адекватного ответа на степень анемии (определение эндогенного эритропоэтина). Возможность определения концентрации гемоглобина в ретикулоцитах позволяет проследить за восстановлением содержания гемоглобина на ранних этапах лечения больного с железодефицитной анемией.

Ключевые слова: злокачественные новообразования, анемический синдром, ферритин, растворимые рецепторы трансферрина, эндогенный эритропоэтин, свободный гемоглобин, проба Кумбса, ретикулоциты

V.N. Blyndar, G.N. Zubrikhina, I.I. Matveyeva

THE ALGORITHM OF MODERN LABORATORY DIAGNOSTICS OF ANEMIC SYNDROME IN ONCOLOGIC PATIENTS

The algorithm of analysis of blood of oncologic patients with anemic syndrome was elaborated using large clinical sampling ($n=284$). It is established that 72% of oncologic patients developed anemia by kind of chronic diseases anemia. However in some patients the anemic syndrome was caused by the iron deficiency. The cases of B_{12} deficient, autoimmune hemolytic anemia were registered and inefficient erythropoiesis under metastatic lesion of bone marrow and myelodysplasia syndromes as well. The high importance of methods of objective evaluation of iron resources (level of ferritin and soluble receptors of transferrin), erythropoietic activity of bone marrow (reticulocytes and reticulocyte indices) and adequate response to anemia degree (level of endogenous erythropoietin). The possibility to detect the concentration of hemoglobin in reticulocytes makes it possible to monitor the restoration of hemoglobin content on early stages of treatment of patient with iron deficiency anemia.

Key words: malignant neoplasm, anemic syndrome, ferritin, soluble receptors of transferrin, endogenous erythropoietin, free hemoglobin, Coombs' test, reticulocyte

Известно, что почти у половины онкологических и онкогематологических больных выявляется анемический синдром (АС), который может быть вызван как хронической болезнью со всеми характерными патофизиологическими чертами [9], так и проводимой химиотерапией [13], а также рядом других причин (истинный и функциональный дефицит железа, витамина B_{12} и фолиевой кислоты, метастазы в костный мозг, аутоиммунный гемолиз, вторичные миелодиспластические синдромы и т. д.) [1, 8, 11].

Уровень гемоглобина (HGB) у больных с опухолевыми заболеваниями считают важным фактором прогноза [4]. Анемия сопровождается ухудшением выживаемости больных, что, с одной стороны, объясняется прогрессированием опухолевого процесса [6], а с другой – снижением оксигенации опухолевой ткани при низком уровне HGB. Гипооксигенные опухолевые клетки становятся более резистентными к лучевой и химиоте-

рапии. Увеличение гипоксии опухолевых клеток ассоциируется со снижением контроля над опухолевым процессом, а также показателей бессобытийной и общей выживаемости [14]. В экспериментальных исследованиях получены убедительные данные, подтверждающие отрицательное влияние тканевой гипоксии на ответ опухолевых клеток в процессе лечения [16].

Большое разнообразие факторов, лежащих в основе развития АС у онкологических больных, делает важной проблему дифференциальной диагностики, в связи с чем целью нашего исследования была разработка алгоритма лабораторной диагностики АС у онкологических больных.

Материалы и методы. АС изучен у 269 онкологических больных и у 15 сотрудников с впервые выявленной железодефицитной анемией (ЖДА), не получавших препаратов железа для коррекции анемии (табл. 1). Контрольную группу составили 311 здоровых лиц (сотрудники, доноры).

Кровь больных исследовали по 26 показателям на гематологическом анализаторе Sysmex ХЕ-2100-1 (РОШ, Москва). Определяли число эритроцитов (RBC) и содержание в них HGB, гематокрит (HCT), а также расчетные показатели, отражающие средний объем эритроцита (MCV), среднее содержание HGB в эритроците (MCH), среднюю концентрацию HGB в эритроцитной массе (MCHC), кривую распределения RBC по объему (RDW).

Для корреспонденции:

Блиндарь Валентина Николаевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. клин.-лаб. диагн.

Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Телефон: 324-28-70

E-mail: bld51@list.ru

Таблица 1

Характеристика материала

Нозологическая форма	Число больных	Число исследований
Рак молочной железы до лечения:		
I–II стадия	76	76
III–IV стадия	12	12
Рак желудка	31	31
Рак толстой кишки	24	24
Рак молочной железы в процессе химиотерапии	14	14
Рак легкого	24	24
Рак яичников	16	16
Рак шейки матки	5	5
Рак других локализаций	10	10
Лимфома Ходжкина (ЛХ)	14	102
Неходжкинские лимфомы (НХЛ)	9	33
Множественная миелома (ММ)	10	74
Острый лейкоз (ОЛ)	6	31
Миелодиспластические синдромы (МДС)	7	7
Саркома Юинга	1	8
Фиброзно-кистозная болезнь молочной железы	10	10
Железодефицитная анемия (ЖДА)	15	70
Итого больных	284	547
Контрольная группа (здоровые)	311	311
Всего...	595	858

Число ретикулоцитов (RET) подсчитывали как ручным методом с использованием в качестве суправитальной окраски бриллиантового крезилового синего, так и с помощью автоматического анализатора Sysmex XE-2100-1 (47 больных на высокодозной химиотерапии). Анализировали число RET в процентах и в абсолютных величинах (RETабс.), ретикулоцитарные индексы, характеризующие степень зрелости ретикулоцита: LFR – мелкие формы (зрелые RET), MFR – средние, HFR – крупные (молодые RET) и IFR – число незрелых RET как сумму MFR+HFR, и показатель, отражающий концентрацию HGB в ретикулоците (RET-He).

В плазме крови методом иммуноферментного анализа (ИФА), используя наборы разных фирм, определяли содержание: ферритина – Orgentec Diagnostika GmbH (Германия), растворимых рецепторов трансферрина (sRTF) – BioVendor (Чехия) и эндогенного эритропоэтина (ЕРО) – Biomerica (США).

Всем больным проводили прямую пробу Кумбса на основе гелевых технологий (прямой антиглобулиновый тест).

Свободный гемоглобин (HGBС) в плазме крови определяли гемиглобинцианидным методом на спектрофотометре

Multiskan Spectrum (ThermoLabsystems, Финляндия). Показатели HGBС (в г/л) высчитывали по калибровочной кривой на основе стандартного свободного гемоглобина биотеста HGBС. У всех больных подсчитывали лейкоцитарную формулу и исследовали морфологию эритроцитов.

Результаты и обсуждение. С целью выработки референтных значений для методов ИФА обследовали 326 здоровых (сотрудников, доноров), среди которых мужчин было 144, женщин – 182, у 15 из них выявили ЖДА.

У здоровых ($n = 311$) все показатели крови были в пределах нормы, количество RET колебалось от 0,8 до 1,3%, в абсолютных цифрах составляло $42,6 \pm 3,5 \cdot 10^9/л$ с разбросом $18,5–57,2 \cdot 10^9/л$. Показатели ретикулоцитарных индексов представлены в табл. 2.

Содержание ферритина в плазме здоровых (табл. 3) составило в среднем по группе $82,0 \pm 18,3$ нг/мл с колебаниями от 15 до 535 нг/мл, медиана – 42 нг/мл.

Если отбросить крайние значения, содержание ферритина в среднем составило 55,6 нг/мл с колебаниями от 22,0 до 346 нг/мл. У мужчин содержание ферритина составило $78,0 \pm 11,9$ нг/мл, у женщин – $57,7 \pm 11,5$ нг/мл.

Уровень sRTF у здоровых колебался от 0,67 до 3,8 мкг/мл, в среднем по группе составил $1,95 \pm 0,08$ мкг/мл, медиана – 1,67 мкг/мл. При наличии непараметрического распределения показателей 5-го и 95-го перцентилей составили соответственно 0,9 и 2,8 мкг/мл.

Содержание эндогенного ЕРО у здоровых было $26,6 \pm 2,33$ мЕ/мл; 5-й и 95-й перцентили – соответственно 8,6 и 32,9 мЕ/мл. В работе [12] представлены результаты исследования по определению уровня ЕРО, адекватного степени анемии (табл. 4).

У 15 сотрудников была выявлена анемия (HGB $85 \pm 0,4$ г/л) с микроцитарными (MCV $67,4 \pm 1,36$ фл), гипохромными (MCH $20,3 \pm 0,36$ пг; RET-He $22,4 \pm 0,7$ пг) характеристиками эритроцитов, с низким уровнем ферритина ($6,9 \pm 0,75$ нг/мл), что свидетельствовало о небольшом запасе железа, и с адекватной степени анемии продукцией эндогенного ЕРО ($299,9 \pm 7,8$ мЕ/мл). Концентрация sRTF ($5,7 \pm 1,3$ мкг/мл) превышала норму почти в 3 раза. По лабораторным данным АС был расценен как ЖДА.

У 88 больных раком молочной железы (РМЖ) до оперативного вмешательства исследования проведены вне зависимости от наличия или отсутствия анемии. У больных с доброкачественным процессом и у 81 с РМЖ признаки анемии отсутствовали. Количественные показатели красной крови и уровни ферритина, sRTF и ЕРО были в пределах нормы. Статистических различий в зависимости от стадии заболевания и по сравнению с показателями у больных с доброкачественными заболеваниями не получено.

У 4 больных РМЖ выявили значительное снижение уровня ферритина (7,6–11,3 нг/мл), при этом все количественные характеристики эритроцитов и HGB и их расчетные показатели (MCV, MCH, MCHC, RDW) были в норме, что, вероятнее всего, говорило о латентном дефиците железа. У трех больных РМЖ отмечено значительное снижение содержания HGB и RBC, при этом уровни ферритина и sRTF были в пределах нормальных величин, а уровень эндогенного ЕРО был адекватен степени анемии, что, скорее всего, можно расценить как анемию хронического заболевания (АХЗ).

Таблица 2

Число ретикулоцитов и ретикулоцитарные индексы в норме

Показатель	Число обследованных здоровых	Число RET		Ретикулоцитарные индексы			
		%	абс., $\cdot 10^9/л$	LFR, %	MFR, %	HFR, %	IFR (MFR+HFR), %
Норма (X)	311	$1,0 \pm 0,03$	$42,6 \pm 3,5$	$91,8 \pm 0,3$	$7,4 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,1$	8,2
Разброс		0,8–1,3	18,5–57,2	83,4–98,2	1,8–14,22	0–2,4	1,8–16,6
Медиана		1,2	43,0	92,0	2,0	0,8	

Референтные значения для методов ИФА здоровых

Показатель	Референтные значения (5-й и 95-й процентиля)	Среднее значение ($X \pm m$)	Медиана	Разброс показателей
Ферритин, нг/мл				
М	34,0–346,0	78,0 ± 11,9	42	16,6–535,0
Ж	22,0–112,0	57,7 ± 11,5	32	15,0–190,0
Растворимые рецепторы трансферрина, мкг/мл	0,9–2,8	1,95 ± 0,08	1,67	0,67–3,8
Эритропоэтин, мЕ/мл	8,6–32,9	26,6 ± 2,33	13,7	4,1–125,0

Нами обследованы 124 больных с АС, поступивших в клинику центра в течение 1 мес на химиотерапевтическое лечение (мужчин было 53, женщин – 71; возраст обследованных варьировал от 18 до 80 лет, средний возраст составил $52,1 \pm 2,68$ года).

По данным ВОЗ выделяют 4 степени анемии в зависимости от уровня HGB: легкую (< 130 – 95 г/л у мужчин и > 120 – 95 г/л у женщин), умеренную (< 95 – 80 г/л), выраженную (< 80 – 65 г/л) и тяжелую (< 65 г/л).

Легкая степень анемии отмечена у 82 (66,1%) больных, умеренная – у 25 (20,2%), выраженная – у 15 (12,1%), тяжелая – у 2 (1,6%) больных.

У 89 (71,8%) больных с распространенным (III–IV стадия) процессом (рак легкого – 24, рак желудка – 16, РМЖ – 14, рак яичников – 16, рак шейки матки – 5, рак толстой кишки – 4, другие локализации рака – 10) анемия носила характер АХЗ и характеризовалась как нормоцитарная (MCV $93,0 \pm 0,85$ фл), нормохромная (MCH $30,0 \pm 0,34$ пг). Число эритроцитов колебалось от $1,9$ до $4,6 \cdot 10^{12}/л$, в среднем по группе составляло $3,25 \pm 0,06 \cdot 10^{12}/л$, медиана – $3,28 \cdot 10^{12}/л$. Показатель анизоцитоза (RDW) колебался от 13,7 до 38,7%, в среднем составил $18,7 \pm 0,8\%$, что достоверно ($p < 0,001$) выше нормы. Отмечалось высокое или нормальное содержание ферритина ($340,9 \pm 35,3$ нг/мл) с колебаниями от 44 до 1913 нг/мл. Уровень sRTF был почти у всех больных ниже нормы или на нижней границе нормы и составил $1,14 \pm 0,09$ мкг/мл с колебаниями от 0,2 до 3,2 мкг/мл, медиана 0,9 мкг/мл.

Уровень ЕРО в среднем по группе составил $78,0 \pm 12,5$ мЕ/мл. У 16 (18%) больных его можно было расценить как адекватный степени анемии: при умеренной и выраженной анемии колебался от 115 до 898 мЕ/мл. У остальных 73 больных он оказался низким: у 41 больного был ниже 50 мЕ/мл и у 32 – с колебаниями от 50 до 100 мЕ/мл.

Число RET колебалось от 0 до 22%, в среднем по группе составило $3,6 \pm 0,43\%$, медиана 2,1%. В абсолютных цифрах число RET было равно $105,9 \pm 12,1 \cdot 10^9/л$.

У 33 человек (11 мужчин, 22 женщины) преобладали признаки дефицита железа и анемию (HGB $87,4 \pm 0,6$ г/л) можно было расценить как железодефицитную. У всех больных с ЖДА была II–III стадия рака толстой кишки или желудка. Анемия была микроцитарной (MCV $70,0 \pm 1,51$ фл), гипохромной (MCH $20,8 \pm 0,61$ пг), со сниженным содержанием ферритина ($6,9 \pm 1,01$ нг/мл), высоким уровнем sRTF ($3,7 \pm 0,52$ мкг/мл) и адекватной продукцией ЕРО ($187,4 \pm 2,6$ мЕ/мл). Однако показатель ЕРО оказался значительно ниже, чем у сотрудников ($299,9 \pm 7,8$ мЕ/мл) с ЖДА ($p < 0,001$).

У одного больного раком желудка через год после гастрэктомии выявлена V_{12} -дефицитная анемия.

В одном случае АС был обусловлен метастатическим поражением костного мозга.

Приводим отдельные случаи АС у больных, поступивших в отделение химиотерапии и в отделение химиотерапии гемобластозов.

Таблица 3

Клинический случай 1. Больная Э., 44 года. Поступила в отделение химиотерапии для продолжения лечения с анемией неясного генеза. Жалобы на слабость, головокружение, тахикардию, одышку, продолжительные и обильные менструации. В анамнезе миома матки.

Анализ периферической крови: WBC $6,1 \cdot 10^9/л$, RBC $4,45 \cdot 10^{12}/л$, HGB 67 г/л, MCV 59,2 фл, MCH 15,1 пг, MCHC 254 г/л, PLT $297 \cdot 10^9/л$, RET 1,2%. Прямая проба Кумбса отрицательная, ферритин 2,6 нг/мл, sRTF 6,8 мкг/мл, ЕРО 784 мЕ/мл, HGBC 0,04 г/л. Лейкоцитарная формула: п. 1%, с. 64%, э. 1%, лимф. 31%, мон. 4%. Микроцитоз +++, гипохромия +++ эритроцитов. По лабораторным данным – микроцитарная, гипохромная анемия, характерная для ЖДА с адекватной продукцией ЕРО.

Клинический случай 2. Больная С., 56 лет. В анамнезе рак яичников. Поступила через год после овариоэктомии на химиотерапевтическое лечение, выявлена нормоцитарная, нормохромная анемия.

Анализ периферической крови: WBC $5,1 \cdot 10^9/л$, RBC $3,1 \cdot 10^{12}/л$, HGB 87 г/л, MCV 92,2 фл, MCH 28,0 пг, MCHC 304 г/л, PLT $197 \cdot 10^9/л$, RET 0,7%. Прямая проба Кумбса отрицательная, ферритин 526 нг/мл, sRTF 0,8 мкг/мл, ЕРО 124 мЕ/мл, HGBC 0,25 г/л. Лейкоцитарная формула: п. 1%, с. 53%, лимф. 39%, мон. 7%.

На основании лабораторных данных АС расценен как АХЗ с неадекватной продукцией эндогенного ЕРО.

Клинический случай 3. Больной Р., 76 лет. В анамнезе рак желудка. Поступил через год после гастрэктомии на химиотерапевтическое лечение, выявлена макроцитарная, гиперхромная анемия.

Анализ периферической крови: WBC $3,1 \cdot 10^9/л$, RBC $1,65 \cdot 10^{12}/л$, HGB 67 г/л, MCV 132,2 фл, MCH 40,6 пг, MCHC 307 г/л, PLT $97 \cdot 10^9/л$, RET 0,7%. Прямая проба Кумбса отрицательная, ферритин 326 нг/мл, sRTF 1,2 мкг/мл, ЕРО 1984 мЕ/мл, HGBC 0,1 г/л. Лейкоцитарная формула: п. 1%, с. 33%, лимф. 49%, мон. 17%. Нормобласты 28:100 лейкоцитов. Выраженный анизопокилоцитоз +++, макроцитоз +++, единичные мегалоциты, гиперхромия +++. В эритроцитах встречаются тельца Жолли, кольца Кебота. Среди нейтрофилов отмечаются гиперсегментированные, гипогранулярные и гигантские формы.

На основании лабораторных данных АС расценен как V_{12} -дефицитная анемия. Проведена терапия витамином V_{12} . Отмечен хороший терапевтический эффект с высоким ретикулоцитарным кризом на 5–7-й день лечения (35%).

Клинический случай 4. Больная Г., 54 года. Поступила в отделение химиотерапии с анемией неясного генеза. 10 лет назад была операция по поводу РМЖ. В костном мозге выявили метастазы.

Анализ периферической крови: WBC $6,1 \cdot 10^9/л$, RBC $3,45 \cdot 10^{12}/л$, HGB 107 г/л, MCV 89,2 фл, MCH 31,0 пг, MCHC 347,0 г/л, PLT $297 \cdot 10^9/л$, RET 1,7%. Прямая проба Кумбса от-

Таблица 4

Уровень эритропоэтина при анемии, считающийся адекватным степени гипоксии

Степень анемии (по данным ВОЗ)	HGB, г/л	ЕРО, мЕ/мл (по данным F. Hoffman-La Roche)
Легкая	≥ 95 , но < 120	70–100
Умеренная	< 95 –80	≥ 180
Выраженная	< 80 –65	> 200
Тяжелая	< 65	250–300

рицательная, ферритин 1326 нг/мл, sRTF 8 мкг/мл, EPO 984 мЕ/мл, HGB 0,1 г/л.

Лейкоцитарная формула: мц. 1%, п. 1%, с. 76%, лимф. 15%, мон. 7%. Нормобласты 17:100 лейкоцитов. Отмечается микроцитоз +, макроцитоз +, гипохромия + эритроцитов.

По лабораторным данным – нормоцитарная, нормохромная анемия с адекватной продукцией EPO, характерная для неэффективного эритропоэза при метастатическом поражении костного мозга.

Клинический случай 5. Больная С., 48 лет. Поступила в отделение химиотерапии гемобластозов с увеличением шейных и надключичных лимфатических узлов, с диагнозом НХЛ. В анализе крови: RBC $0,57 \cdot 10^{12}/л$, HGB 42 г/л, HTC 6,3%, MCV 115 фл, MCH 73,7 пг, MCHC 667 г/л, RET 37%. Высокие значения MCH, MCHC, агрегаты RBC (“монетные столбики”) свидетельствовали об агглютинации эритроцитов, а повышенное число RET – о гемолизе. Была поставлена прямая проба Кумбса, которая оказалась резко положительной. HGB в плазме крови был несколько повышен (0,8 г/л при норме 0,09–0,4 г/л). В мазке крови отмечался резкий анизоцитоз эритроцитов (макроцитоз ++ и микроцитоз +).

На основании лабораторных данных AC был расценен как аутоиммунная гемолитическая анемия. Больной начато лечение преднизолоном и через неделю в анализе крови: HGB 66 г/л, RBC $1,94 \cdot 10^{12}/л$, HTC 20,4%, MCV 105 фл, MCH 34,0 пг, MCHC 324 г/л, RET 2,3%.

Клинический случай 6. Больной Б., 76 лет. Поступил в отделение химиотерапии гемобластозов с диагнозом МДС, рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами (РАКС).

Анализ периферической крови: WBC $3,1 \cdot 10^9/л$, RBC $2,45 \cdot 10^{12}/л$, HGB 67 г/л, MCV 109,2 фл, MCH 27,3 пг, MCHC 250 г/л, PLT $87 \cdot 10^9/л$, RET 0,4%. Прямая проба Кумбса отрицательная, ферритин 3260 нг/мл, sRTF 0,5 мкг/мл, EPO 184 мЕ/мл, HGB 0,09 г/л. Лейкоцитарная формула: бластные клетки 1%, мц. 3%, ммц. 1%, п. 1%, с. 39%, лимф. 48%, мон. 7%. Нормобласты 127:100 лейкоцитов. Выраженный пойкилоцитоз эритроцитов (каплевидные формы, сфероциты), макроцитоз +++, в единичных эритроцитах базофильная пунктация, тельца Жолли, кольца Кебота. Нейтрофилы с признаками дисплазии, отмечались гипосегментированные (пельгероидные) и гиперсегментированные формы, клетки со сниженной зернистостью и без зернистости (агрануляция). Встречались гигантские формы тромбоцитов.

По лабораторным данным AC с макроцитарными, нормохромными характеристиками эритроцитов, с неэффективным гемопоэзом и неадекватной продукцией эндогенного эритропоэтина характерен для МДС, РАКС.

Для анализа значимости определения числа RET, их индексов и RET-He (гемоглобин в ретикулоцитах) при восстановлении эритропоэза было проведено изучение этих показателей у 47 онкогематологических больных (ЛХ – 14 больных, НХЛ – 9, ММ – 10, ОЛ – 6, МДС – 7, саркома Юинга – 1) на фоне высокодозной химиотерапии (ВХТ) с последующей трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ГКС).

У всех больных на фоне ВХТ, начиная в основном с 4-х суток после трансплантации ГКС, развилась цитопения с агранулоцитозом, продолжавшимся от 1 до 27 дней, в среднем 11 дней, медиана (М) 9,5 дня. Анемия была умеренной (HGB 80–94 г/л) или легкой (HGB > 95 г/л и < 130 г/л – у мужчин и < 120 г/л – у женщин). С 4-го по 10-й день после ГКС число RET практически было нулевое – $0,08 \pm 0,02\%$, М = 0,08%. С 10-х суток начинается постепенное увеличение числа RET: на 12-е сутки $0,9 \pm 0,1\%$, М = 0,5%; на 20–25-е сутки – $1,1 \pm 0,1\%$, М = 1,1%; на 30-е сутки – $1,4 \pm 0,4\%$, М = 1,2%. В абсолютных цифрах среднее число RET с 4-го по 10-й день составило $5,4 \cdot 0,8 \cdot 10^9/л$ и только на 30–35-й день оно приблизилось к нормальным показателям – $43,2 \cdot 10^9/л$ ($0,5 - 156,4 \cdot 10^9/л$), М = $29,1 \cdot 10^9/л$. Восстановление числа RET начиналось раньше, чем остальных показателей крови (HGB и WBC), с появления незрелых форм (IFR 16,3

$\pm 0,4\%$), в норме их число не превышает 8% (2,0–14,0%). Даже к 30-м суткам полного восстановления RET-индексов не было, число LFR ($75,9 \pm 1,6\%$) не достигло нормальных величин ($91,8 \pm 0,3\%$).

Показатель RET-He на фоне ВХТ, несмотря на значительное снижение содержания HGB, оставался в пределах нормы (28–34 пг) или даже был выше нормы (38,4–43,8 пг), особенно на 1–2-е сутки после переливания эритроцитарной массы.

В то же время у больных с ЖДА исходно уровень RET-He был низким ($23,4 \pm 0,5$ пг). На фоне лечения препаратами железа уже к концу 1-й недели он приближался к норме, тогда как концентрация HGB еще значительно отставала.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для современной диагностики AC необходимо проводить комплексное исследование показателей с помощью автоматических анализаторов и определения концентрации ферритина, sRTF и EPO, числа RET, HGB плазмы, пробы Кумбса. Помимо этого, число лейкоцитов, тромбоцитов и подсчет лейкоцитарной формулы позволяют оценить вероятность определенных заболеваний системы крови, которые могут сопровождаться анемией [11].

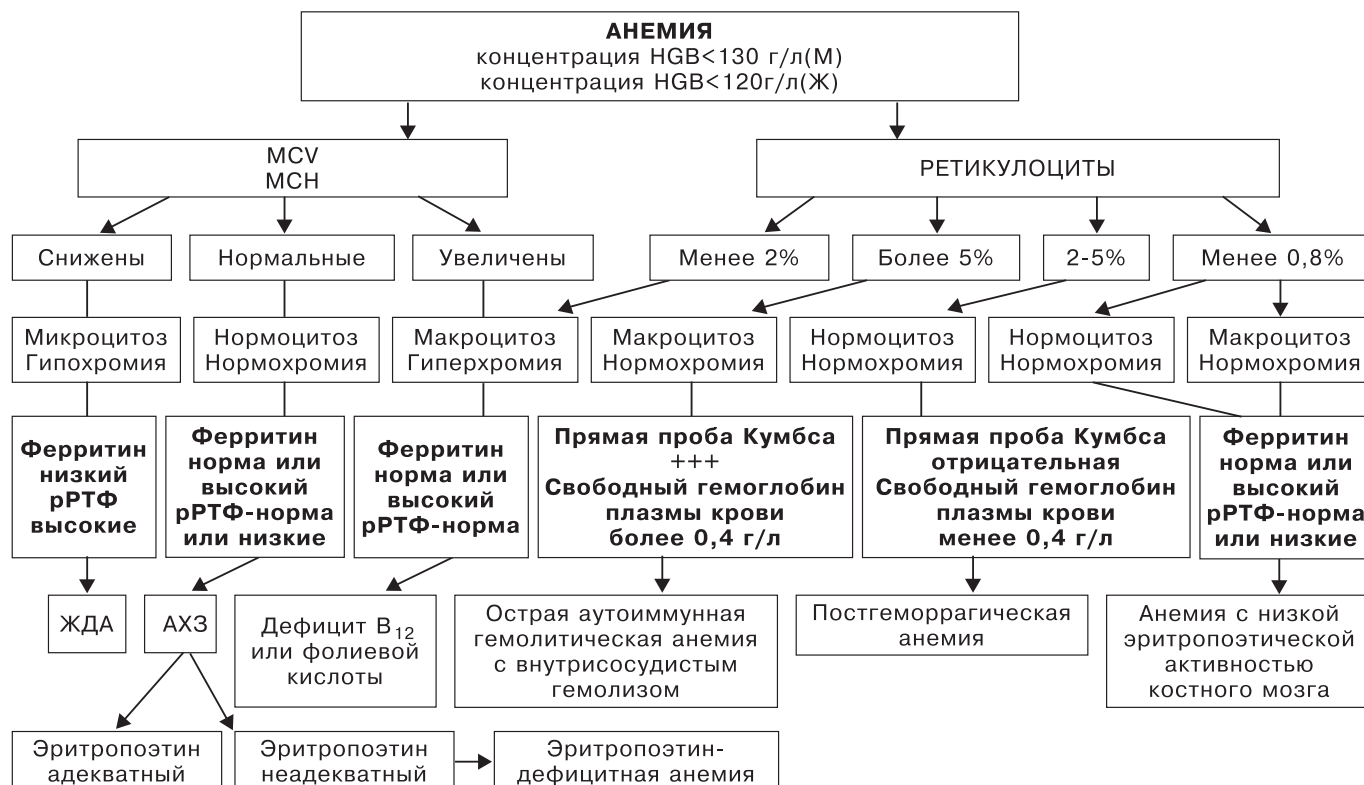
Наше исследование показало, что среди онкологических больных преобладают больные с АХЗ (71,8%) с нормоцитарными, нормохромными характеристиками эритроцитов, с относительно сохранным количеством RET. Одним из основных механизмов АХЗ является перераспределение железа в клетки макрофагальной системы. Поступающее в организм и освобождающееся из эритроцитов железо переходит главным образом в депо, где и накапливается в макрофагах в виде ферритина и гемосидерина [2, 8, 15]. У всех больных с АХЗ уровень ферритина был высоким, а sRTF – низким.

ЖДА и АХЗ, являющиеся наиболее распространенными формами анемии, дифференцируются в первую очередь в зависимости от содержания железа. Стандартные (обычные) показатели содержания железа, такие как ферритин, количество железа в сыворотке крови, подвержены влиянию хронических болезней, что приводит к получению неоднозначных результатов. В отличие от них концентрация sRTF повышается при недостатке железа и существенно не изменяется при хронических болезнях. Таким образом, определение количества sRTF в значительной степени повышает точность лабораторного диагноза при недостатке железа, даже у больных с хроническими заболеваниями [7].

Таблица 5

Алгоритм лабораторной диагностики анемий

- Гемоглобин (HGB)
- Эритроциты (RBC)
- Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH)
- Средний объем эритроцита (MCV)
- Распределение эритроцитов по объему (анизоцитоз эритроцитов) – (RDW)
- Ретикулоциты (RET)
- Морфология эритроцитов (описание)
- Включения в эритроцитах (тельца Жолли, кольца Кебота, базофильная пунктация, фрагментация эритроцитов)
- Нормобласты
- Ферритин в сыворотке крови (запас железа)
- Растворимые рецепторы трансферрина (дифференциальная диагностика ЖДА и АХЗ)
- Эритропоэтин – гормон дифференцировки эритроидных клеток
- Проба Кумбса (аутоиммунная гемолитическая анемия)
- Свободный гемоглобин в плазме крови (гемолиз)



Алгоритм дифференциальной диагностики анемического синдрома онкологических больных.

ЕРО – важный показатель в оценке анемического синдрома. У здоровых людей уровень ЕРО в плазме варьирует в пределах 8,6–32,9 мЕ/мл. Запасов ЕРО в организме не обнаружено. Уровень гормона в сыворотке низкий, но относительно стабильный. В физиологических условиях в ответ на уменьшение тканевой оксигенации синтез ЕРО в почке повышается [6]. Выделенный гормон связывается со специфическими рецепторами на поверхности предшественников эритроцитов в костном мозге, стимулируя их развитие, пролиферацию и в конечном итоге увеличивая концентрацию HGB. Таким образом, сигналом для повышения синтеза ЕРО служит тканевая гипоксия в ответ на уменьшение ее ниже порогового уровня [3, 5, 10]. Между уровнем ЕРО в плазме и уровнем HGB в крови имеется обратная логарифмическая линейная связь, которая иногда позволяет выявить причину анемии. Например, если у больного, страдающего анемией, уровень ЕРО в сыворотке крови высок, значит ответная реакция клеток, продуцирующих гормон, на тканевую гипоксию адекватна, однако отмечается функциональная недостаточность костного мозга. Низкий уровень ЕРО у больного с анемией свидетельствует о его недостаточной продукции, которая в ряде случаев может сочетаться и с ослаблением функции костного мозга. У большинства больных с ЖДА этот показатель оказался высоким, что свидетельствовало об адекватном ответе на гипоксию при анемии (ЕРО $187,4 \pm 2,6$ мЕ/мл, медиана 140 мЕ/мл), тогда как у больных с АХЗ в большинстве случаев ЕРО снижен ($78,0 \pm 12,5$ мЕ/мл, медиана 44 мЕ/мл). Однако у части больных с АХЗ (18%) ЕРО был адекватен степени анемии.

При выраженной анемии высокие показатели МСН и МСНС могут служить основанием заподозрить наличие агрегатов эритроцитов в крови и выполнить дополнительные исследования (прямая проба Кумбса, HGBc в плазме, число RET) с целью исключения аутоиммунной гемолитической анемии.

Определение числа RET с помощью гематологических анализаторов имеет свои преимущества перед ручным методом с использованием бриллиантового крезилового синего, так как наряду с высокой точностью позволяет получить представление о степени зрелости молодых эритроцитов

(RET). Большое число незрелых форм RET свидетельствует об активном эритропоэзе. Число RET крови и RET-индексы, определяемые на современных гематологических анализаторах, хорошо отражают не только степень угнетения или восстановления эритропоэза, но и гемопоэза в целом.

Кроме того, возможность определения концентрации HGB в RET (RET-He) позволяет проследить за восстановлением содержания HGB на ранних этапах лечения больного с ЖДА, поскольку при восстановлении эритропоэза появление RET с нормальными показателями HGB выявляется раньше, чем нормализация HGB в зрелых эритроцитах. У больных на ВХТ при частой трансфузии донорских эритроцитов этот показатель не отличался от нормального, вследствие чего он не всегда отражает при данной ситуации состояние гемопоэза больного.

Заключение. Таким образом, анемический синдром у онкологических больных – это сложный симптомокомплекс, алгоритм дифференциальной диагностики должен базироваться на лабораторных данных (табл. 5; см. рисунок), включающих не только определение количественных и качественных показателей крови, но и современные методы исследования, отражающие метаболизм железа и адекватность гормонального ответа на степень анемии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бессмельцев С. С. // Онкология. – 2008. – Т. 10, № 2. – С. 275–283.
2. Блиндарь В. Н., Зубрихина Г. Н. // Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2006. – Т. 17, № 2. – С. 19–21.
3. Блиндарь В. Н., Зубрихина Г. Н. // Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2007. – Т. 18, № 1. – С. 10–15.
4. Бредер В. В., Горбунова В. А., Бесова Н. С. // Соврем. онкол. – 2002. – Т. 4, № 3. – С. 134–136.
5. Гусева С. А., Бебешко В. Г. Эритропоэтин. Биологические свойства и клиническое применение. – Киев, 2005.
6. Жуков Н. В. // Онкология. 2008. – № 3. – С. 69–76.
7. Латин А. // Лаб. мед. – 2002. – № 5. – С. 1–6.
8. Лубянова И. П. // Актуальн. пробл. транспорт. мед. – 2010. – № 2. – С. 47–57.

9. Павлов А. Д., Морщакова Е. Ф., Румянцев А. Г. // Современ. онкол. – 2002. – Т. 4, № 2. – С. 50–54.
10. Павлов А. Д., Морщакова Е. Ф., Румянцев А. Г. Эритропоэтин: биологические свойства, возрастная регуляция эритропоэза, клиническое применение. – М., 2002.
11. Погорелов В. М., Козинцев Г. И., Ковалева Л. Г. Лабораторно-клиническая диагностика анемий. – М., 2004.
12. Рекормон. Инструкция по медицинскому применению препарата. Регистрац. номер 14262/02. Одобрено ФК МЗ РФ 14.03.02, прил. № 5.
13. Coiffier B., Guastalla J. P., Pujade-Lauraine E. et al. // Eur. J. Cancer. – 2001. – Vol. 37. – P. 1617–1623.
14. Glaspy J. A., Jadeja J. S., Justice G. et al. // Cancer. – 2003. – Vol. 97. – P. 1312–1320.
15. Hguyen N. B., Callaghan K. D., Ghio A. J. et al. // Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. – 2006. – Vol. 291, N 3. – P. 417–425.
16. Thews O., Kelleher D., Vaupel P. // Cancer Res. – 2001. – Vol. 61. – P. 1358–1361.

Поступила 24.03.11

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 616.15.191-092:612.6.05]-074

А. О. Абдуллаев, О. А. Глинщикова, С. А. Сулова, Н. Х. Шадиева, Л. Ю. Колосова, Л. М. Мещерякова, М. В. Вахрушева, А. Б. Судариков

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА МУТАЦИИ V617F ГЕНА JAK2 ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития РФ, Москва

Мутацию V617F гена JAK2 выявляют у 95% пациентов с истинной полицитемией, у 50% с эссенциальной тромбоцитемией и идиопатическим миелофиброзом. Мутация V617F может использоваться как молекулярный маркер ответа на лечение у больных с хроническими миелопролиферативными заболеваниями (ХМПЗ), ассоциированными с этой мутацией. Мы описываем метод количественного определения V617F (с чувствительностью до 0,01%) с помощью полимеразно-цепной реакции, который применим для оценки минимальной остаточной болезни у больных с ХМПЗ.

Ключевые слова: хронические миелопролиферативные заболевания, мутация V617F гена JAK2, количественная ПЦР

A.O. Abdullayev, O.A. Glinschikova, S.A. Suslova, N.Kh. Shadiyeva, L.Yu. Kolosova, L.M. Mescheryakova, M.V. Vakhrusheva, A.B. Sudarikov

THE QUANTITATIVE EVALUATION OF MUTATION V617F OF GENE JAK2 UNDER CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE DISEASES

The mutation V617F of gene JAK2 is detected in 95% of patients with genuine polycythemia, in 50% of patients with essential thrombocytemia and idiopathic myelofibrosis. The mutation V617F can be applied as a molecular marker of response to treatment in patients with chronic myeloproliferative diseases associated with this mutation. The technique of quantitative evaluation of V617F (sensitivity up to 0.01%) using polymerase chain reaction is described. This method can be applied to assess the minimal residual disease in patients with chronic myeloproliferative diseases.

Key words: chronic myeloproliferative diseases, mutation V617F of gene JAK2, quantitative polymerase chain reaction

Введение. Хронические миелопролиферативные заболевания (ХМПЗ) – группа Ph-негативных заболеваний, характеризующихся клональными нарушениями гемопоэтической полипотентной стволовой клетки и физиологически невосстановленной клональной гиперпролиферацией одного, двух или трех ростков миелопоэза с образованием очагов экстрамедуллярного кроветворения.

Наиболее распространенными среди ХМПЗ [4, 22] являются истинная полицитемия (ИП; описана в 1892–1903 гг. L. Vagues и W. Osler), распространенность которой составляет 1–1,5:100 000 населения, далее идут идиопатический миелофиброз (ИМФ; описан в 1879 г. G. Heuck) и эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ; описана в 1934 г. E. Epstein). Также по классификации ВОЗ (2008) к ХМПЗ относят казуистически редко встречаемый хронический нейтрофильный и эозинофильный лейкозы, мастоцитоз и неидентифицируемые ХМПЗ,

а также PDGFR α , PDGFR β , FGFR1-генассоциированные лейкозы [10, 23, 24]. Относительная схожесть клинико-морфологической картины (клональная гиперпродукция клеток миелоидного ряда, приводящая к фиброзным изменениям и истощению ресурсов костного мозга), нарушение реологических и коагуляционных свойств крови, образование экстрамедуллярных очагов патологического гемопоэза и относительно медленное хроническое клиническое течение позволили предположить схожие механизмы лейкемогенеза перечисленных заболеваний [14, 15].

Существенный прогресс в понимании молекулярного лейкемогенеза ХМПЗ произошел в 2005 г., когда была обнаружена точечная мутация 184G/T в гене JAK2, приводящая к замене валина на фенилаланин в 617-м кодоне [3, 9, 11, 15, 19, 27].

JAK2 (Janus kinase, a protein tyrosine kinase) цитоплазматическая тирозинкиназа, участвующая в передаче сигнала по пути “JAK-STAT” (Signal transducers and activators of transcription) [5, 13, 21, 26]. После связывания рецепторов с лигандами (эритропоэтин, тромбопоэтин и факторы роста: интерлейкин (IL) 3 и G-CSF) активированный белок JAK2 инициирует процесс димеризации STAT белков, они проникают в ядро клетки и сами или с участием других белковых факторов индуцируют транскрипцию генов, являющихся

Для корреспонденции:

Абдуллаев Адхам Одилович, науч. сотр. лаб. молекулярной гематологии

Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский пр., 4

Телефон: (495) 612-65-11

E-mail: adham_abdullaev@mail.ru