



**И.Б. БАРАНОВСКАЯ,
С.А. ОНИЩУК,**

Кубанский государственный университет, г. Краснодар
КМЛДО МУЗ городская больница № 2, г. Краснодар

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ СВЯЗИ МЕЖДУ РЕТИКУЛОЦИТАРНЫМИ И ЭРИТРОЦИТАРНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ГЕМОГРАММЫ

В настоящее время для диагностики различных заболеваний все большее значение приобретают результаты лабораторных анализов, полученных с помощью современных сложных и дорогостоящих анализаторов. Из методов исследования форменных элементов крови наибольшее значение имеет общеклинический анализ крови, который включает определение ряда эритроцитарных и ретикулоцитарных параметров. Анализ клеточного состава и индексов красной крови приобретает первостепенное диагностическое значение в случае гематологических заболеваний, включая анемии разного генеза. Практически все эритроцитарные и ретикулоцитарные показатели гемограммы связаны между собой математическими зависимостями. Это позволяет, в случае необходимости, по одним известным параметрам с высокой точностью устанавливать значения других.

Иногда между показателями существует линейная связь, и тогда расчет искомого индекса осуществляется достаточно просто. Но бывают ситуации, когда связь носит нелинейный характер. В этом случае наиболее часто аппроксимацию экспериментальных точек удается произвести с помощью экспоненциальных функций.

Примером тому может служить общеизвестная модель, связывающая ретикулоцитарные показатели *Ret-Y* и *Ret-He*, измеряющие по сути один феномен [1]. *Ret-Y* представляет собой среднее значение прямого светорассеяния гистограммы популяции ретикулоцитов, зависящее от объема клеток и содержания в них гемоглобина, что опосредованно концентрацией РНК. Эта безразмерная величина (номера каналов флуоресценции) используется рядом авторов для дифференциальной диагностики железодефицитных анемий от анемий хронических заболеваний [1, 2, 3], но не имеет ясно выраженного биологического или медицинского смысла. Однако известно, что линейное соотношение между концентрацией флуорохрома и интенсивностью флуоресценции сохраня-





ется лишь при оптической плотности объекта не выше 0,45, а при более высоких значениях оптических плотностей линейное соотношение переходит в экспоненциальное [4]. Чем ниже степень зрелости ретикулоцита, тем большее количество гемоглобина он содержит, и тем выше оптическая плотность цитозоля клетки, что выражается в экспоненциальной зависимости показателя *Ret-Y* с его концентрационным эквивалентом *Ret-He* (содержание гемоглобина в ретикулоцитах), данного в пикограммах:

$$Ret-He = 5,5569e^{0,001Ret-Y} [5].$$

Это выведенное эмпирическим путем регрессионное уравнение позволяет легко трансформировать показатели анализатора в величины, имеющие биологическое значение. Таким образом, использование экспоненциальных моделей для установления связи между различными показателями гемограмм является актуальным.

В данной работе ставилось целью разработка математических экспоненциальных моделей для установления взаимосвязи отдельных ретикулоцитарных параметров, имеющих значение в диагностике и мониторинге анемий разного генеза, с биохимическими маркерами обмена железа.

Если некоторый показатель *R* связан с другим показателем *x* экспоненциально, то в общем случае эта связь выражается формулой

$$R = He^{bx} + R_0.$$

Здесь *H* — масштабный множитель, имеющий размерность показателя *R*, *b* — коэффициент нелинейности, имеющий размерность, обратную размерности *x*, *R₀* — параметр насыщения. Если *b* > 0, то при *x* → ∞ *R* → *R₀*, если *b* < 0, то при *x* → ∞ также *R* → *R₀*.

Примером общего случая экспоненциальной зависимости является связь между содержанием гемоглобина в ретикулоцитах (*Ret-He*) и средним содержанием гемоглобина в эритроцитах *MCH*, показанная на рис. 1.

Само по себе увеличение *MCH* (среднее содержание гемоглобина в эритроците) с воз-

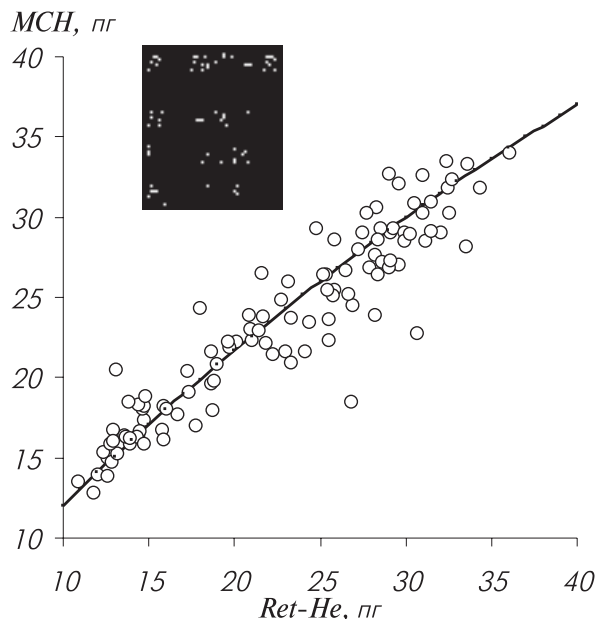


Рис. 1. Экспоненциальная зависимость между показателями *Ret-He* и *MCH*

растанием *Ret-He* легко объяснимо, так как *MCH* расчетная величина:

$$MCH = \text{гемоглобин (г/дл)} / \text{эритроциты (} \times 10^{12} / \text{л)}.$$

Общеизвестно, что синтез гемоглобина в клетках эритроидного ряда заканчивается на стадии ретикулоцита, а значит содержание эритроцитарного гемоглобина пропорционально ретикулоцитарному. Превращаясь в эритроциты за 1–2,5 дня, ретикулоциты содержат то количество гемоглобина, которое синтезировалось в них за последние 48 часов. Популяция же эритроцитов по сути гетерогенна. Эритроциты находятся в кровеносном русле в среднем 120 дней и состоят из клеток как созревших за последние месяцы, так и синтезированных в течение последних двух дней. Таким образом, экспоненциальная зависимость, отражает взаимосвязь между популяциями клеток красной крови, разделенными временным интервалом. Если рассматривать процесс созревания эритроцитов на уровне индивидуума, то теоретически возможны период железодефицитного эритропоэза, нормопоэза и периода избытка



железа для кроветворения (например, на фоне приема железосодержащих препаратов). Аналогичные процессы происходят на уровне статистически значимой совокупности организмов. Ретикулоциты же — гомогенная популяция клеток. Таким образом, если содержание гемоглобина в ретикулоцитах адекватно отражает состояние эритропоэза в режиме реального времени, то расчетный индекс *MCH* детерминирует содержание гемоглобина в эритроцитах, а значит доступность железа для эритропоэза за последние 3–4 месяца. Индекс *MCH* автоматически рассчитывается анализатором с учетом всей популяции эритроцитов.

Интересно то, что при пониженном значении *Ret-He* показатель $MCH > Ret-He$, а при повышенном значении *Ret-He* показатель $MCH < Ret-He$. Равенство наступает приблизительно при 26–27 пг. Данный факт объясняется довольно просто. В зарубежных исследованиях продемонстрировано, что при содержании гемоглобина в ретикулоцитах 27,2 пг железodeficit может быть диагностирован с чувствительностью 93,3% и специфичностью 83,2% пг. Более низкий порог, равный 26 пг, имеет 100% чувствительность (без ложноположительных результатов) и все еще достаточно хорошую специфичность [7]. Таким образом, при отсутствии железodeficitного эритропоэза (на развитие которого нужно определенное время) содержание гемоглобина в ретикулоците прямо пропорционально зависит от содержания гемоглобина в эритроците, а зависимость, близкую к линейной, мы объясняем неизменным содержанием гемоглобина в эритроцитах в течение последних 120 дней.

Установление параметров *H*, *b* и R_0 по экспериментальным точкам может быть произведено двумя способами: минимизацией функции методом наименьших квадратов и по заданным точкам. В последнем случае удобнее выбрать равноотстоящие точки $(x_1; R_1)$, $(x_2; R_2)$ и $(x_3; R_3)$ так, чтобы $x_3 - x_2 = x_2 - x_1$, то есть точка x_2 берется посередине между точками x_1 и x_3 (рис. 2).

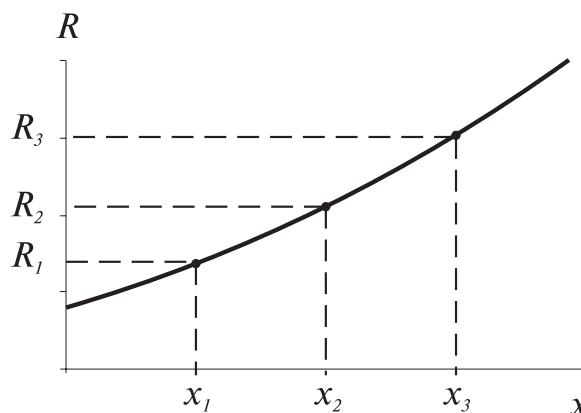


Рис. 2. Построение экспоненциальной зависимости по трем заданным точкам

Тогда *H*, *b* и R_0 можно вычислить по следующим формулам:

$$R_0 = \frac{R_1 R_3 - R_2^2}{R_3 - 2R_2 + R_1},$$

$$b = \frac{\ln \frac{R_3 - R_0}{R_1 - R_0}}{x_3 - x_1},$$

$$H = \frac{R_3 - R_0}{e^{bx_3}}.$$

Можно также независимо от R_0 вычислить *b*:

$$b = \frac{\ln \frac{R_3 - R_2}{R_2 - R_1}}{x_3 - x_2}.$$

На рис. 3 приведен пример применения трехточечного построения. В данном случае были взяты точки: (75;15), (125;21) и (175;36). Аппроксимирована зависимость *MCH* от *Ret-Y* (среднего значения гистограммы распределения эритроцитов по размерам). Если *MCH* расчетная средняя величина содержания гемоглобина в эритроците, о чем мы говорили выше, то показатель *Ret-Y* измеряется непосредственно в ретикулоцитарном блоке анализатора по интенсивности флуоресценции примерно 10 тыс. клеток и представляет-



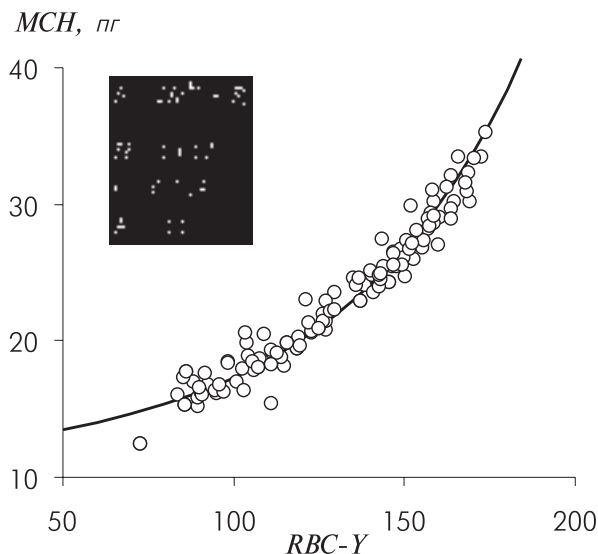


Рис. 3. Зависимость содержания гемоглобина в эритроцитах от содержания эритроцитов в крови

ся в виде номеров канала гистограммы. Следовательно, $Ret-Y$ — это среднее значение интенсивности флуоресценции популяции эритроцитов. По данным ряда авторов показатель $Ret-Y$ хорошо коррелирует с процентом гипохромных эритроцитов ($\% HYP0$), параметром, выполняемым анализатором Advia 120 (Bayer Corporation, Tarrytown, USA) [8]. Таким образом, если при ряде гематологических нарушений (в популяции эритроцитов имеются микро и макроциты) MCH оказывается не информативным, то $Ret-Y$, измеряя непосредственно концентрацию гемоглобина в эритроците, косвенно указывает на процент гипохромных эритроцитов в популяции. Нелинейная зависимость между показателями объясняется тем известным фактом, что с ростом концентрации вещества (в данном случае гемоглобина), оптическая плотность клетки связана с интенсивности флуоресценции экспоненциальной связью [4]. Но надо заметить, что экспоненциальная взаимосвязь прослеживается до величин $Ret-Y < 158,0-160,0$, что соответствует железодефицитному эритропоэзу.

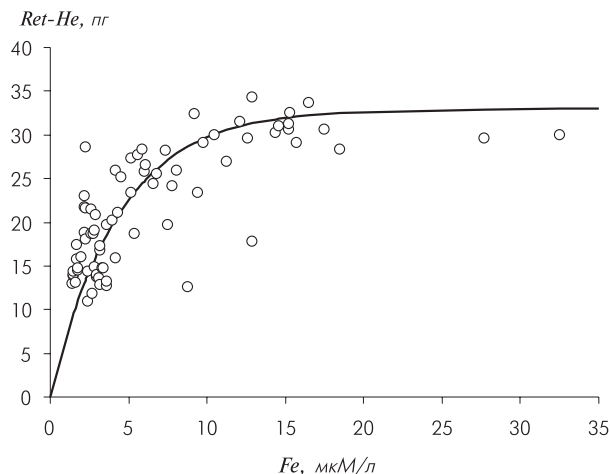


Рис. 3. Зависимость $Ret-He$ от концентрации сывороточного железа

При $Ret-Y > 160,0$ практически все эритроциты в популяции нормохромные, и взаимосвязь между $Ret-Y$ и MCH близка к линейной.

В частном случае экспонента может исходить из начала координат. Тогда $H = -R_0$ и формула экспоненциальной зависимости выглядит следующим образом:

$$R = R_0 (1 - e^{bx}).$$

Пример такой модели приведен на рис. 4. Видно, что содержание гемоглобина в ретикулоцитах зависит от содержания железа в крови экспоненциально. Понятно, что при гипотетическом отсутствии железа в сыворотке крови, синтез гемоглобина будет не возможен, поэтому логично поместить начало функции в начало координат. При этом численные значения параметров следующие: $R_0 = 33$ пг, $b = -0,23$ л/мкМ.

В данном случае экспериментальные точки относятся к анализам пациентов с анемиями разного генеза. Участок 0–7 мкмоль/л относится к пациентам с железодефицитной анемией (ЖДА), а участок 7–15 мкмоль/л — к пациентам с анемией хронических заболева-



ний (АХЗ). При абсолютном железодефиците содержание ретикулоцитарного гемоглобина почти линейно растет с увеличением концентрации сывороточного железа. Все доступное железо сыворотки крови используется для синтеза гемоглобина. При дальнейшем увеличении содержания сывороточного железа наступает состояние динамического равновесия между использованием микроэлемента для нужд эритропоэза и процессом распада гемоглобинсодержащих клеток, иными словами, между процессами синтеза и катаболизма. Перегрузка сывороточным железом возможна при гемолитических процессах в организме и при длительном приеме железосодержащих препаратов. При предельной концентрации сывороточного железа, превышающей 30 мкМ/л, наступает максимум физиологически возможной концентрации гемоглобина, обуславливающей биологическое существование клетки. Из *рисунка 4* можно заметить, что связь между параметрами на этом участке близка к линейной, что означает минимальный прирост *Ret-He* при любом увеличении концентрации сывороточного железа. В норме максимально возможное содержание гемоглобина в ретикулоцитах, по нашим данным, приблизительно 33–35 пг. Это согласуется с референтными значениями параметра *Ret-He*, которые составляют 28,2–36,4 пг [9].

Аппроксимация подобной зависимости проще общего случая экспоненты. При хорошо выраженной асимптоте R_0 , которая определяется как предел, к которому стремится функция при $x \rightarrow \infty$, требуется найти только параметр b . Для этого задается одна точка экспоненты $(x_1; R_1)$ и используется формула:

$$b = \frac{\ln\left(1 - \frac{R_1}{R_0}\right)}{x_1}.$$

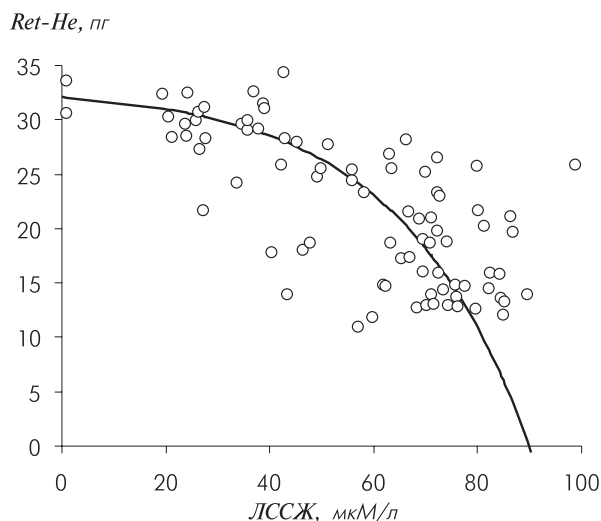


Рис. 5. Зависимость *Ret-He* от ЛССЖ — экспоненциальная модель

Другой частный случай экспоненты наблюдается тогда, когда кривая упирается концами в оси координат, как это показано на *рисунке 5*. В этом случае удобно представить формулу экспоненты в виде

$$R = R_0(1 - e^{b(x-C)}).$$

Это получается в том случае, если $H = -R_0 e^{-bc}$. Параметр C имеет математический смысл — это точка на оси x , где $R = 0$.

На *рисунке 5* показана зависимость R индекса ретикулоцитов *Ret-He* от x -латентной связывающей способности железа (ЛССЖ), с помощью которой оценивался метаболизм транспортного железа. Здесь приведены, как и в предыдущем случае, данные пациентов с ЖДА и пациентов с АХЗ, диагноз которых был установлен по результатам исследования гемограмм, маркеров обмена железа и данных анамнеза. В нашем случае аппроксимация экспериментальных точек экспоненциальной зависимостью выглядит гораздо лучше, чем линейной. Методом наименьших квадратов были установлены численные значения параметров функции: $R_0 = 33$ пг, $b = 0,04$ л/мкМ, $C = 95$ мкМ/л.

Степень изменения ЛССЖ почти всегда позволяет судить о метаболизме железа при





различной гематологической патологии. Повышение данного маркера является одним из первых проявлений истощения запасов железа и гипоксии тканей. Экспоненциальную зависимость *Ret-He* от ЛССЖ можно объяснить следующим образом.

На участке, где показатель ЛССЖ мал (от 0 до 15 мкМ/л), зависимость между показателями близка к линейной. Ретикулоциты на этом отрезке кривой высокой степени зрелости (30–33 пг), что коррелирует, по литературным данным, с уменьшением плотности рецепторов к трансферрину на единицу объема [6]. Содержание гемоглобина в ретикулоцитах стремится к физиологическому максимуму, дальнейшее увеличение концентрации гемоглобина означало бы кристаллизацию гемопротейна и гибель клетки. В то же время ЛССЖ, отражая резервную емкость транспортного белка трансферрина, достигает критически малых величин, что свидетельствует о полном насыщении крови и тканей организма железом. Таким образом, на данном участке экспоненты максимальное содержание гемоглобина в ретикулоцитах прямо пропорционально минимальной экспрессии мембранных трансферриновых рецепторов, что обуславливает низкую ЛССЖ.

Следующий участок (20–60 мкМ/л), где есть тенденция к увеличению ЛССЖ, соответствует анемии при АХЗ. Патогенез анемии при АХЗ носит мультифакторный характер, когда угнетение эритропоэза имеет множество причин: и снижение выработки эритропоэтина, и резистентность к нему эритроидных клеток-предшественников, и дисбаланс между доставкой железа к эритробластам, и стимуляцией синтеза ЭПО. Это приводит к некоторому уменьшению *Ret-He* при увеличении ЛССЖ.

Участок, на котором ЛССЖ изменяется от 60 до 100 мкМ/л, соответствует ЖДА, когда степень «голодания» сыворотки крови максимальна, а насыщение железом транспортного белка — трансферрина — минимально.

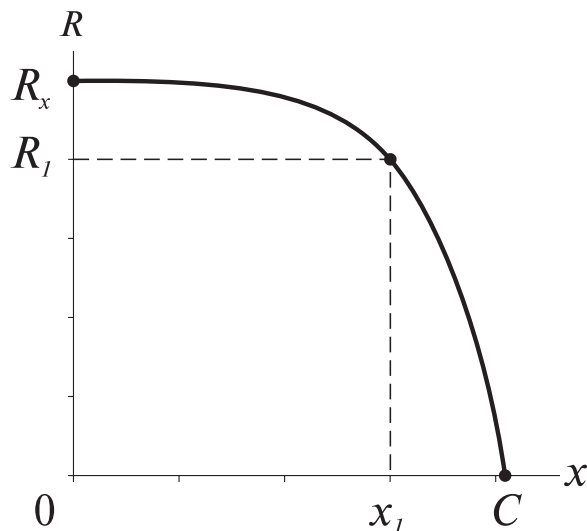


Рис. 5. Построение экспоненциальной зависимости по трем заданным точкам в частном случае, когда концы кривой находятся на осях координат

Содержания гемоглобина в ретикулоцитах резко уменьшается даже при небольшом росте ЛССЖ, так как транспортные белки связывают все доступное железо сыворотки крови.

Расчет такого вида экспоненты также можно провести по трем точкам. Но две точки берутся на осях $(0; R_x)$ и $(C; 0)$, а третья $(x_1; R_1)$ произвольно (рис. 6). Здесь R_x — показатель *Ret-He* при нулевом уровне связанного железа, b — концентрационный параметр, ответственный за кривизну зависимости, а C — теоретический предел ЛССЖ, при котором *Ret-He* был бы равен нулю.

По этим точкам вычисляются параметры R_0 и b . Используются следующие формулы:

$$R_0 = \frac{R_x + R_1 e^{-x_1}}{1 + e^{-x_1}},$$

$$b = \frac{\ln\left(1 - \frac{R_1}{R_0}\right)}{x_1 - C}.$$



В результате проделанной работы разработан набор математических экспоненциальных моделей для установления взаимосвязи отдельных ретикулоцитарных параметров, имеющих большое значение в диагностике и мониторинге анемий разного генеза, с биохимическими маркерами обмена железа.

Так как содержание гемоглобина в ретикулоцитах тесно связано с показателями обмена железа у больных с ЖДА и АХЗ, то

можно предложить использование данного ретикулоцитарного индекса для отслеживания изменений обмена железа при мониторинге анемий вышеуказанного генеза. Замена дорогостоящих биохимических реагентов на ретикулоцитарный анализ, входящий в состав гемограммы, экономически целесообразно и значительно удешевит пребывание больного в стационаре, что крайне актуально в настоящее время.

ЛИТЕРАТУРА:



1. Franck S., Linssen J., Messinger M., Thomas L. Potential utility of RET-Y in diagnosis of iron — restricted erythropoiesis//Clinical Chemistry. — 2004. — Vol. 50. — № 7. — P. 1240–1242.
2. Canals C., Remacha A.F., Sarda M.P., Piazuelo J.M., Royo M.T., Romero M.A. Clinical utility of the new Sysmex XE 2100 parameter-reticulocyte hemoglobin equivalent — in the diagnosis of anemia//Haematologica. — 2005. — Vol. 90 — № 8. — P. 1133–1134.
3. Kickler T.S., Borowitz M.J., Thompson R.E., Charintranont N., Law R. RET-Y a measure of reticulocyte size :a sensitive indicator of iron deficiency anemia//Clinical and Laboratory Haematology. — 2004. — Vol. 26. — № 6. — P. 423–427.
4. Козинец Г.И., Погорелов В.М., Шмаров Д.А., Боев С.Ф., Сазонов В.В. Клетки крови — современные технологии их анализа — М.: Триада-фарм. — 2002. — 200 с.
5. Thomas L., Thomas Ch. Biochemical markers and hematological indices in the diagnosis of functional iron deficiency//Clinical Chemistry. — 2002. — Vol. 48. — № 7. — P. 1066–1076.
6. Шмаров Д.А., Козинец Г.И. Лабораторно-клиническое значение проточно-цитометрического анализа крови. — М.: Медицинское информационное агентство. — 2004. — 128 с.
7. Brugnara C, Schiller B, Moran J. Reticulocyte hemoglobin equivalent (Ret-He) and assessment of iron-deficient states//Clinical and Laboratory Haematology. — 2006. — Vol. 28. — № 5. — P. 303–308.
8. Briggs C., Rogers R., Thompson B., Machin S.J. New red cell parameters on the Sysmex XE-2100 as potential markers of functional iron deficiency//Infusion Therapy and Transfusion. — 2001. — Vol. 28. — № 5. — P. 256–262.
9. Луговская С.А., Морозова В.Т., Почтарь М.Е., Долгов В.В. Лабораторная гематология. — Тверь: ООО «Издательство «Триада». — 2006. — 224 с.