

Барановская И.Б., Онищук С.А.\*  
КМЛДО МУЗ городская больница №2, г. Краснодар  
\*Кубанский государственный университет, г. Краснодар

## ГЕМОГЛОБИН РЕТИКУЛОЦИТОВ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ АНЕМИЙ

В статье рассматривается значение содержания гемоглобина ретикулоцитов в дифференциальной диагностике железодефицитных анемий, анемий хронических заболеваний и их сочетаний. Строится математическая модель, дающая наглядное представление о связи сывороточного железа и латентной связывающей способности сыворотки крови с содержанием гемоглобина ретикулоцитов.

Диагностическая значимость отдельных показателей метаболизма железа при большинстве воспалительных состояний резко снижается и не позволяет выявить действительную причину нарушения обмена железа. Выявление дефицита железа особенно затруднено на фоне острой воспалительной реакции. Анемию хронических заболеваний (АХЗ) и сочетание АХЗ и железодефицитной анемии (ЖДА) трудно различить только по уровню сывороточных маркеров. Общеизвестно, что изменение таких эритроцитарных индексов, как средний объем эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH) и ширина распределения эритроцитов по объему (RDW), сравнительно долгосрочно, так как длительность жизни эритроцитов в периферической крови около 120 дней.

При дефиците железа, обусловленном истощением запасов железа или его недоступностью при достаточном резерве железа, костный мозг образует гипохромные эритроциты. Предшественники эритроцитов – ретикулоциты тоже являются гипохромными. Превращаясь в эритроциты за 1–2,5 дня, ретикулоциты содержат то количество гемоглобина, которое синтезировалось в них за последние 60 часов. Таким образом, содержание гемоглобина в ретикулоцитах адекватно отражает состояние эритропоэза, практически в «режиме реального времени».

В зарубежной литературе много публикаций, посвященных значению ретикулоцитарных индексов в диагностике и мониторинге анемий разного генеза, доказывающих взаимосвязь отдельных ретикулоцитарных параметров с биохимическими маркерами обмена железа [1, 2, 3]. В нашей стране подобные исследования носят единичный характер [4].

**Цель работы:** оценка диагностической значимости гемоглобина ретикулоцитов при дифференциальной диагностике анемий и выявление взаимосвязи данного ретикулоцитарного параметра с показателями обмена железа с целью построения математической модели.

**Материалы и методы:** Исследование проводилось на базе Краснодарского многопрофильного лечебно-диагностического объединения МУЗ городской больницы №2. Проанализированы результаты лабораторных исследований 101 пациента с анемическим синдромом в возрасте 28–77 лет (46 мужчин – средний возраст  $58,1 \pm 18,1$  год и 55 женщин – средний возраст  $45,01 \pm 15,6$  лет). Контрольную группу составили 77 практически здоровых лиц, в основном работников медицинского объединения (34 мужчины и 42 женщины) возрастом  $44,0 \pm 16$  лет без признаков анемии и нормальными значениями метаболизма железа (референтные значения используемых методов).

Материалом исследования являлись образцы венозной крови, которую брали из локтевой вены пациентов в утренние часы натощак.

Гемограммы анализировались на анализаторе Sysmex-2100 XE (Sysmex Corporation, Japan). Исследовались классические показатели гемограммы: RBC (эритроциты), HGB (гемоглобин), HCT (гематокрит), MCV (средний объем эритроцита), MCH (среднее содержание гемоглобина в эритроцитах), RDW (широта распределения эритроцитов по объему). На основании принципа проточной цитофлуорометрии в ретикулоцитарном канале гематологического анализатора дифференцировались флуоресцирующие ретикулоциты от нефлюо-

ресцирующих (негативных) эритроцитов. Прибор строил гистограммы распределения ретикулоцитарных клеток по размерам и определял их средние значения в виде  $RET-Y$  (безразмерная величина). Мы использовали данные Tomas Ch. и Tomas L., согласно которым, используя регрессионную формулу ( $y = 5,569 \cdot \exp^{0,001 \cdot x}$ ), можно трансформировать значения  $Ret-Y$  в его гемоглобиновый эквивалент, выражаемый в пикограммах и обозначаемый как  $Ret-He$  [5]. Референтные значения параметра  $Ret-He$ , по данным отечественных авторов, составляют 28,2–36,4 пг [6].

Биохимические показатели обмена железа определялись с использованием биохимического анализатора Cobas Integra швейцарской фирмы Roche. Метаболизм железа оценивался по следующим параметрам: сывороточный ферритин (СФ), сывороточное железо (СЖ), латентная связывающая способность железа (ЛССЖ). По результатам исследования гемограмм, маркеров обмена железа и данных анамнеза больных разделили на 2 группы: пациенты с ЖДА и пациенты с АХЗ.

Для построения математической модели взаимосвязи гемоглобина ретикулоцитов с параметрами обмена железа мы использовали две функции, полученные экспериментальным путем с использованием метода наименьших квадратов.

Влияние концентрации ЛССЖ на содержание  $Ret-He$  выражается следующим уравнением:  $R = R_0(1 - e^{-b_0(C_0 - ЛССЖ)})$ , где  $R_0$  – показатель  $Ret-He$  при нулевом уровне ЛССЖ,  $b_0$  – концентрационный параметр, ответственный за кривизну зависимости, а  $C_0$  – предположительный предел ЛССЖ, при котором  $Ret-He$  равен нулю. Были установлены численные значения параметров функции:  $R_0 = 33$  пг,  $b_0 = 0,04$  л/мкмоль,  $C_0 = 95$  мкмоль/л.

Зависимость  $Ret-He$  от СЖ хорошо аппроксимируется функцией вида  $R = R_0(1 - e^{-b_0 \cdot СЖ})$ , где  $R_0$  – показатель  $Ret-He$  при СЖ, стремящемся к бесконечности,  $b_0$  – параметр, ответственный за кривизну экспоненты. Численные значения показателей:  $R_0 = 33$  пг,  $b_0 = 0,23$  л/мкмоль.

Статистическая обработка данных включала определение общепринятых средних арифметических величин (M), среднего квадратичного отклонения (SD), коэффициента корреляции (r) значения критерия Стьюдента (p) с помощью стандартных средств компьютерной программы Microsoft Excel. Различия между параметрами считали значимыми при  $p \leq 0,05$ .

#### Результаты и обсуждение:

В таблице (табл. 1) представлены сводные данные по 3 исследуемым группам: контрольная группа, пациенты с ЖДА и пациенты с АХЗ. Различия между анализируемыми параметрами оказались статистически значимыми для всех трех групп ( $p < 0,05$ ), за исключением RBC между ЖДА и АХЗ ( $p > 0,05$ ). Показатели гемограммы группы здоровых людей следующие: RBC  $4,7 \pm 0,47 \cdot 10^{12}$  /л, HGB  $139,0 \pm 13,4$  г/л, HCT  $39,3 \pm 3,7\%$ , MCV  $84,5 \pm 3,9$  фл, MCH  $29,7 \pm 1,3$  пг, RDW  $13,2 \pm 0,7\%$ . Параметры обмена железа в этой же группе составили: СЖ  $15,6 \pm 4,3$  мкмоль/л, СФ  $46,2 \pm 20,5$  нг/мл, ЛССЖ  $42,4 \pm 15,2$  мкмоль/л. Таким образом, мы показали, что исследуемые показатели гемограммы и метаболизма железа у группы здоровых людей находятся в референтных пределах.

Клинический анализ крови пациентов с ЖДА: RBC  $3,8 \pm 0,61 \cdot 10^{12}$  /л, HGB  $77,4 \pm 21$  г/л, HCT  $25,5 \pm 5,5\%$ , MCV  $65,0 \pm 9,3$  фл, MCH  $19,8 \pm 4,1$  пг, RDW  $17,4 \pm 3,2\%$ . Отмечено снижение уровня СЖ до  $3,7 \pm 2,9$  мкмоль/л и СФ до  $6,4 \pm 4,3$  нг/мл, повышение ЛССЖ до  $75,9 \pm 11,2$  мкмоль/л. У данной группы пациентов можно отметить выраженную гипохромную анемию, коррелирующую с уменьшением запасов железа.

У пациентов с АХЗ анемия носила нормохромный, реже гипохромный характер и характеризовалась следующими показателями гемограммы: RBC  $3,7 \pm 0,84 \cdot 10^{12}$  /л, HGB  $100,4 \pm 16,7$  г/л, HCT  $30,0 \pm 4,9\%$ , MCV  $83,3 \pm 9,9$  фл, MCH  $28,0 \pm 4,1$  пг, RDW  $16,5 \pm 3,9\%$ . Биохимические маркеры метаболизма железа имели следующие значения: СЖ  $10,6 \pm 3,2$  мкмоль/л, СФ  $286,2 \pm 213,1$  нг/мл, ЛССЖ  $33,2 \pm 14,0$  мкмоль/л. У данной совокупности пациентов анемия носит умеренный характер, по сравнению с больными ЖДА, и ха-

рактируется нормальным или пониженным уровнем сывороточного железа, латентной связывающей способностью железа в пределах нормы или сниженной, концентрацией сывороточного ферритина повышенной, реже нормальной.

Как известно, причины, приводящие к развитию дефицита железа, многочисленны. Клиницисту необходимо использовать все диагностические критерии, позволяющие установить истинную причину дефицита железа и выбрать обоснованную стратегию лечения. Важно при дифференциальной диагностике отличить железодефицитную анемию (первичную) от анемии хронического заболевания, так как неадекватное лечение может вызвать симптомы вторичного гематоза у больных с АХЗ. В то же время возможно сочетание анемии хронических заболеваний с железодефицитной анемией. В качестве независимых тестов СЖ, ЛССЖ, СФ имеют ограниченную ценность, определение гемоглобина – условно [8].

Определение содержания гемоглобина в ретикулоците (Ret-He) является информатив-

ным показателем, отражающим обмен железа и его доступность для системы эритронов в настоящий момент времени. В клинической практике индекс Ret-He практически не используется. Это связано как с недостаточной технической оснащённостью лабораторий, так и со слабой информированностью врачей клиницистов, и даже гематологов, о диагностической ценности данного ретикулоцитарного индекса.

Мы исследовали значение содержания гемоглобина в ретикулоцитах у пациентов с ЖДА, АХЗ и контрольной группы. Полученные данные представлены в таб. 2.

Различия по параметру оказались статистически значимыми ( $p < 0,05$ ) для групп ЖДА и АХЗ, а также ЖДА и контрольной группы. Между группой АХЗ и группой здоровых лиц достоверных различий по содержанию гемоглобина в ретикулоцитах не обнаружено ( $p > 0,5$ ). Однако в группе здорового контроля отмечено наибольшее значение показателя Ret-He ( $30,9 \pm 1,4$  пг), что свидетельствует о максимальном насыщении гемоглобином ретикулоцитов. По-

Таблица 1. Показатели гемограммы и метаболизма железа у пациентов с ЖДА, АХЗ и контрольной группы (M ± SD)

Показатели нормы	Контроль	ЖДА	АХЗ
RBC, $10^{12}/л$ (3,8–5,5)	$4,7 \pm 0,47$	$3,8 \pm 0,61^*$	$3,7 \pm 0,84^*$
HGB, г/л (120–160)	$139,0 \pm 13,4$	$77,4 \pm 21$	$100,4 \pm 16,7$
HCT, % (36–48)	$39,3 \pm 3,7$	$25,5 \pm 5,5$	$30,0 \pm 4,9$
MCV, фл (80–100)	$84,5 \pm 3,9$	$65,0 \pm 9,3$	$83,3 \pm 9,9$
MCH, пг (27–31)	$29,7 \pm 1,3$	$19,8 \pm 4,1$	$28,0 \pm 4,1$
RDW, % (11,5–14,5)	$13,2 \pm 0,7$	$17,4 \pm 3,2$	$16,5 \pm 3,9$
СЖ, мкмоль/л (7–26)	$15,6 \pm 4,3$	$3,7 \pm 2,9$	$12,6 \pm 3,2$
СФ, нг/мл (20–300)	$46,2 \pm 20,5$	$6,4 \pm 4,3$	$286,2 \pm 213,1$
ЛССЖ, мкмоль/л (20–63)	$42,4 \pm 15,2$	$75,9 \pm 11,2$	$33,2 \pm 14,0$

Примечание: нормальные показатели периферической крови по [7]; нормальные показатели обмена железа – референтные значения используемых методов. \* – различия статистически не значимы  $p > 0,05$ . Все остальные различия между параметрами статистически значимы  $p < 0,05$ .

Таблица 2. Значение Ret-He(пг) у контрольной группы здоровых людей и пациентов с ЖДА, АХЗ

	Контроль	ЖДА	АХЗ
M ± SD	$30,9 \pm 1,4^*$	$17,9 \pm 4,9$	$28,9 \pm 3,7^*$
mediana	30,8	16,7	29,2
min	28,4	10,9	17,8
max	34,9	27,4	36,4

Примечание: \*  $p < 0,05$

лученные нами референтные значения близки к данным ряда авторов: 28,2–35,7 пг [1], 30,2–36,7 [2], 28,2–35 пг [9], 28,6–36,3 [10] пг.

У пациентов с ЖДА параметр Ret-He составляет  $17,9 \pm 4,9$  пг, в группе АХЗ –  $28,2 \pm 3,72$  пг. Согласно зарубежным исследованиям содержание гемоглобина в ретикулоците  $< 28$  пг является «золотым стандартом» железодефицитного эритропоэза [6, 7, 9]. В нашем случае у всех пациентов с ЖДА параметр Ret-He меньше указанной точки отсчета, что подтверждает истинный (абсолютный) дефицит железа. В группе АХЗ у 7 человек (13,7%) содержание гемоглобина в ретикулоцитах меньше 28 пг, что позволяет предположить сочетание анемии хронического заболевания с железодефицитной анемией. У остальных 46 человек (86,3%) ретикулоцитарный параметр Ret-He превышает «точку отсчета» 28 пг, что свидетельствует о нормальной гемоглобинизации ретикулоцитов даже в условиях угнетения эритропоэза, а генез анемии обусловлен перераспределительным железодефицитом.

Таким образом, скрининг содержания гемоглобина в ретикулоцитах у пациентов с микроцитарными гипохромными анемиями позволяет выявить скрытый железодефицит. В ряде случаев это актуально и для нормохромных анемий, так как MCV – расчетный показатель и может иметь нормальное значение при наличии у пациента одновременно выраженного макро- и микроцитоза. Кроме того, ложное завышение MCV может происходить в случае присутствия холодных агглютининов, когда агглютинаты эритроцитов воспринимаются прибором как одна большая клетка, а также в случае диабетического кетоацидоза вследствие гиперосмолярности плазмы [6].

В опубликованных ранее работах указывалось на корреляцию содержания гемоглобина в ретикулоцитах с показателями обмена железа у больных с гипохромными и нормохромными анемиями, когда  $MCV < 100$  [7, 9, 11]. В частности, по данным [11], Ret-He коррелирует с концентрацией трансфериновых рецепторов в 85% случаев. Однако заме-

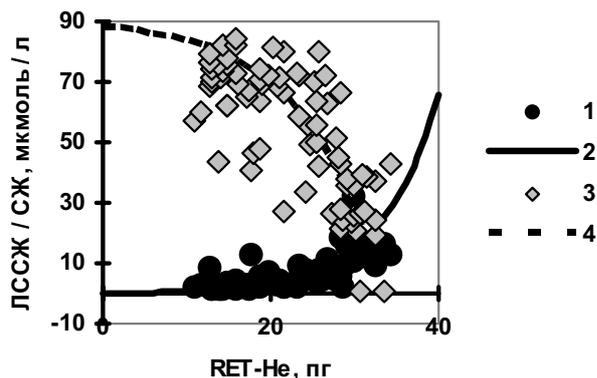
тим, что в разных работах анализируются самые различные биохимические маркеры обмена железа, полученные с применением различных анализаторов; исследователи не указывают полученных коэффициентов корреляции.

Корреляционный анализ, выполненный нами, не выявил достоверной взаимосвязи между гемоглобином ретикулоцитов и параметрами обмена железа у контрольной группы здоровых людей. У пациентов с ЖДА получены следующие коэффициенты корреляции:  $r = 0,58$  (СЖ и Ret-He),  $r = -0,55$  (ЛССЖ и Ret-He),  $r = 0,44$  (СФ и Ret-He). Близкими по значению оказались коэффициенты корреляции у пациентов с АХЗ:  $r = 0,46$  (СЖ и Ret-He),  $r = -0,59$  (ЛССЖ и Ret-He),  $r = 0,34$  (СФ и Ret-He). Для увеличения численности выборки мы сочли возможным объединить группы ЖДА и АХЗ (101 человек). При проведении корреляционного анализа и выявлены следующие линейные связи: слабая зависимость между Ret-He и СФ ( $r = 0,4$ ), достоверная положительная корреляция между Ret-He и СЖ ( $r = 0,68$ ) и отрицательная между Ret-He и ЛССЖ ( $r = -0,7$ ). Более высокие коэффициенты корреляции в смешанной группе мы объясняем объемом выборки.

Хотя взаимосвязь между концентрацией ферритина и содержанием гемоглобина в ретикулоците статистически достоверна ( $p < 0,01$ ), коэффициент корреляции недостаточно значителен ( $r = 0,4$ ), что явилось существенным затруднением для построения математической модели. Слабую корреляцию с сывороточным ферритином объясняем тем, что у больных с острыми и хроническими заболеваниями на метаболизм железа оказывают влияние множество факторов, а повышенная концентрация ферритина, как правило, является острофазовой реакцией в ответ на воспаление. Связь Ret-He с ЛССЖ и СЖ оказалась гораздо сильнее, что и было положено в основу математической модели.

На рис. 1 показаны точками значения Ret-He в зависимости от ЛССЖ и СЖ пациента, причем каждая точка – отдельный пациент.

Попытка связать показатели регрессионной прямой дала высокую погрешность. Интерполяция получается более точной с помо-



Примечание: 1 – эмпирические данные (зависимость RET–He от СЖ), 2 – экспоненциальная зависимость (RET–He от СЖ), 3 – эмпирические данные (зависимость Ret–He от ЛССЖ), 4 – экспоненциальная зависимость (RET–He от ЛССЖ).

Рисунок 1. Зависимость RET–He от сывороточного железа и латентной связывающей способности железа.

щью кривых, которые проще всего представить экспонентами.

По нашему мнению, экспоненциальная связь Ret–He и СЖ обусловлена тем, что анализируется массив пациентов с анемиями разного генеза. На участке 0–7 мкмоль/л зависимость линейная. Этот отрезок соответствует преимущественно больным с абсолютным железodefицитом, когда встраивание железа в гемоглобин ретикулоцита прямо пропорционально его доступности, то есть концентрации в сыворотке крови. При увеличении значений сывороточного железа пропорционально возрастает параметр Ret–He. У пациентов с АХЗ (участок 7–15 мкмоль/л) анемия носит перераспределительный характер, железо накапливается в макрофагах и недоступно для эритропоэза, общее количество сывороточного железа в организме близко к норме или немного уменьшено. Достигнув насыщения при концентрации СЖ более 15 мкмоль/л, содержание гемоглобина в ретикулоците если и увеличивается, то медленно, что обусловлено физиологически стабильностью гомеостаза в организме.

Экспоненциальную зависимость Ret–He от ЛССЖ объясняется аналогично. Степень изменения ЛССЖ почти всегда позволяет судить о состоянии баланса железа при физиологических и различных патологических состояниях. Повышение данного параметра является одним из первых прояв-

лений истощения запасов железа и гипоксии тканей.

Участок, на котором ЛССЖ изменяется от 60 до 100 мкмоль/л, соответствует ЖДА, когда степень «голодания» сыворотки крови максимальна, а насыщение железом транспортного белка – трансферрина минимально. Содержание гемоглобина в ретикулоцитах резко уменьшается даже при небольшом росте ЛССЖ, так как транспортные белки связывают все доступное железо сыворотки крови. Зависимость, близкую к линейной на указанном выше участке, мы объясняем действием прямых причинно-следственных связей: показатели обмена железа дают достаточно точное представление о количестве микроэлемента в организме.

Участок 20–60 мкмоль/л соответствует анемии при АХЗ, когда есть тенденция к снижению ЛССЖ. Патогенез анемии при АХЗ имеет мультифакторный характер, что отражается в экспоненциальной зависимости Ret–He и ЛССЖ, когда следствие (угнетение эритропоэза) имеет множество причин. Это и снижение выработки эритропоэтина, и резистентность к нему эритроидных клеток – предшественников, и дисбаланс между доставкой железа к эритробластам и стимуляцией синтеза ЭПО. На этом участке заметно уменьшается Ret–He при увеличении ЛССЖ.

Участок, на котором ЛССЖ изменяется от 0 до 15 мкмоль/л, почти горизонтален, так как содержание гемоглобина в ретикулоцитах достигает своих максимальных физиологических значений и ни при каких обстоятельствах не может быть меньше, что означало бы гибель клетки.

Таким образом, мы наглядно показали, что содержание гемоглобина в ретикулоцитах тесно связано с показателями обмена железа у больных с ЖДА и АХЗ. На основании этого факта 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 целесообразна и

значительно удешевит пребывание больного в стационаре, что крайне актуально в настоящее время.

**Выводы:**

1. Содержание гемоглобина в ретикулоцитах позволяет дифференцировать железодефицитные анемии от анемий хронических заболеваний и их сочетаний.

2. Выявлена взаимосвязь между содержанием гемоглобина в ретикулоцитах и маркерами обмена железа (сывороточным ферритином, сывороточным железом и латентной связывающей способностью железа).

3. В ряде случаев определение содержания гемоглобина в ретикулоцитах позволяет заменить биохимические анализы метаболизма железа.

**Список использованной литературы:**

1. Brugnara C., Zelmanovic D., Sorette M et.al. An integrated parameter for evaluation of erythropoietic activity // *Am J Clin Pathol.*-1997.-Vol.108.-P.133-142
2. Canals C., Remacha A. F., Sarda M.P. et.al. 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. Thomas L., Franck S., Messinger M. et all. Reticulocyte hemoglobin measurement –comparison of two methods in the diagnosis of iron–restricted erythropoiesis // *Clinical chemistry and laboratory medicine.* – 2005. – Vol.43. – № 11. – P.1193 –1202.
4. Назаренко Г.И., Коленкин С.М., Луговская С.А. и др. Значение показателей автоматизированного анализа ретикулоцитов для диагностики и оценки эффективности лечения  $V_{12}$ -дефицитной анемии. // *Клиническая лабораторная диагностика* . – 2004. –№ 5. – С.42-44.
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. Луговская С.А., Морозова В.Т., Почтарь М.Е., Долгов В.В. Лабораторная гематология. – М. –Тверь: ООО «Издательство «Грида». – 2006. –224 с.
7. А.Н. Огороков. Диагностика болезней внутренних органов: Т.4. Диагностика болезней системы крови: – М.: Мед. лит.- 2001.- 512 с.
8. Щербинина С.П., Романова Е.А., Левина А.А. и др. Диагностическое значение комплексного исследования показателей метаболизма железа в клинической практике // *Гематология и трансфузиология.* –2005. –Т.50. – № 5. –С.23 –28.
9. S.Franck, J. Linssen, M.Messinger, L.Thomas. Potential utility of RET-Y in diagnosis of iron – restricted erythropoiesis // *Clinical Chemistry.* – 2004. – Vol.50, №7. – P.1240-1242
10. C.Brugnara V., Schiller, J.Moran. Reticulocyte hemoglobin equivalent (Ret He) and assessment of iron-deficient states// *Clinical and Laboratory Haematology.*-2006.-Vol.28, № 5. – P.303 –308.
11. T.S.Kickler, M.J.Borowitz, R.E.Thompson, N.Charintranont, R. Law. 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.