

Диагностическая ценность определения основных показателей метаболизма железа при альфа-талассемии

¹Азербайджанский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии им. Б.А. Эйвазова, Баку

²Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург

Резюме. Представлены результаты изучения основных показателей метаболизма железа у 197 больных с гемоглобинопатией-Н, из которых 50 была произведена операция脾切除术. Исследована роль показателей метаболизма железа в патогенезе анемического синдрома при гемоглобинопатии-Н без и в сочетании с дефицитом фермента глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы. Полученные результаты при гемоглобинопатии-Н сопоставлялись с нарушениями в метаболизме железа при гомозиготной и промежуточной формах β-талассемии. По группам метаболизм железа отличался нестабильностью выявленных нарушений. Разброс данных сывороточного железа не отражал истинных запасов железа в организме. Для этого исследовалась концентрация железа в биоптате печени и в костном мозге в сопоставлении с данными синтеза копропорфирина в эритроцитах. Важным дополнительным дифференциально-диагностическим критерием гемоглобинопатии-Н, отличающим патологию от β-талассемии, является особенность распределения железа в клетках костного мозга и в межклеточном пространстве. В работе наряду с традиционными лабораторными методами исследования обмена железа применялись современные. Это определение концентрации растворимых трансферриновых рецепторов в сыворотке крови и цинкпротопорфирина в эритроцитах. Тесты обладают высокой чувствительностью и информативностью при гемоглобинопатии-Н. Сниженные значения общей железосвязывающей способности сыворотки крови наряду с измененными печеночными пробами при гемоглобинопатии-Н подтверждают развитие функциональной недостаточности печени. Выявленные нарушения в синтезе эритроцитарного копропорфирина при гемоглобинопатии-Н свидетельствуют о взаимосвязи между обменом железа и порфиринов и указывают на необходимость их подробного изучения при других наследственных аномалиях крови. Спленэктомия купирует синдром гиперспленизма, снижает перегрузку железом и число гемотрансфузий, улучшает гемобразование и качество жизни.

Ключевые слова: гемоглобинопатия-Н,脾切除术, цинкпротопорфирин, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, растворимые трансферриновые рецепторы, сывороточное железо, сывороточный ферритин, сидеробласт.

Введение. Талассемические синдромы и аномальные гемоглобины (Hb) в различных популяциях отличаются высокой частотой и для них характерны геогеография, клинико-гематологические и биохимические особенности [2, 4]. Носительство аномальных генов вызывает целый спектр клинических проявлений – от легкой степени анемии до гепатоспленомегалии, желтухи и развития тяжелого анемического синдрома. Ген α-глобиновой цепи расположен на хромосомах 16-й пары и состоит из 4 генов, каждый из которых способен контролировать образование до 25% α-цепочек глобиновой молекулы [13]. При утрате 3 генов в организме снижается синтез α-цепей и происходит избыточное накопление β- и γ-глобиновых цепочек, что приводит к образованию нестабильного аномального тетрамера гемоглобина-Н [5, 9]. Гемоглобинопатия-Н (HbH) выявляется при проведении электрофеза гемоглобина. Это частое заболевание среди носителей α-талассемического гена, диагностика которых требует осуществления молекулярно-генетических исследований [3, 6, 12]. Постоянным и тяжелым осложнением HbH является гипохромная микроцитарная анемия. Одни авторы причиной развития анемического синдрома считают дефицит α-цепей, другие – недостаточность железа, третьи – связывают с синдромом гиперспленизма [1, 10].

Метаболизм железопорфиринового комплекса не до конца исследованная проблема. Нет полной ясности в отношении роли ведущих показателей обмена порфиринов и железа в развитии болезни, не изучено состояние активности промежуточных ферментов, участвующих в синтезе гема гемоглобина (Hb), а, следовательно, в развитии анемии, и кроме того полученные данные противоречивы [2, 6, 12]. Подробное изучение клинико-гематологической гетерогенности аномальных Hb, включая HbH, на молекулярно-генетическом уровне и в сочетании с исследованием ведущих показателей железопорфиринового комплекса может способствовать раскрытию дополнительных механизмов развития анемии.

Цель исследования. Изучить роль основных показателей метаболизма железа в сопоставлении с синтезом копропорфирина и функциональным состоянием печени в развитии анемии при гемоглобинопатии-Н.

Материалы и методы. Обследовано 197 больных с HbH (гемоглобиноз Н) и 30 с β-талассемией, в возрасте 5–29 лет (медиана 16), из них мужчин – 94, женщин – 133. Больные разделены на 4 группы. Первую группу составили 60 больных HbH с дефицитом фермента глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Г-6-ФД), вторую –

87 больных с HbH без сопутствующей наследственной аномалии крови, в третью вошли 50 пациентов, которым была проведена спленэктомия, и четвертую составили 30 пациентов с гомозиготной и промежуточной формами β -талассемии. Все больные с раннего возраста получали гемотрансфузионную терапию. У 28 (46,7%) больных 1-й группы и 36 (41,4%) больных 2-й группы диагностирован сопутствующий хронический вирусный гепатит С с переходом в 10 (18,5%) случаев в портальный цирроз печени. Основные показатели железодефицитного комплекса в 1-й и 2-й группах исследовались до и после лечения, на высоте гемолитического криза и в периоде ремиссии, а в 3-й до и после спленэктомии и в отдаленные сроки после операции (спустя 1–6 лет). Показаниями для спленэктомии были: неэффективность консервативной терапии, увеличенные размеры селезенки с опасностью сдавления рядом расположенных органов, синдром гиперспленизма, гемолиз эритроцитов, повышенная потребность в гемотрансфузионной терапии (более 40 процедур в год). В течение последующих 6 лет послеоперационного периода оценивалось состояние метаболизма железа, потребность больных в гемотрансфузионной терапии и функциональное состояние печени.

Диагноз HbH подтверждался семейно-генетическими исследованиями, электроферезом Hb (на ацетатцеллюлезной пленке), повышенной осмотической резистентностью эритроцитов (ОРЭ). В эритроцитах при нормальном уровне взрослого гемоглобина (HbA2) (2,6–3,2%) и фетального гемоглобина (HbF) (1,8–2,3%) присутствовал аномальный HbH (16–38%).

Дефицит фермента Г-6-ФД в цельной крови подтверждался качественным способом. О β -талассемии свидетельствовал высокий уровень HbF и HbA2. 77 (39%) пациентов с HbH отставали в физическом развитии и имели монголоидные черты лица. Кожа и видимые слизистые оболочки были бледными с субиктеричным оттенком. Селезенка была увеличенной у всех обследуемых, а печень у 121 (61,4%) больного. У 14 (7%) больных с HbH выявлено недоразвитие вторичных половых признаков. На рентгенограммах костной ткани у 182 (92,4%) пациентов имелось умеренное расширение диплоидного пространства, слабо выраженный гиперстоз костей свода черепа и нежная трабекулярная перестройка костной ткани длинных трубчатых и мелких костей скелета. Больным при обращении и в динамике проводился комплекс лабораторных исследований, который состоял из: 1) общего анализа крови с тромбоцитами, ретикулоцитами, гематокритом (Ht) и определением основных эритроцитарных параметров (RBC – количество эритроцитов; MCV – средний объем эритроцита, MCH – среднее содержание Hb в эритроците, MCHC – средняя концентрация Hb в эритроцитах); 2) общего билирубина и его фракций в сыворотке крови, аланинаминотрансферазы (АЛТ), гаммаглутаминтранспептидазы (ГГТ), щелочной фосфатазы (ЩФ).

Учитывались результаты определения основных показателей обмена железа. Концентрация железа в сыворотке крови (СЖ), общая железосвязывающая

способность сыворотки крови (ОЖСС) и десфераловый тест (ДФ) исследовались по методу R. J. Henry et al. [8]. Сывороточный ферритин (СФ) определялся плащечным иммуноферментным методом.

Проводилась аспирация костного мозга с окраской по Н. Gruneberg [11], с исследованием его состава и подсчетом числа сидеробластов (СБ) и сидероцитов (СЦ). СЦ определялись и в периферической крови. О запасах железа в организме свидетельствовала пункционная биопсия печени с исследованием элемента в полученном биоптате. В сыворотке крови иммуноферментным методом с применением моноклональных антител исследовали растворимые трансферриновые рецепторы (рТФР) [1, 10]. Флуориметрическим методом определяли цинкпротопорфирин (ЦПП). Состояние гемобластогенеза при HbH, кроме основных показателей обмена железа, характеризовало содержание свободного копропорфирина в эритроцитах, который определялся по методу E. J. Dressel, J. E. Falk [7].

Для оценки полученных результатов в работе применен параметрический критерий Стьюдента. При статистической обработке данных использовали статистическую программу «Statistika 6». Статистически достоверными считались результаты различия $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Общим симптомом для всех больных была гипохромная микроцитарная анемия с мишеневидными эритроцитами и пойкилоцитозом. У 43 (71,6%) больных 1-й группы анемия до лечения определялась в тяжелой степени (Hb – $58 \pm 2,6$ г/л, RBC – $1,98 \pm 0,06 \times 10^{12}$ /л). Во 2-й и 3-й группах больных анемия была средней степени тяжести (Hb: $72 \pm 3,2$ и $86 \pm 3,6$ г/л; RBC: $2,87 \pm 0,16$ и $3,28 \pm 0,26 \times 10^{12}$ /л соответственно). Синдром гиперспленизма обнаружен у 156 (79,2%) больных с HbH. После спленэктомии синдром гиперспленизма купировался у 46 (92%) больных 3-й группы. Выявленный ретикулоцитоз и высокий уровень общего билирубина в сыворотке крови до лечения определялись у больных с HbH и дефицитом фермента Г-6-ФД ($3,6 \pm 0,2\%$ и $39 \pm 1,8$ мкмоль/л соответственно). В костном мозге у пациентов с HbH наблюдалась эритроидная гиперплазия с увеличенным апоптозом эритроидных клеток-предшественниц. Эффективный эритропоэз был снижен. Наблюдалось уменьшение утилизации нормобластов и укорочение периода жизни эритроцитов. Эритроцитарные параметры отличались от контрольных данных и изменений обычно наблюдаемых при гомозиготной и промежуточной формах β -талассемии (Hb: $48 \pm 2,3$ и $52 \pm 1,5$ г/л, RBC: $2,45 \pm 1,5$ и $2,3 \pm 0,13 \times 10^{12}$ /л, MCH: $18,7 \pm 0,5$ и $16,9 \pm 0,3$ пг, MCHC: $30,7 \pm 1,6$ и $31,4 \pm 1,1$ г/л соответственно). До лечения показатели MCH и MCHC определялись сниженными во всех группах (MCH: $18,7 \pm 0,9$, $19,9 \pm 1,2$, $20,4 \pm 1,4$ пг; MCHC: $27,8 \pm 1,6$, $29,8 \pm 1,7$, $30,3 \pm 1,8$ г/л соответственно).

Таким образом, по сравнению с нормой при HbH, как и при β -талассемии, существенно нарушены значения эритроцитарных параметров ($p < 0,05$), на выраженность которых не исключается влияние изменений в метаболизме железа и в работе печени. Основываясь

только на данных гипохромии эритроцитов и показателях СЖ, которые часто бывают противоречивыми и не соответствуют истинным запасам элемента в организме, ошибочное назначение препаратов железа может вызвать рефрактерность к нему. Исходя из этого, было расширено количество исследуемых параметров, характеризующих обмен железа при HbH. Полученные результаты сопоставлялись с концентрацией свободного эритроцитарного копропорфирина, участвующего как и железо в процессе гемобразования и, следовательно, в развитии анемического синдрома.

Нарушение функционального состояния печени отмечено у всех обследуемых пациентов, причем особенно явное в 1-й группе, где дополнительным фактором, усугубляющим ее работу, являлся гемолиз эритроцитов, связанный с основной патологией и с недостаточной активностью фермента Г-6-ФД. Нарушенная работа печени подтверждалась повышением уровня общего билирубина в сыворотке крови во всех группах ($39 \pm 1,8$, $31 \pm 1,5$, $25 \pm 1,2$ мкмоль/л соответственно; норма – $13,6 \pm 0,9$ мкмоль/л), ГГТ ($86 \pm 2,5$, $67 \pm 2,2$, $54 \pm 1,3$ ЕД/мг соответственно; норма – $25 - 30$ ЕД/мг), ЩФ ($35 \pm 1,7$, $27 \pm 1,3$, $23 \pm 1,1$ ед соответственно). Активность АЛТ была низкой ($14 \pm 0,3$ МЕ/л) у пациентов HbH осложненной вирусным гепатитом С с переходом в портальный цирроз печени и повышенной у остальных больных (1-я группа: $87 \pm 2,2$; 2-я – $82 \pm 2,1$; 3-я – $44 \pm 1,1$ МЕ/л). Кроме печеночных проб, о нарушенной функциональной способности печени свидетельствовали низкие значения ОЖСС.

Больных беспокоили боли в области печени, дискомфорт со стороны желудочно-кишечного тракта, выявлялась желтушность кожных покровов и видимых слизистых оболочек. При пункционной биопсии печени у больных с HbH обнаружена значительная перегрузка железом, причем преимущественно у пациентов 1-й группы (6 – 10 мг сухого вещества печени). Во 2-й и 3-й группах показатели были ниже. Гемосидероз печени при HbH совпадал с высоким уровнем неусвоенных гранул железа во внеклеточном пространстве костного мозга. При этом в аспирате определялось нормальное или пониженное количество СБ и СЦ, что являлось дополнительным диагностическим признаком, отличающим HbH от гомозиготной и промежуточной β -талассемии, при которых в костном мозге неусвоенные гранулы железа выявлялись скоплениями как в нормобластах («кольцевые» СБ), так и в межклеточном пространстве. У больных с гомозиготной и промежуточной β -талассемией выявлялось высокое количество СБ ($65 \pm 4,6$ и $49 \pm 2,8\%$) и СЦ ($12 \pm 1,3$ и $10,6 \pm 1,2\%$ соответственно), что свидетельствовало о значительных запасах железа в костном мозге, достоверно превышающим содержание элемента при HbH. Однако, по сравнению с HbH у больных в периферической крови средний уровень СЦ определялся гораздо ниже ($p < 0,05$), что является важным диагностическим признаком отличающим β -талассемию от HbH. При HbH в 1-й группе количество СБ и СЦ, равное $30 \pm 1,4$ и $3,2 \pm 0,6\%$, несущественно превысило норму (СБ $24 \pm 1,2$ и СЦ $2,6 \pm 0,5\%$; $p > 0,5$). Во 2-й и 3-й группах больных число железосодержащих клеток в костном

мозге было ниже (СБ: $20 \pm 1,1$ и $23 \pm 1,1\%$; СЦ: $2,1 \pm 0,2$ и $2,5 \pm 0,4\%$ соответственно). Следовательно, если по клиническим проявлениям HbH напоминает промежуточную β -талассемию, то по состоянию метаболизма железа в костном мозге отличается от нее. У больных 1-й группы в периферической крови количество СЦ в несколько раз превышало их содержание в костном мозге ($12,8 \pm 1,1\%$). При осложнении HbH портальным циррозом печени в периферической крови эритроциты и СЦ меняли форму и выглядели в форме «шипов».

После лечения при HbH с дефицитом Г-6-ФД концентрация СЖ оставалась повышенной, что объясняется неэффективным эритропозом и высвобождением железа из эритроцитов в результате гемолитического криза. Наряду с этим у 48 (71,6%) больных обнаружен нормальный, а у 12 (17,9%) – умеренно повышенный уровень ЦПП. В то же время у больных других групп ЦПП оказался более чем в 2 раза выше нормальных значений, что позволяет выделить его в качестве дополнительного диагностического теста при HbH с дефицитом Г-6-ФД. Для пациентов 1-й группы была характерна нормальная концентрация рТФР. У пациентов 3-й группы после удаления селезенки уровень СЖ и СФ уменьшился. В последующие 6 месяцев послеоперационного периода у наблюдавшихся 48 (96%) больных выявлено увеличение уровня СЖ ($23 \pm 1,5$ мкмоль/л) и степени перегрузки организма железом (СФ: $112 \pm 4,6$ мкмоль/л, ДФ: $2,8 \pm 0,15$ мг/сут.). В течение 2 лет послеоперационного периода больные HbH трансфузии эритроцитарной массы не получали. У 37 (74%) больных вначале 3 года после операции появились показания к переливанию эритроцитарной массы. Однако потребность в них, по сравнению с дооперационным периодом, сократилась с 40 до 15 в год.

У пациентов 2-й и 3-й групп до лечения количество рТФР в сыворотке крови превышало норму ($p < 0,01$). После проведенной терапии уровень рТФР в обеих группах понизился. Полученные результаты повышают диагностическую ценность определения ЦПП в эритроцитах и рТФР в сыворотке крови, которые наряду с СЖ и СФ характеризуют обмен железа.

У больных с HbH показатели ОЖСС как до, так и после лечения были ниже нормальных значений. Одновременно регистрировались положительными печеночные пробы, особенно у больных инфицированных гепатитом С. На наш взгляд, при HbH из-за функциональной недостаточности печени (высокая активность АЛТ, ГГТ, ЩФ, гипопропротеинемия) нарушен синтез белка трансферина, что подтверждалось изменением концентрации рТФР. Нарушения в метаболизме железа у больных всех групп до и после лечения сопровождались достоверным повышенным содержанием свободного копропорфирина в эритроцитах ($0,89 \pm 0,06$ и $0,97 \pm 0,09$ мкмоль/л; $1,52 \pm 0,1$ и $1,39 \pm 0,1$ мкмоль/л; $1,73 \pm 0,1$ и $1,62 \pm 0,1$ мкмоль/л, соответственно, до и после лечения по группам), что подтверждало наличие взаимосвязи обмена железа с синтезом порфиринов, составляющих основу гема Hb.

У больных при сочетании заболевания с дефицитом фермента Г-6-ФД исходная экскреция железа с мочой

в 3 раза превышала норму, что можно использовать в дифференциальной диагностике НбН с другими наследственными заболеваниями крови. Результаты определения СФ и ДФ свидетельствовали о перегрузке железом организма больных НбН, которая наиболее высокой определялась в 1-й группе ($p < 0,001$).

Таким образом, выявленная перегрузка железом при НбН ниже той, которая наблюдается при гомозиготной и промежуточной формам β -талассемии и поэтому применение хелаторов требует индивидуального подхода.

Выводы

1. При НбН показатели СЖ и исходная экскреция железа с мочой не отражают истинных запасов железа в организме больных, которые по степени тяжести уступают β -талассемии и требуют более подробного исследования метаболизма железа.

2. Определение ОЖСС наряду с печеночными пробами подтверждает развитие функциональной недостаточности печени при НбН.

3. Учитывая особенности содержания ЦПП в эритроцитах и рТФР в сыворотке крови при НбН, эти параметры необходимо включить в перечень обследования больных с целью выявления указанной патологии.

4. Важным дополнительным дифференциально-диагностическим критерием НбН, отличающим заболевание от β -талассемии, является исследование количества СБ и СЦ в аспирате костного мозга.

5. У пациентов с НбН спленэктомия остается основным методом лечения, который купирует синдром гиперспленизма, снижает степень перегрузки железом и число гемотрансфузий, улучшает гемобразование, работу печени и качество жизни больных.

Литература

1. Бокова, Е.В. Растворимый трансферриновый рецептор в диагностике, дифференциальной диагностике и прогнозе некоторых заболеваний у детей / Е.В. Бокова, Е.С. Ковригина, Ю.В. Румянцев // Рос. педиатр. журн. – 2006. – № 6. – С. 47–52.
2. Газиев, Д.Г. β -талассемия в Азербайджане / Д.Г. Газиев // Гематология и трансфузиология. – 1985. – № 10. – С. 8–13.
3. Сметанина, Н.С. Талассемические синдромы у детей: молекулярно-генетическая диагностика и современные принципы терапии / Н.С. Сметанина // Анемия. – 2006. – № 2. – С. 33–45.
4. Baysal, E. β -Thalassaemia in the population of Cyprus / E. Baysal [et al.] // British journal of haematology. – 1995. – Vol. 89. – P. 496–499.
5. Bernini, L.F. Alfa thalassaemia / L.F. Bernini, C.L. Harteveld // Baillieres clin haematol. – 1998. – Vol. 11. – P. 53–90.
6. Chui, DNK. Hydrops fetalis caused by β -thalassaemia: an emerging health care problem / DNK. Chui, J.S. Waye // Blood. – 1998. – Vol. 91. – P. 2213–2222.
7. Dressel, E.J., Falk, J.E. Studies on the biosynthesis of blood pigments 2. Hem and porphyrin formation in intact chicken erythrocytes / E.J. Dressel, J.E. Falk // Biochem. j. – 1956. – Vol. 63. – P. 72–79.
8. Henry, R.J. On the determination of serum iron and iron binding capacity / R.J. Henry, Ch. Sobel, H. Chiamori // Clin. chim. acta. – 1958. – Vol. 36. – P. 523–530.
9. Higgs, D.R. Gene regulation in hematopoiesis: new lessons from thalassaemia Hematology / D.R. Higgs // Am. soc. hematol. educ. program. – 2004. – Vol. 64. – P. 1–13.
10. Frazier, J.L. Studies of the transferrin receptor on both human reticulocytes and nucleated human cells in culture: comparison of factors regulating receptor density / J.L. Frazier [et al.] // J. clin. invest. – 1982. – Vol. 69. – P. 853–865.
11. Gruneberg, H. Siderocytes: a new kind of erythrocytes / H. Gruneberg // Nature. – 1941. – Vol. 148. – P. 469.
12. Lorey, F. HbH hydrops foetalis syndrome: a case report and review of literature / F. Lorey [et al.] // British journal of haematology. – 2001. – Vol. 115. – P. 72–78.
13. Molchanova, T.P. The importance of the 3' untranslated region for the expression of the α -globin genes / T.P. Molchanova, T.H.J. Huisman // Hemoglobin. – 1995. – Vol. 20. – P. 41–42.

D.A. Baytaeva, S.S. Bessmeltsev

Diagnostic value of determination of main indices of iron metabolism at alpha thalassemia

Abstract. The work presents results of study of main indices of iron metabolism in 197 patients with hemoglobin-H disease, 50 of whom had a splenectomy surgery. The role of the parameters of iron metabolism in the pathogenesis of anemia syndrome in patients with the hemoglobin-H disease both associated and nonassociated with glucose-6-phosphat dehydrogenase enzyme deficiency was studied. The findings obtained for the hemoglobin-H disease were compared to the disorders of iron metabolism in patients with the homozygous and intermediate forms of beta-thalassemia. The iron metabolism disorders detected were unstable in different groups. Large spread of data on serum iron was detected, that did not show real iron amount in the organism. To this end, the iron concentration in the liver and bone marrow biopsy samples was measured and compared to the parameters of the coproporphyrin synthesis in the erythrocytes. The important additional diagnostic criterion that enables to differentiate the hemoglobin-H disease from beta-thalassemia is the specifics of iron distribution in the bone marrow cells and intercellular space. The modern minimally invasive methods were used along with the routine laboratory techniques for iron metabolism examination. This is an assessment of the concentration of soluble transferrin receptors in the blood serum and zinc protoporphyrin level in the erythrocytes. The assays are highly sensitive and informative for the pathogenesis of anemia syndrome in patients with the hemoglobin-H disease. The decreased values of the total iron-binding capacity of the blood serum along with the abnormal liver function tests in patients with hemoglobin-H disease provide evidence of the functional liver failure development. The disorders of the erythrocytic coproporphyrin synthesis in patients with the hemoglobin-H disease prove the interaction between iron metabolism and porphyrin metabolism in the development of anemia and indicate the necessity of their detailed study in patients with other congenital blood diseases. Splenectomy in patients cuts off hypersplenism syndrome, reduces iron overload and number of blood transfusions, and improves blood formation and life quality.

Key words: hemoglobin-H disease, splenectomy, zincprotoporphyrin, glucose-6-phosphate dehydrogenase, soluble transferrin receptors, serum iron, serum ferritin, sideroblast.

Контактный телефон: +7 9289156315; e-mail: retopop@yandex.ru