

Міністерство освіти і науки України
Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології

**БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ ТРАНСПОРТУ ТА ДЕПОНУВАННЯ ЗАЛІЗА
В ОРГАНІЗМІ ЗА УМОВ РІЗНИХ ВИДІВ АНЕМІЙ**

Дипломна робота
Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала:
студентка VI курсу, групи 600M
спеціальності 091 – Біологія
(біохімія та лабораторна діагностика)
(шифр і назва спеціальності)

Алвехеші Ібтіхал Алі М

Керівник: к.б.н., доцент Кеца О. В.

Рецензент: лікар «Медичного центру
ШАРАБІ» м.Чернівці
Коржева Н.Д.

До захисту допущено:
Протокол засідання кафедри № ____
від „__” _____ 2022 р.

зав. кафедри _____ проф. Копильчук Г. П.

АНОТАЦІЯ

Магістерська робота присвячена вивченню біохімічних маркерів транспорту та депонування заліза в організмі при залізодефіцитній анемії (ЗДА) та вітамінодефіцитних анеміях – вітамін В₁₂ дефіцитній анемії (В₁₂ДА) і фолієводефіцитній анемії (ФДА).

Встановлено, що значення кількості еритроцитів та концентрації гемоглобіну до рівня 70-90 г/л вказує на розвиток анемії середнього ступеня тяжкості та не залежить від виду анемії. При цьому спостерігається різниця в еритроцитарних індексах. Так, розвиток в організмі ЗДА супроводжується зниженням об'єму еритроцитів та вмісту гемоглобіну в еритроциті при цьому підвищується загальна залізовв'язуюча здатність крові (ЗЗЗК). Для анемії, які зумовлені нестачею в організмі як вітаміну В₁₂, так і фолієвої кислоти характерні макроцитоз еритроцитів, гіперхромія і зниження ЗЗЗК.

Показано, що зниження вмісту заліза і феритину в сироватці крові відбувається на тлі підвищення вмісту трансферину, проте його насичення залізом знижується при ЗДА. При В₁₂ДА і ФДА виявлено підвищення рівня заліза, феритину та насичення трансферину залізом з одночасним зниженням концентрації трансферину в сироватці крові

Ключові слова: гемоглобін, еритроцити, залізо крові, трансферин, феритин, загальна залізовв'язуюча здатність крові, сироватка крові, анемія.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ І ПОЗНАЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Класифікація анемії	7
1.2. Особливості перебігу різних видів анемії	9
1.2.1. Причини виникнення та характеристика залізодефіцитної анемії	9
1.2.2. Особливості розвитку вітамін В₁₂-дефіцитної анемії	11
1.2.3. Біохімічні механізми розвитку фолієводефіцитної анемії	12
1.3. Біохімічні механізми метаболізму заліза в організмі	14
1.4. Трансферин і феритин як маркери стану обміну заліза в організмі	17
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	20
2.1. Об'єкт і методи досліджень	20
2.2. Статистична обробка результатів	29
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	30
ВИСНОВКИ	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	42
ДОДАТКИ	47

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ І ПОЗНАЧЕНЬ

B_{12} ДА – вітамін B_{12} дефіцитна анемія

ЗДА – залізодефіцитна анемія

ЗЗЗК – загальна залізовв'язуюча здатність крові

КП – колірний показник

РЕС – ретикулоендотеліальна система

ФДА – фолієводефіцитна анемія

ВСТУП

З усіх гематологічних синдромів найпоширенішим є розвиток анемії. Анемія – стан, при якому знижується концентрація гемоглобіну та/або червоних кров'яних клітин у крові [1]. Це спричиняє ряд проблем у роботі організму, з'являються фізичні ознаки захворювання, які можуть виражатися у загальній слабкості або стати причиною шкірних дефектів. Ця патологія може розглядатися як самостійна нозологічна одиниця, так і вторинний симптомокомплекс, що супроводжує різні патологічні стани [2]. Тому, оцінка статусу заліза за умов розвитку різних видів анемії та вміння правильно інтерпретувати результати дослідження дуже важлива для ранньої діагностики різних видів анемії [3, 4], оскільки передбачає своєчасне проведення заходів, спрямованих на корекцію статусу заліза та може допомогти запобігти несприятливих наслідків анемії.

Існує три причини, що впливають на зменшення рівня гемоглобіну: нестача заліза [4]; нестача вітаміну B_{12} [5]; нестача фолієвої кислоти – вітаміну B_9 [6].

При нестачі заліза в організмі виникає залізодефіцитна анемія (ЗДА), яку визначають як хворобу, що характеризується зменшенням кількості гемоглобіну в крові [7]. Нестача вітамінів B_{12} і B_9 також є причиною незворотних видів анемії, які незалежно від прояву клінічних симптомів супроводжуються неврологічними розладами [7].

Дослідження вмісту залізов'язуючих протеїнів відображає стан різних компартментів організму. Так за рівнем сироваткового феритину можна судити про запаси заліза в організмі; за рівнем сироваткового заліза та коефіцієнтом насичення трансферину залізом – про процеси надходження заліза в тканини організму [8]. Інтенсивність використання заліза кістковим мозком для еритропоезу можна оцінити за відсотковим вмістом гіпохромних еритроцитів, середнім корпускулярним об'ємом еритроцитів та вмістом гемоглобіну в ретикулоцитах. Вказані показники по-різному можуть

змінюватися при різних видах анемії, зокрема залізодефіцитній анемії (ЗДА), В₁₂-дефіцитній анемії (В₁₂ДА), фолієводефіцитній анемії (ФДА) [5, 6, 7].

Враховуючи вище наведене, метою роботи було оцінити особливості змін маркерів транспортування і депонування заліза в крові за умов розвитку різних видів анемії.

У зв'язку з цим поставлені наступні завдання:

1. Дослідити вміст еритроцитів, гемоглобіну, а також середній об'єм еритроцитів і концентрацію гемоглобіну в еритроциті за умов ЗДА, В₁₂ДА та ФДА.

2. Оцінити загальну залізовв'язуючу здатність крові (ЗЗЗК) за умов розвитку в організмі різних видів анемії.

3. Визначити концентрацію феритину, трансферину та насичення трансферину залізом, як основних маркерів обміну заліза при різних видах анемії.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Класифікація анемії

Анемія (грец. *αναμία*, недокрів'я) – група клініко-гематологічних синдромів, що характеризуються зменшенням вмісту гемоглобіну в одиниці об'єму крові, частіше за одночасного зменшення кількості еритроцитів, що призводить до розвитку кисневого голодування тканин (гіпоксії) [9].

Оскільки в організмі відбувається постійне інтенсивне утворення еритроцитів та одночасний їхній розпад, то під анемією також розуміють стан, що характеризується порушенням балансу еритроцитів, тобто зниженням інтенсивності утворення або підвищеною деструкцією еритроцитів, або поєднанням обох факторів [1].

У фізіологічних умовах кількість еритроцитів, що руйнуються, дорівнює кількості тим, що знову утворюються, завдяки чому постійно зберігається їх нормальна кількість [10]. Руйнування еритроцитів може статися під впливом різних випадкових факторів, пов'язаних з їх рухом та фізико-хімічними властивостями навколишнього середовища, а також у результаті старіння [11]. У фізіологічних умовах старіючі еритроцити видаляються з циркуляційної крові і руйнуються переважно в селезінці, печінці та меншою мірою – у кістковому мозку (у нормі кістковий мозок більш активний щодо еритрокаріоцитів, 10-15% яких не використовуються в еритропоезі). Відомо, що фракція IgG сироватки містить аутоантитіла проти старих еритроцитів. Прикріплення цих антитіл до еритроцитів призводить до фагоцитозу останніх [11, 12].

Причин розвитку анемії безліч, вони мають різний патогенез та клініко-гематологічні особливості. Спроби створення класифікацій, у тому числі побудованих на етіологічному та патогенетичному принципах, робилися неодноразово, що призвело до існування великої кількості громіздких класифікацій. Розглянемо деякі з них.

За механізмами, що призводять до анемізації, всі анемії можуть бути поділені на 3 основні групи [13]:

1) анемії, що виникли внаслідок порушеного гемопоезу: дефіцитні, гіпо(а)пластичні;

2) анемії, що виникли внаслідок підвищеного руйнування еритроцитів (гемолітичні);

3) анемії, пов'язані з крововтратою (постгеморагічні).

За морфологією анемії поділяють на:

а) макроцитарна анемія (середній об'єм еритроцита (MCV) > 100 фл, діаметр еритроцитів понад 8 мкм) – В₁₂-дефіцитна, фолієводефіцитна анемія, еритромієлоз, мієлодиспластичний синдром;

б) мікроцитарна анемія – залізодефіцитна анемія; нормоцитарна анемія (MCV 81–99 фл, діаметр еритроцитів 7,2 – 7,5 мкм) – гіпопластична, гемолітичні анемії, анемії хронічних захворювань, анемія при мієлодисплазії [1, 5, 6, 7].

Класифікація за колірним показником (КП): гіпохромна анемія (КП менше 0,8) – залізодефіцитна анемія, залізоперерозподільна анемія, таласемія та ін.; гіперхромна (КП вище 1,05): В₁₂-дефіцитна анемія, фолієводефіцитна анемія та ін. [14].

Патогенетична класифікація анемії:

1. Анемії внаслідок крововтрати (постгеморагічні): гостра постгеморагічна анемія; хронічна постгеморагічна анемія.

2. Анемії внаслідок порушення утворення еритроцитів і гемоглобіну: залізодефіцитна анемія; залізоперерозподільча анемія (порушення утилізації заліза); залізонасичена (сидероахрестична) анемія зв'язана з порушенням синтезу гема; мегалобластні анемії, пов'язані з порушенням синтезу ДНК (В₁₂- та фолієводефіцитні анемії, мегалобластні анемії, обумовлені спадковим дефіцитом ферментів, що беруть участь у синтезі пуринових та піримідинових основ; В₁₂-ахрестична анемія) [15].

За ступенем тяжкості анемії поділяють на такі групи, які представлені в таблиці 1.1 [11].

Таблиця 1.1

Класифікація анемії за ступенем тяжкості

Ступень анемії	Рівень гемоглобіну, г/л
0	> 120
1	120 – 100
2	100 – 80
3	80 – 65
4	менее 65

Про стан регенераторної функції кісткового мозку, тобто про характер продукування еритроцитів, судять за вмістом ретикулоцитів у периферичній крові. Рівень ретикулоцитів пропорційний активності еритропоезу: постійно низька кількість ретикулоцитів при анемії свідчить про знижений (дефектний) еритропоез; підвищена кількість ретикулоцитів свідчить про його активацію. Нормальний вміст ретикулоцитів у крові становить 5-12% від числа всіх еритроцитів [16].

Таким чином, проведення лабораторних досліджень, що включають, окрім загального аналізу крові, дослідження еритроцитарних індексів, морфології еритроцитів, а також правильне трактування отриманих результатів дають можливість правильно провести діагностичний пошук і, відповідно, визначити на ранніх етапах вид анемії.

1.2. Особливості перебігу різних видів анемії**1.2.1. Причини виникнення та характеристика залізодефіцитної анемії**

Залізодефіцитна анемія (ЗДА) – клініко-гематологічний синдром, що характеризується порушенням синтезу гемоглобіну внаслідок дефіциту заліза і проявляється симптомами анемії та сидеропенії [17]. ЗДА – широко поширений патологічний стан. За даними різних авторів ЗДА страждає 5-10% населення, латентний дефіцит заліза (синдром дефіциту заліза без анемії) виявляється у 12-15% обстежених, причому серед жінок

репродуктивного віку – у 50%. Найчастіше ЗДА спостерігається серед дітей, підлітків, жінок репродуктивного віку, старих людей [8].

Розвиток залізодефіцитної анемії може відбуватися під час порушення обміну заліза. Загальний вміст заліза в організмі людини становить у середньому 4,5-5 г. Щодня з їжею людина отримує 15-20 г заліза. Залізо міститься у продуктах тваринного (м'ясо, печінка, риба, яйця) та рослинного (соя, петрушка, горох, шпинат, родзинки, рис та ін.) походження. При цьому в продуктах тваринного походження залізо двовалентне, воно легко розчиняється в лужному середовищі тонкої кишки і добре всмоктується [18]. Залізо з рослинних продуктів тривалентне, тому не розчинне в середовищі тонкого кишечника і, тільки окислившись до двовалентного під впливом соляної кислоти може всмоктуватися в тонкому кишечнику. У слизовій оболонці дванадцятипалої кишки та верхніх відділах тонкої кишки за допомогою транспортних систем всмоктується загалом 1-1,5 мг заліза на добу [19]. У крові залізо циркулює у комплексі з плазмовим трансферином. Залізо бере участь у регуляції обміну речовин, у процесах перенесення кисню, тканинному диханні та впливає на стан імунологічної реактивності. Залізо в організмі існує у двох основних формах: гемове (гемоглобін, міоглобін, цитохроми, ферменти) та негемове (феритин, гемосидерин, трансферин, ферменти). Депонування заліза здійснюється у складі білків феритину та гемосидерину. Фізіологічні втрати заліза становлять близько 1 мг на добу, обумовлені виділенням заліза з фекаліями, сечею, злущуванням епітелію шкіри [20].

Дефіцит заліза розвивається поступово та закономірно проходить у кілька етапів: прелатентний дефіцит заліза, латентний дефіцит заліза та власне ЗДА. Таким чином, в першу чергу знижується кількість заліза, депонованого в органах та тканинах, потім зменшується кількість транспортного заліза, пізніше – заліза гемовмісних ферментів і заліза, необхідного для синтезу гемоглобіну [21].

1.2.2. Особливості розвитку вітаміну В₁₂-дефіцитної анемії

В₁₂-дефіцитна анемія (В₁₂ДА) – це мегалобластна анемія, зумовлена порушенням синтезу ДНК та РНК в еритрокаріоцитах внаслідок дефіциту вітаміну В₁₂. Поширеність В₁₂ДА становить 1500 на 1 млн. населення. Хворіють переважно особи старшої вікової групи. Співвідношення жінок та чоловіків складає 10:7 [22].

В₁₂ДА пов'язана з порушенням обміну вітаміну В₁₂. В організмі здорової людини міститься близько 2-5 мг вітаміну В₁₂. Добовий повноцінний раціон містить 30 мкг вітаміну В₁₂. При цьому добова потреба становить 2-7 мкг, а фізіологічні втрати із сечею та калом 2-5 мкг [6]. Вітамін В₁₂ надходить в організм з їжею, переважно тваринного походження: м'ясо, печінка, нирки, яєчний жовток, сир, молоко, чорна ікра. Вивільнившись із зв'язаного з білками їжі стану під впливом кулінарної обробки, соляної кислоти, протеолітичних ферментів, у шлунку вітамін В₁₂ зв'язується з «білками-R». У дванадцятипалій кишці під впливом протеолітичних ферментів даний комплекс розпадається і вітамін В₁₂ зв'язується з гастромукопротеїном – внутрішнім фактором Кастла, біосинтез якого здійснюється парієтальними клітинами шлунка [22].

У дванадцятипалій кишці відбувається взаємодія комплексу «вітамін В₁₂-гастромукопротеїн» зі специфічними рецепторами, після чого вітамін В₁₂ надходить у клітини слизової оболонки. Потім, зв'язуючись із транспортними білками – транскобаламінами, В₁₂ доставляється в кістковий мозок та печінку. Своєю біологічною роллю вітамін В₁₂ виконує у вигляді двох коферментів: метилкобаламіну та дезоксиаденінозилкобаламіну. Перший бере участь у процесі розмноження та дозрівання гемопоетичних клітин; епітелію шлунково-кишкового тракту. Другий кофермент бере участь у розщепленні та синтезі жирних кислот, що забезпечує нормальний метаболізм мієліну в нервовій системі [23].

При дефіциті вітаміну В₁₂ порушується біосинтез тимідину, внаслідок чого порушується біосинтез ДНК, отже процеси мітозу в клітині. Таким

чином, переважно від дефіциту вітаміну B_{12} страждають швидкозростаючі тканини: клітини кісткового мозку та епітеліальні клітини шлунково-кишкового тракту. Для червоного ростка кровотворення характерна поява мегалобластного типу кровотворення із затримкою дозрівання ядер еритрокаріоцитів порівняно зі ступенем насичення гемоглобіну, скороченням тривалості життя червоних кровотворних клітин. Одночасно спостерігається зниження гранулоцитопоезу та тромбоцитопоезу [22].

Нестача вітаміну B_{12} також призводить до порушення обміну жирних кислот з накопиченням токсичних для нервової системи метилмалонової та пропіонової кислот. Як наслідок порушується синтез мієліну. Пошкодження зачіпає задні та бічні стовпи спинного мозку [23].

1.2.3. Біохімічні механізми розвитку фолієводефіцитної анемії

Анемія, зумовлена дефіцитом фолієвої кислоти, яку ще називають вітаміном B_9 , – захворювання крові, що характеризується зниженням кількості гемоглобіну та еритроцитів (червоних кров'яних тілець) [7].

Фолієводефіцитна анемія (ФДА) – це анемія, що розвивається внаслідок дефіциту фолієвої кислоти. Основними характеристиками ФДА є мегалобластний еритропоез у кістковому мозку та макроцитарна гіперхромна анемія, що часто супроводжується тромбоцитопенією та нейтропенією [24].

Вміст фолатів у організмі людини варіює в межах 7-22 мг. На відміну від дефіциту вітаміну B_{12} , виснаження запасів фолатів настає швидко, вже через кілька тижнів або місяців з моменту появи причини. Фолати містяться у багатьох рослинних (помідори, авокадо, цибуля, гриби) та тваринних (печінка, м'ясо) продуктах. Але, на відміну від вітаміну B_{12} , при термічній обробці фолати швидко руйнуються. При достатній кількості свіжих овочів та фруктів у раціоні харчування на добу з їжею надходить 400 – 600 мкг фолатів, проте потреба суттєво зростає при вагітності, швидкому рості дитини, великих фізичних навантаженнях та різкій активації еритропоезу [25]. Всмоктується фолієва кислота у тонкій кишці, у поєднанні з молекулою

глутамінової кислоти. Після потрапляння в організм фолієва кислота перетворюється на активний метаболіт тетрагідрофолієву кислоту [23]. Тетрагідрофолієва кислота – активна коферментна форма фолатів. Фолати беруть участь у синтезі пуринів та піримідинів, тимідин-монофосфату з уридину та утворенні метіоніну з гомоцистеїну (процес метилювання). Дефіцит фолієвої кислоти призводить до порушення клітинного поділу та накопичення токсичних метаболітів, таких як гомоцистеїн [25].

В організмі фолієва кислота присутня у вигляді своєї коферментної форми – тетрагідрофолієвої кислоти, яка бере участь у синтезі глутамінової кислоти, піримідинових і пуринових основ, а також тимідинмонофосфату – компонента ДНК. При фолієводефіцитній анемії, в першу чергу, порушується синтез нуклеїнових кислот кровотворних клітин, що активно діляться, в результаті чого розвивається анемія, що часто поєднується з лейкопенією і тромбоцитопенією [26].

В основі розвитку фолієводефіцитної анемії – безліч різних причин та факторів ризику. Запас фолієвої кислоти в організмі незначний, тому його необхідно постійно заповнювати. Однією з основних причин розвитку дефіциту вітаміну В₉ є недостатнє його споживання з їжею. Часто проблема нестачі фолієвої кислоти в організмі спостерігається в осіб, які зловживають алкоголем, психотропними речовинами. Люди, які споживають мало овочів та фруктів, особливо літні, також входять до групи ризику розвитку дефіциту вітаміну В₉ [24].

Фолієва кислота бере участь у процесі поділу клітин і необхідна у великій кількості для їх росту та швидкого оновлення. У зв'язку з цим поширеною причиною розвитку фолієводефіцитної анемії є надмірна потреба у фолієвій кислоті за низького надходження її з їжею. До групи ризику належать жінки у період вагітності та лактації, діти у період інтенсивного росту, підлітки. Також великої кількості фолієвої кислоти потребують люди, які страждають на хронічні шкірні захворювання, наприклад псоріаз, екзему [26].

Гемолітичні анемії (у яких з різних причин відбувається посилене руйнування еритроцитів) різного походження також сприяють розвитку дефіциту фолієвої кислоти. Порушення всмоктування фолієвої кислоти виникає при різних захворюваннях кишечника, що характеризуються синдромом мальабсорбції (зниженням функції всмоктування поживних речовин у кишечнику). До них відносяться запальні захворювання кишечника (наприклад, хвороба Крона), глютенева ентеропатія (целіакія), харчова алергія у дітей із кишковими проявами, лактазна недостатність [26].

Отже, фолієва кислота – природний вітамін, який необхідний для нормального кровотворення. У звичайних умовах вона синтезується мікрофлорою кишечника і надходить в організм у складі фолатів з їжею рослинного походження (бобовими, борошном грубого помелу, спаржею, шпинатом, листям салату, броколі, яловичою печінкою). Нестача цього вітаміну призводить до розвитку анемії.

1.3. Біохімічні механізми метаболізму заліза в організмі

В організмі людини залізо слугує кофактором для багатьох гемопротеїнів і негемових протеїнів, що містять залізо. Гемопротеїни включають гемоглобін і міоглобін, які відповідають за зв'язування і транспорт кисню; каталазу і ферменти пероксидази, які беруть участь у кисневому обміні; і цитохроми, які беруть участь у транспорті електронів і процесах дихання мітохондрій [27]. Негемові залізовмісні білки також відіграють важливу роль, оскільки вони використовуються в синтезі ДНК, проліферації та диференціації клітин, регуляції генів, метаболізмі ліків, синтез стероїдів [28].

Загальна кількість заліза у людини вагою 70 кг становить приблизно 3500–4000 мг, що відповідає в середньому концентрація 50-60 мг заліза на кг маси тіла [29].

Найпоширеніші два стани заліза – двовалентне залізо (Fe^{2+}) і тривалентне залізо (Fe^{3+}). Важливу роль у всмоктуванні заліза з їжі відіграє

дванадцятипала кишка. Поглинене залізо може зберігатися в ентероцитах або потрапляти в кровообіг і транспортуватися по організму, у зв'язаному стані з протеїном трансферином [30]. Потім він поглинається тканинами і використовується у багатьох процесах – еритропоезі в кістковому мозку, синтезі міоглобіну в м'язах і окислювальному метаболізмі у мітохондріях клітин. Макрофаги селезінки, печінки та кісткового мозку утилізують залізо зі старіючих еритроцитів. Печінка відіграє функцію депо заліза і регуляторну функцію [31]. Завдяки виробленню гормону гепсидину відбувається контроль вивільнення заліза з ентероцитів і макрофагів, у результаті чого залізо потрапляє в кровообіг [32]. У такий спосіб відбувається регуляція підтримки концентрації заліза в плазмі в межах фізіологічного рівня. На рис.1.1 зображено основні тканини, де відбувається метаболізм заліза [30].

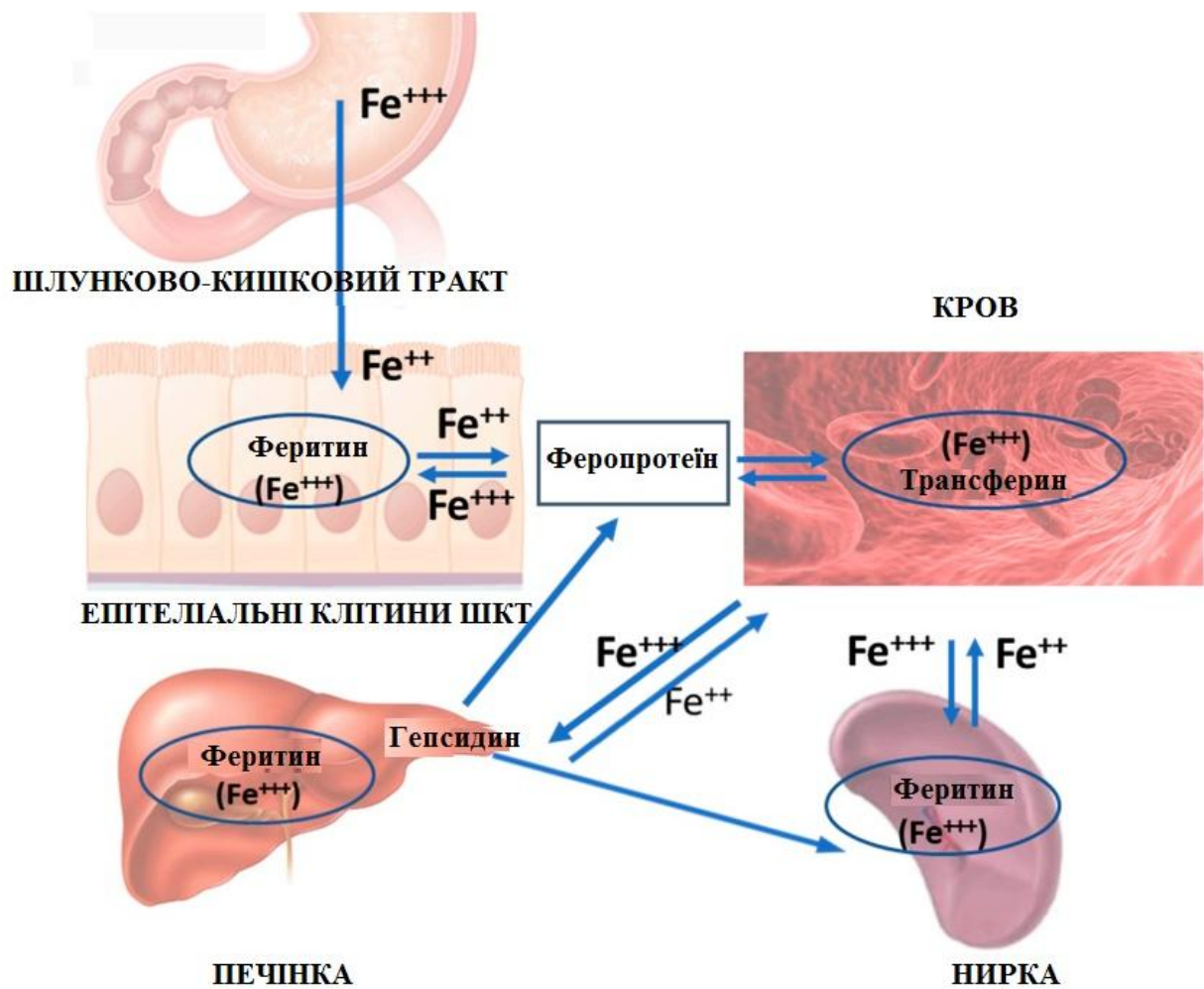


Рис.1.1. Основні тканини, що беруть участь у регуляції системного метаболізму заліза

Як видно з рис.1.1 ентероцити дванадцятипалої кишки відповідають за всмоктування заліза з їжі. Білок-транспортер двовалентного металу *Transporter 1 (DMT1)*, розташований на апікальній поверхні ентероцитів, сприяє поглиннанню негемового двовалентного заліза (Fe^{2+}) з просвіту кишечника. Після всмоктування залізо циркулює в організмі у зв'язаному стані з білком трансферином і поглинається різними тканинами для утилізації. Ретикулоендотеліальна система (РЕС), яка включає макрофаги селезінки, переробляє залізо зі старих еритроцитів [30]. Крім багатьох інших функцій, печінка виробляє гормон гепсидин [32].

Отже, більша частина заліза, присутнього в кровообігу, зв'язана з трансферином. В результаті залізо, зв'язане з трансферином, поглинається попередниками еритроцитів (еритробластами) через рецептор *TfR1* (6). Fe^{3+} , зв'язаний з трансферином, відновлюється в ендосомі фероредуктазою *STEAP3* до Fe^{2+} (7), де він експортується через *DMT1* (8) у цитозоль і потрапляє до пулу лабільного заліза (рис.1.2) [30, 33].

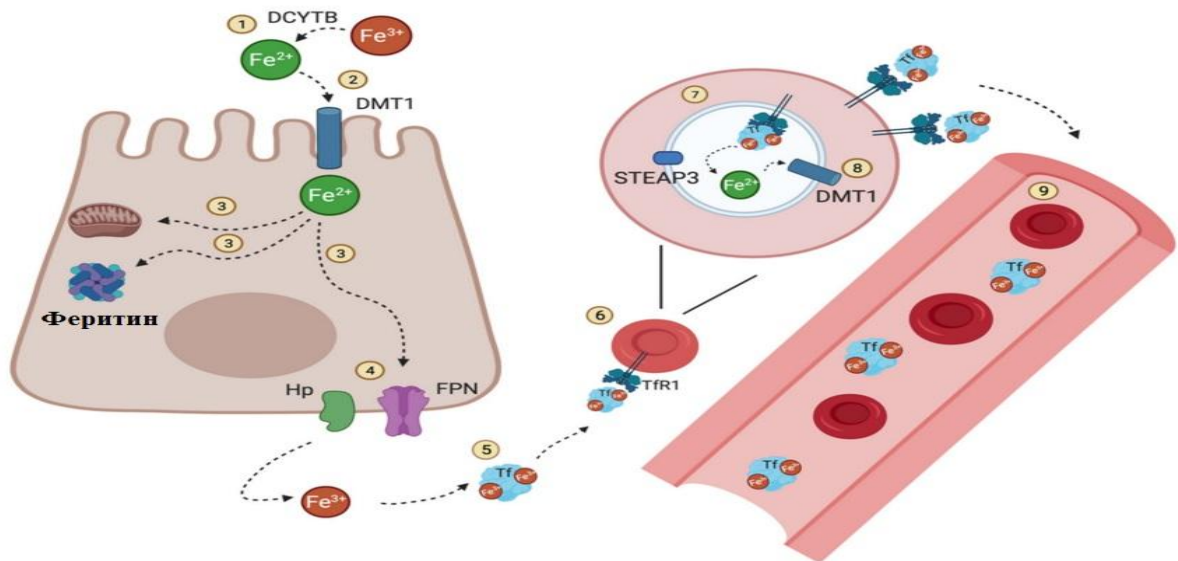


Рис.1.2. Роль трансферину в транспорті заліза в організмі

Зрілі еритроцити циркулюють у крові протягом приблизно 120 днів (9), поки вони не будуть видалені з кровообігу під час еритрофагоцитозу.

Отже, у надлишку залізо є токсичним для організму, тому наявність заліза суворо контролюється на клітинному та системному рівнях.

Приблизно 25 мг заліза на добу необхідно для еритропоезу. Дієтичне надходження заліза (1-2 мг) недостатнє для задоволення добової потреби в залізі для еритропоезу. Тому макрофаги в печінці, селезінці та кістковому мозку переробляють залізо зі старих еритроцитів, який потім повторно використовується для еритропоезу. Якщо жорстке регулювання доступності заліза втрачено, це може призвести до серйозних клітинних розладів, пошкодження та системних захворювань [31].

1.4. Трансферин і феритин як маркери стану обміну заліза в організмі

Трансферин переносить атоми заліза із ШКТ до клітин органів, які депонують залізо, між еритроїдними елементами кісткового мозку та макрофагами, регулює транспорт заліза до гепатоцитів. Як і всі транспортні білки, трансферин синтезується у печінці, у невеликих кількостях також утворюється у лімфоїдній тканині, молочній залозі, тестикулах та яєчниках [34]. Він являє собою глікопротеїн з молекулярною масою 76-77 кДа. Цей протеїн має значний генетичний поліморфізм (більше 20 варіантів порушень первинної структури). Кожна молекула трансферину здатна зв'язувати два атоми заліза, для проходження цього процесу потрібна присутність бікарбонатів [35].

Атоми заліза транспортуються до клітин у вигляді взаємодії комплексу залізо-трансферин зі специфічними рецепторами плазматичної мембрани. Комплекс залізо-трансферин проникає в цитозоль, де звільняється атом заліза, при цьому трансферин виходить із клітини в кров'яне русло, залишаючись здатним до повторного та багаторазового зв'язування іонів заліза. Ретикулоцити мають найбільшу кількість рецепторів до трансферину на плазматичній мембрані. Залізо у цих клітинах зв'язується з протопорфірином з утворенням гему, при з'єднанні якого з глобіном утворюється гемоглобін або міоглобін [36].

Інтенсивність синтезу трансферину співвідноситься із загальними запасами заліза за принципом зворотного зв'язку – при виснаженні запасів заліза синтез трансферину активується, зі збільшенням – падає. При насиченні трансферину (нижче 16%) надходження заліза до еритроцитарного паростка кісткового мозку стає недостатнім для синтезу гемоглобіну, що призводить до мікроцитозу та гіпохромії. Також відбувається зниження клітинної проліферації, що спричиняє зменшення кількості еритроцитів. Слід пам'ятати, що трансферин – один із «негативних» протеїнів гострої фази, тобто при різних запальних захворюваннях його концентрація знижується, що може призводити до помилок у діагностиці дефіциту заліза [36].

Феритин – це протеїн, що складається з 24 субодиниць, які містять важкі ланцюги (H) і легкі ланцюги (L). Структура цих субодиниць дозволяє протеїну зв'язуватися з 4500 атомів заліза, що робить його основним білком для зберігання заліза в клітинах [30]. Субодиниці будують клітинно-подібний комплекс, що зв'язує та зберігає іони Fe^{3+} в їх інертній формі, що обмежує генерацію шкідливих окислювально-відновних реактивних форм [37]. Феритинозв'язане залізо – це основний механізм зберігання заліза в макрофагах і клітинах печінки. Інші типи клітин, такі як еритробласти, здатні поглинати залізо, зв'язане з феритином, і використовувати це залізо для підтримки їх диференціації [38]. Вивільнення заліза з феритину регулюється відомим процесом як феритинофагія, де коактиватор ядерного рецептора 4 (NCOA4) безпосередньо зв'язує легкий ланцюг феритину і передає комплекс до аутолізосоми для деградації. Під час цього процесу залізо вивільняється і стає доступним для біосинтетичних шляхів [39].

На поверхні феритину знаходиться білкова оболонка (апоферитин) і всередині атома заліза. Феритин дозволяє зберігати залізо в біологічній формі і в той же час захищати клітини від токсичної дії іонізованого заліза. Феритин, який визначається в сироватці крові, походить з клітин кісткового мозку, селезінки і печінки, а також має прямий кількісний зв'язок з основними запасами заліза, що знаходяться в органах організму. Визначення

феритину вважається найкращим тестом для діагностики ЗДА, позитивним прогностичним результатом. Нестача заліза та спустошення депо заліза – єдина досі відома причина зниження концентрації заліза у сироватці крові. Тому за визначенням феритину можна діагностувати дефіцит заліза, що виник, вже в ранній стадії і запобігти формуванню ЗДА [40].

Отже, завдяки своїй високій реакційній здатності залізо завжди зв'язане з протеїнами. Так, залізо у плазмі зв'язане з трансферином, депонується у клітинах у вигляді феритину і є частиною молекул гемоглобіну або міоглобіну.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт і методи досліджень

Проаналізовано результати лабораторного дослідження 24 пацієнтів хворих різними видами анемії, які проходили обстеження на базі медичного центру «Sharabi». Вік пацієнтів складав від 26 до 46 років з переважанням пацієнтів жіночої статті.

Для постановки діагнозу анемії враховували клінічні характеристики, які спостерігалися у пацієнтів, зміни показників периферичної крові та основні показники обміну заліза. Усі обстеження проводили до початку проведення будь-якого лікування.

За виявленим видом анемії всіх хворих поділили на три групи:

I група – 10 пацієнтів, яким поставлено діагноз ЗДА;

II група – 7 пацієнтів, у яких виявлена В₁₂-дефіцитна анемія;

III група – 7 пацієнтів з фолієводефіцитною анемією.

Лабораторне обстеження проводили під час звернення пацієнтів за медичною допомогою. Взяття крові здійснювали з ліктьової вени, дотримуючись правил відбору крові та правил асептики. Місце проколу попередньо протирали ватним тампоном, змоченим у спирті. Кров відбирали у вакуумні пробірки, які не містили антикоагулянта цитрату натрію, у результаті чого, після проведення центрифугування в надосаді отримували сироватку крові.

Для підтвердження діагнозу відповідного виду анемії враховувалися не тільки особливості патогенезу захворювання, а також у пацієнтів визначали рівень вітаміну В₁₂, вміст фолієвої кислоти та концентрацію заліза в сироватці крові. Окрім того усім пацієнтам проводили цито-біохімічний аналіз крові, який включав визначення вмісту еритроцитів і гемоглобіну, середнього об'єму еритроциту і концентрацію гемоглобіну в еритроциті, ЗЗЗК, рівня феритину, трансферину та насичення трансферину залізом.

Визначення концентрації вітаміну B₁₂ проводили імуноферментним методом.

Принцип методу. Застосовували твердофазний імуноферментний метод, використовуючи моноклональні антитіла проти вітаміну B₁₂. Оскільки вітамін B₁₂ є гаптенем, для проведення імуноензимного аналізу потрібне отримання кон'югатів цієї сполуки з бичачим сироватковим альбуміном [7, 22].

Отримання кон'югатів вітаміну B₁₂ проводять карбодіімідним методом. Для кон'югату вітаміну B₁₂ використовують його карбоксильне похідне. 10 мг карбоксилатного похідного ціанкобаламіну (7 мкмоль) розчиняють у 2 мл абсолютного диметилформаміду, і додають по 2 мг дициклогексилкарбодііміда (10 мкмоль). Реакційну суміш вітаміну B₁₂ інкубують у темряві протягом 2-х діб до випадання кристалів дициклогексилсечовини. Потім супернатант з N-гідроксисукцинімідилкобаламіном добавляють до 6,5 мл розчину БСА (10 мг/мл) в 0,1М карбонатному буфері, рН 9,2. Реакцію кон'югування проводять протягом 6 годин при кімнатній температурі в темряві, після чого кон'югат діалізують у темряві при 4°C проти 0,01М трис-хлоридного буфера, рН 7,2, що містить 0,15М хлориду натрію для видалення продуктів реакції, що не зв'язалися. Ступінь модифікації БСА ціанкобаламіном визначали спектрофотометрично, використовуючи коефіцієнт екстинкції 8700 M⁻¹ cm⁻¹ при L=550 нм.

Хід визначення

Сенсибілізацію планшетів проводили кон'югатами Альб-B₁₂ та Альб-фолат у розведенні 1:20 у фосфатному буфері з БСА протягом перших 3-х годин при 37°C, а потім протягом ночі у холодильнику. Потім планшети відмивають кілька разів ФСБ. Антигени, тобто. стандартні розчини та випробувані зразки, попередньо прогрівають при 100°C в розчині 0,3М NaOH з KCN і з дитіотреїтолом (ДТТ) для переведення всіх дериватів в ціан-форму та запобігання денатурації при кип'ятінні. Для побудови калібрувальної

кривої використовували такі концентрації стандартних розчинів: 1300 пг/мл, 650 пг/мл, 300 пг/мл, 150 пг/мл, 75 пг/мл та 20нг/мл – для вітаміну B₁₂.

Стандартні розчини та дослідні зразки по 0,1 мл поміщають у спеціальні пробірки та додають по 0,1 мл розчину NaOH з KCN (1мг/мл) та ДТТ (50мкл ДТТ на 6 мл розчину лугу). Пробірки закривають кришечками з фольги і поміщають на 10 хв у киплячу водяну баню. Потім усі проби охолоджують і вносять по 0,1 мл в сенсibiliзовані планшети. Реакцію проводять протягом 12-14 годин, після чого планшети знову відмивають, а потім вносять відповідно по 0,1 мл антитіл проти вітаміну B₁₂ в розведенні 1:1000. Планшети знову поміщають у холодильник на 12-14 годин, після чого в черговий раз відмивають ФСБ. Потім у всі лунки планшета вносили по 0,1 мл анти-IgG-ПХ у розведенні 1:10000 і поміщають у термостат на 2 години, знову відмивають ФСБ і потім додають 0,1 мл ТМВ, а після розвитку забарвлення через 10-15 хв реакцію закріплюють 4% H₂SO₄. Результати спектрофотометрують при L=450 нм. На основі стандартних розведень будують криву, за якою потім визначають концентрацію досліджуваного B₁₂ у зразках крові.

Референтні значення концентрації вітаміну B₁₂ – 193-982 пг/мл.

Визначення концентрації фолієвої кислоти у сироватці крові, проводили імуноферментним методом, детальна методика якого описана вище. Імуноферментний аналіз (ELISA) виконувався на стриповій основі за допомогою імуноферментного аналізатора "Numareader single" при довжині хвилі 450 нм та диференціальним фільтром 630 нм [7].

Розрахунки проводились на основі даних отриманих вимірюванням калібрувальних розчинів, відповідно до побудованої калібрувальної кривої, на основі якої обчислювали значення отриманих результатів.

Референтні значення концентрації вітаміну B₉ – 3-17 нг/мл

Визначення вмісту заліза в плазмі крові

Принцип методу. Метод заснований на утворенні жовтої комплексної сполуки заліза з сульфосаліциловою кислотою в аміачному розчині після відділення заліза від міді осадженням його з гідроксидом алюмінію або лантану. Оптичну густину розчину вимірюють при довжині хвилі 425 нм [41].

Хід визначення

У мірну колбу на 50 мл додають відому кількість мілілітрів аналізованої проби, 5 мл сульфосаліцилової кислоти і 5 мл аміаку, доводять до відповідного об'єму дистильованою водою до мітки і ретельно перемішують. Через 5 хвилин вимірюють оптичну густину при $\lambda = 400$ нм і знайденої величини віднімають значення оптичної щільності D_1 холостого визначення, проведеного таким же способом з дистильованою водою D_0 . За калібрувальною кривою знаходять концентрацію заліза в нмоль/л. Референтні значення вмісту заліза в крові – 9-30 нмоль/л.

Визначення кількості еритроцитів в досліджуваних зразках проводили шляхом підрахунку цих клітин в камері Горяєва.

Хід визначення

1. У пробірки для аналізу наливають 4 мл 2% розчину хлористого натрію. Кров набирають в капілярну піпетку та видують на дно пробірки.
2. Перемішують вміст пробірки та додають по 20 мкл крові, розведеної в 200 разів розчином NaCl.
3. Для підрахунку еритроцитів в камері Горяєва покривне скло притирають до камери Горяєва.
4. Після перемішування вмісту пробірки проби відбирають за допомогою скляної палички та краплю крові переносять на край шліфованого скла камери.
5. Після заповнення камери її залишають на 2 хв для осідання формених елементів крові.

6. Під мікроскопом підраховують формені елементи при малому збільшенні.

7. Еритроцити рахують в 80 малих квадратах, розташованих по діагоналі. Рахують ті еритроцити, що лежать як всередині малого квадрата, так і на лівій і верхній його межі.

8. Порахувавши кількість еритроцитів у вище зазначених квадратах, визначають їх кількість за формулою:

$$X = \frac{A \cdot 400 \cdot 200}{80} = A \cdot 10000 \text{ в } 1 \text{ мм}^3 \text{ крові};$$

де A – кількість еритроцитів в 80 малих квадратах.

Референтні значення кількості еритроцитів у крові – $4-5 \times 10^{12}$ / л.

Визначення вмісту гемоглобіну проводили за допомогою гемоглобінціанідного методу.

Принцип методу полягає в тому, що гемоглобін може взаємодіяти з ціаністим калієм та при цьому окислюватися до метгемоглобіну. Утворений метгемоглобін з ацетонціангідрином утворює кольорову сполуку – гемоглобінціанід. Інтенсивність утвореного забарвлення прямо пропорційна концентрації гемоглобіну в пробі [42].

Хід визначення

1. Під час проведення визначення рівня гемоглобіну необхідно всі реактиви довести до відповідної температури. При цьому температура повітря в лабораторії повинна бути $+18-25^\circ\text{C}$.

2. У пробірку додають 5 мл робочого розчину та 0,02 мл крові, після чого проби перемішують та витримують 20 хвилин.

3. Проби вимірюють на фотоелектроколориметрі при $\lambda=540$ нм у кюветі товщиною 10 мм проти холостої проби (дистильована вода або робочий розчин).

4. Вміст гемоглобіну в крові визначають або за калібрувальним графіком, або за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{пр}}}{E_{\text{кр.}}} * 150, \text{ де}$$

C – концентрація гемоглобіну, г/л ; $E_{\text{пр}}$ – оптична густина досліджуваної проби ,од;
 $E_{\text{кр.}}$ – оптична густина калібрувального розчину, од.

Референтні значення вмісту гемоглобіну в крові – 120-165 г/л.

Визначення середнього об'єму еритроцитів проводили розрахунковим методом, використовуючи наступну формулу [42]:

$$MCV = Ht \times 10 / RBC,$$

де RBC - кількість еритроцитів, $\times 10^{12}/\text{л}$; Ht - гематокрит, %.

Референтні значення – 82-92 фл (фемтолітри) [43].

Визначення середньої концентрації гемоглобіну в еритроциті проводили розрахунковим методом, використовуючи наступну формулу [42]:

$$MCHC = Hb \times 10 / Ht,$$

де Ht – гематокрит, %; Hb - гемоглобін, г/л.

Референтні значення – 33-37 г/дл.

Визначення загальної заліозв'язуючої здатності крові

Оскільки залізо циркулює у зв'язаному з трансферином стані, то аналіз ЗЗЗК дозволяє визначити максимальну концентрацію заліза, яку може зв'язати трансферин. В нормі в молекулі трансферину атомами заліза зайнято біля 1/3 частини можливих зв'язків.

Принцип методу. Для визначення ЗЗЗК зразки обробляють розчином тривалентного заліза) для насичення вільних зв'язків трансферину, після чого видаляли незв'язане залізо та вимірювали цю концентрацію.

Після насичення трансферину залізом, його надлишок видаляють шляхом осадження гідроксикарбонатом магнію. Загальна концентрація

заліза, яку визначили в супернатанті вказує на ЗЗЗК у зразку [43]. Рівень заліза визначали за методом, описаним вище.

Референтні показники ЗЗЗК становлять 44,7-80,5 мкмоль/л або 250-450 мкг/л.

Визначення вмісту феритину в сироватці крові

Принцип методу ґрунтується на проведенні твердофазного імуноферментного аналізу. У ньому використовується анти-феритинове антитіло для іммобілізації солідної фази (мікропланшетні лунки) та інше мишаче моноклональне анти-феритин антитіло в розчині кон'югату антитіло-ензим (пероксидаза хрому). Тестовий зразок дає можливість одночасно реагувати з антитілами, в результаті молекули феритину будуть у сендвічі з твердою фазою та ензимно-зв'язаними антитілами. Після 60 хвилинної інкубації при кімнатній температурі лунки промиваються водою для видалення незв'язаних мічених антитіл. Додається розчин ТМБ інкубується 20 хвилин, в результаті відбувається розвиток блакитного забарвлення. Реакцію зупиняють додаванням стоп-реагенту і забарвлення змінюється на жовтий. Проби вимірюються спектрофотометрично при 450 нм. Концентрація феритину прямо пропорційна інтенсивності забарвлення тестового зразка [44].

Приготування реагентів

1. Перед використанням доведіть реагенти до кімнатної температури (18-22°C). 2. Розведіть одну частину буфера промивання (50x) з 49 частинами дистильованої води. Наприклад, розбавте 15 мл концентрату буфера промивання (50x) в дистильованій воді, щоб приготувати 750 мл буфера промивання (1x). Перед використанням добре перемішайте.

Хід визначення

1. Помістіть потрібну кількість лунок у рамку для стрипів.
2. Внесіть по 20 мкл стандартів, зразків та контролів у відповідні лунки.

3. Внесіть 100 мкл ферментного кон'югату в кожен лунку.
4. Ретельно перемішайте 30 секунд. Дуже важливо домогтися повного змішування на цьому етапі.
5. Інкубуйте при кімнатній температурі (18-25⁰С) 60 хвилин.
6. Видаліть інкубаційний розчин, витрусивши вміст планшета в контейнер для відходів.
7. Промийте і спорожніть мікролунки 5 разів промиваючим буфером.
9. Внесіть 100 мкл ТМБ субстрату в кожен лунку. Обережно перемішайте 5 секунд.
10. Інкубуйте при кімнатній температурі 20 хвилин у темряві.
11. Зупиніть реакцію додаванням 100 мкл стоп розчину в кожен лунку.
12. Обережно перемішайте 30 секунд. Важливо переконаватися, щоб блакитне забарвлення змінилося повністю на жовте.
13. Вимірюйте оптичну щільність при 450 нм мікропланшетним зчитувачем протягом 30 хвилин.

Важливі зауваження: 1. Процедура промивання вкрай важлива. Недостатнє промивання призведе до підвищеної абсорбції та неточних результатів. Щоб уникнути впливів матриці не використовувати інший розчин для розведення зразків.

Розрахунок результатів

Визначте середню абсорбцію для кожного набору стандартів, контролів і зразків. Побудуйте стандартну криву, відкладаючи точки середньої абсорбції стандартів на вертикальну вісь Y, проти відповідних концентрацій на горизонтальну вісь X. Використовуйте середнє значення поглинання для кожного зразка, щоб визначити нг/мл із стандартної кривої. Розведені зразки повинні бути скориговані на фактор розведення.

Референтні значення вмісту феритину в крові – 6-159 нг/мл.

Визначення трансферину в сироватці крові

Принцип методу. Аналіз трансферину ґрунтується на турбідиметричному вимірюванні. Мутність викликається утворенням нерозчинних імунокомплексів антиген-антитіло. Утворення комплексів прискорюється та посилюється PEG [45].

Хід визначення

Зразки та контролі готові до використання. Для побудови калібрувальної кривої використовують протеїновий калібратор, який розводять 1:2 з 0,9 % розчином NaCl.

Процедура визначення наведена у таблиці.

Внести в тестові пробірки	Калібратори	Зразки/Контролі
Буфер	900 мкл	900 мкл
Кал/Контролі/Зразки	5 мкл	5 мкл
Перемішати та зафіксувати значення A_1 калібраторів і зразків (контролів) при 340 нм. Потім додати:		
Реагент антитіл	80 мкл	80 мкл
Перемішати. Інкубувати 5 хвилин при температурі аналізу. Зафіксувати значення A_2 калібраторів і зразків (контролів) при 340 нм. Розрахувати: $\Delta A = (A_2 - A_1)$.		

Референтні значення 2-3,6 г/л.

Визначення насичення трансферину залізом проводили розрахунковим методом – відношення концентрації плазмового (сироваткового) заліза до ЗЗЗК, яке виражається у відсотках (%). Референтні значення 30% [45].

2.2. Статистична обробка результатів

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням програми “Excel 2000 for Windows”, з визначенням середнього арифметичного та відхилення від середнього арифметичного. Обробку результатів здійснювали із застосуванням t-критерій Стьюдента. Результати вважали статистично достовірними при $P \leq 0,05$ [46].

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Анемією визначають стан, який характеризується зниженням вмісту гемоглобіну (< 130 г/л – для чоловіків та < 120 г/л – для жінок) в крові та у більшості випадків зменшення кількості еритроцитів. Оскільки анемія досить поширена патологія в усьому світі (страждає близько 1,8 млрд. осіб на Землі), то виявлення різних видів анемій на різних ступенях вираженості є досить актуальним. Різноманіття факторів, що лежать в основі розвитку анемій, робить дуже важливою проблему їх диференційної діагностики [16].

Усі анемії є вторинними і зазвичай є проявом основного захворювання. Тому, диференційну діагностику анемій можна умовно поділити на 2 етапи. На початковому етапі діагностичного пошуку основна мета – визначення так званого патогенетичного варіанта анемії. Саме на цьому етапі визначають основний механізм, який зумовив зниження рівня гемоглобіну в конкретному випадку. Саме на цьому етапі враховують зміни лабораторних показників [36]. Наступний етап діагностичного пошуку – прерогатива спеціаліста, оскільки після визначення патогенетичного варіанту анемії завданням лікаря є діагностика патологічного процесу, що лежить в основі анемічного синдрому, тобто виявлення причини анемії у конкретного хворого.

Оскільки розпізнавання патогенетичного варіанта базується на даних лабораторного дослідження, то нами досліджено цитобіохімічні показники крові при різних видах анемії, що допоможе на ранніх етапах діагностувати певний вид анемії.

Результати проведених досліджень показали, що у пацієнтів із ЗДА виявлений найнижчий вміст заліза у сироватці крові, що відрізняло цей показник від значень пацієнтів з В₁₂ДА і ФДА. Так, рівень загального заліза в сироватці крові знижувався у 2,3 рази при ЗДА порівняно з нижньою межею норми, що підтверджує діагноз ЗДА (рис.3.1). Водночас, у пацієнтів з В₁₂ДА спостерігалось підвищення загального рівня заліза у 1,4 рази порівняно з верхньою межею норми. При ФДА рівень заліза знаходився в межах норми (рис.3.1).

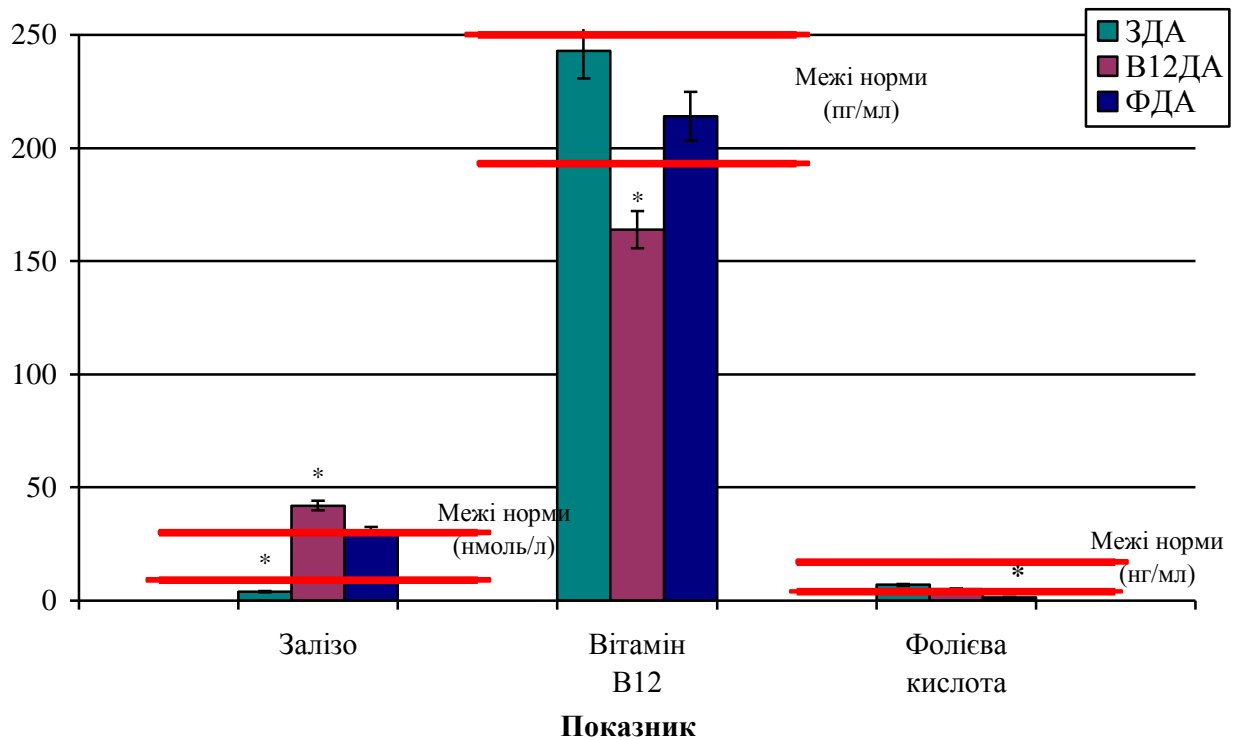


Рис.3.1. Вміст заліза, вітамінів B₁₂ і B₉ в сироватці крові за умов розвитку різних видів анемії

*Примітка (тут і надалі): ЗДА – хворі, у яких спостерігалася залізодефіцитна анемія; B₁₂-ДА – пацієнти, у яких виявлена B₁₂-дефіцитна анемія; ФДА – хворі з фолієводефіцитною анемією; * – статистично достовірна різниця порівняно з показниками норми, P<0,05.*

Зниження вмісту заліза при ЗДА може бути результатом пониженого його надходження, що не відповідає добовій потребі більшості людей, або поганого його всмоктування в шлунково-кишковому тракті (ШКТ) [47]. Слід зауважити, що навіть помірна втрата заліза у поєднанні з підвищенням потреби в ньому може викликати дефіцит заліза в організмі, що і є однією із причин ЗДА [24]. При B₁₂ДА рівень заліза навпаки підвищувався, що, імовірно, пов'язано із його вивільненням із клітинних депо в організмі. При ФДА рівень заліза знаходиться на рівні верхньої межі норми, що також вказує на інші патогенетичні механізми розвитку анемії. Про це свідчить зниження концентрації вітаміну B₁₂ та фолієвої кислоти при B₁₂ДА і ФДА відповідно (рис.3.1). Виявлений факт вказує, що рівень заліза в сироватці крові не є визначальним показником, який дозволяє провести диференційну діагностику різних видів анемії. Окрім того, дефіцит вітаміну B₁₂ без

лікування може призвести до незворотних неврологічних розладів. Проте, за літературними даними вираженість неврологічних симптомів переважно не корелює з тяжкістю анемії [7]. Враховуючи те, що дефіцит вітаміну В₁₂, як правило, рідко зумовлений аліментарними факторами, тому поряд з лікуванням анемії необхідно провести пошук причин цього патологічного стану (хвороба Крона, целиакія, спадкові порушення всмоктування та/або транспортування вітаміну В₁₂ та ін.) [37].

Отже, в основі патогенезу ЗДА, В₁₂ДА і ФДА лежать різні механізми, що необхідно визначити на ранніх етапах захворювання під час профілактики і лікування цих видів анемії.

Не залежно від причини виникнення анемії у хворих всіх досліджуваних груп виявлено зниження концентрації гемоглобіну. При чому вміст гемоглобіну знаходився на рівня 70-90 г/л, що вказувало на розвиток анемії середнього ступеня тяжкості (рис.3.2).

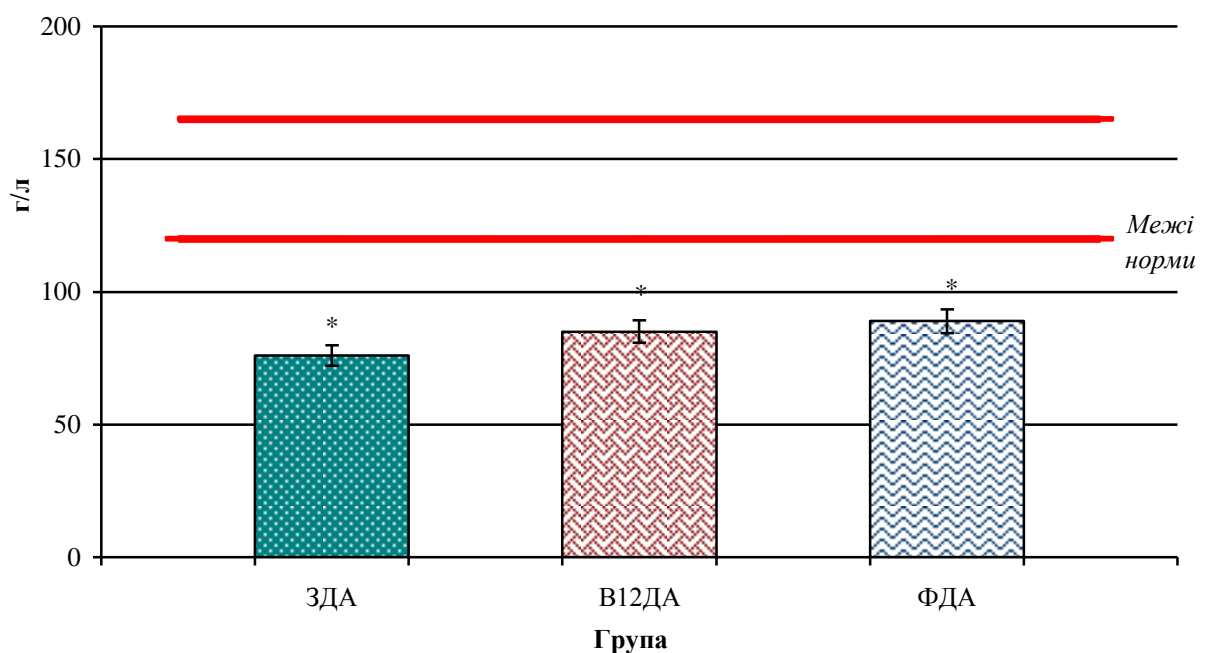


Рис.3.2. Вміст гемоглобіну в крові хворих за умов розвитку різних видів анемії

Зниження концентрації гемоглобіну в крові може призвести до кисневого голодування тканин в організмі хворого. Це пов'язано з тим, що

низький рівень гемоглобіну в крові зменшує оксигенацію тканин (особливо чутливих тканин серця і мозку) [48].

Отже, патогенетичний варіант анемії не впливає на ступень важкості захворювання. Проте, слід зауважити, що, ймовірно, ступінь тяжкості залежить від рівня заліза при ЗДА (при концентрації заліза $4 \pm 0,347$ нмоль/л виявлена анемія середнього ступеня тяжкості); від вмісту вітаміну B_{12} при B_{12} ДА (при концентрації вітаміну B_{12} рівного $164 \pm 27,5$ пг/мл виявлена анемія середнього ступеня тяжкості); від вмісту фолієвої кислоти (при концентрації фолієвої кислоти $1,5 \pm 0,123$ нмоль/л виявлена анемія середнього ступеня тяжкості). Рання діагностика патогенетичного варіанта анемії може проводитися на основі комплексу рутинних лабораторних досліджень, які є обов'язковими щодо диференційного діагнозу при анемії.

Визначення кількості еритроцитів показало їх зниження при всіх варіантах анемії. Так, при ЗДА рівень еритроцитів знижувався у 1,3 рази, при B_{12} ДА – у 2 рази при ФДА – у 1,6 рази порівняно із показником нижньої межі норми (рис.3.3).

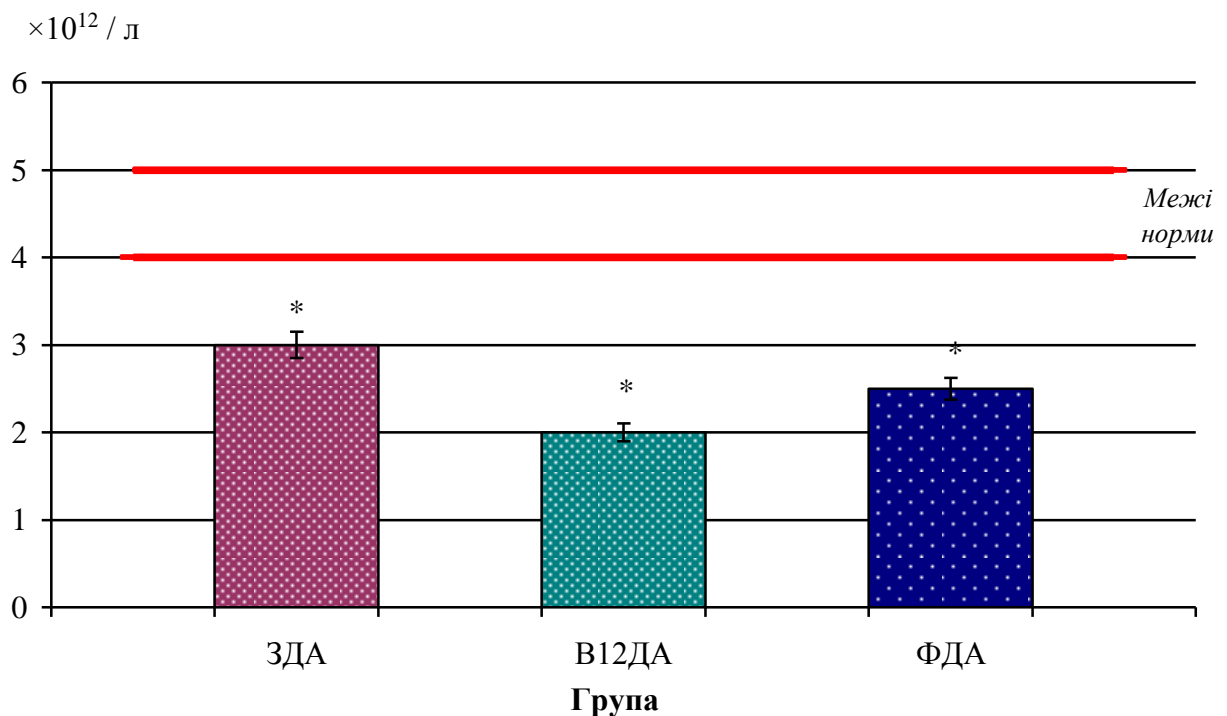


Рис.3.3. Кількість еритроцитів у крові хворих за умов розвитку різних видів анемії

Як видно з результатів значніше зниження еритроцитів спостерігається при вітамінодефіцитних анеміях, що вказує на необхідність виконання лікувальних заходів. Якщо зміни кількості еритроцитів були односпрямованими при всіх видах анемії, то показник об'єму еритроцитів відрізнявся при досліджуваних анеміях.

Результати проведених досліджень показали, що при ЗДА спостерігався незначно знижений об'єм еритроцитів (рис.3.4А), при цьому знижувалася і концентрація гемоглобіну в еритроциті (рис.3.4Б).

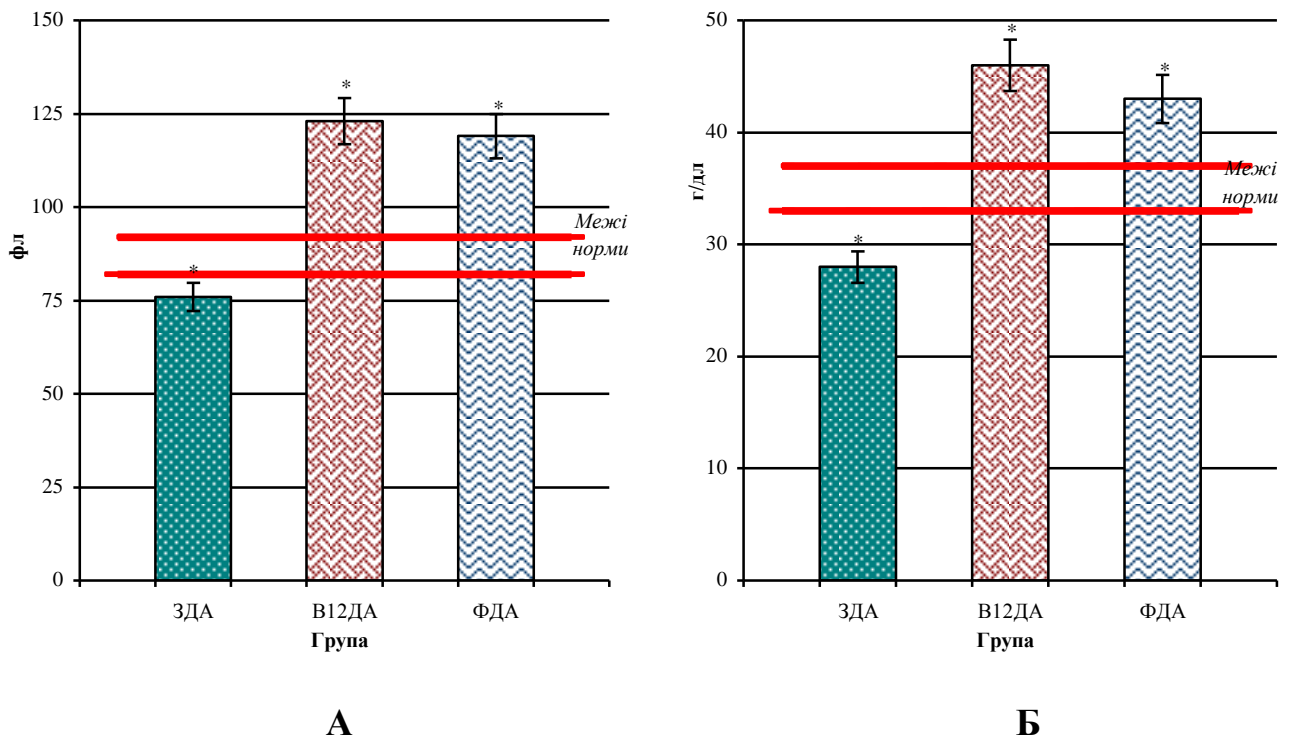


Рис.3.4. Об'єм еритроцитів у крові (А) та вміст гемоглобіну в еритроциті (Б) при різних видах анемії

При вітамінодефіцитних анеміях виявлялося підвищення середнього об'єму еритроцитів (рис.3.4А) та вмісту гемоглобіну в еритроциті (рис.3.4Б) порівняно з показником верхньої межі норми, що відрізняло вітамінодефіцитні анемії від ЗДА. Підвищення концентрації гемоглобіну в еритроциті, очевидно, пов'язано саме зі збільшенням їхніх розмірів.

З результатів випливає, що В₁₂- та фолієводефіцитні анемії можна віднести до групи гіперхромно-макроцитарних анемії. За даними літератури

серед цих анемій 95% складають саме вітамінодефіцитні анемії – В₁₂ДА і ФДА [7]. Імовірно, внаслідок дефіциту вітаміну В₁₂ та фолієвої кислоти зменшується утворення фолатів, які необхідні для синтезу пуринів і піримідинів [36]. У свою чергу порушення утворення тимідину призводить до уповільнення синтезу ДНК та поділу клітин. Внаслідок порушення процесів поділу клітин кісткового мозку (мегалобластний тип кровотворення) у крові можуть з'являтися еритроцити суттєво збільшених розмірів (макроцити), що і спостерігається при вітамінодефіцитних анеміях. Окрім того, для цих видів анемій властивий анізоцитоз, пойкилоцитоз, шизоцитоз, можуть зустрічатися еритроцити із залишками ядер (кільця Кебота, тільця Жоллі), базофільною пунктацією (залишки РНК). Порушення синтезу ДНК при дефіциті вітаміну В₁₂ може відбуватися у всіх ядровмісних клітинах, але щонайменше цей дефіцит позначиться насамперед на гемопоезі, оскільки гемопоетичні клітини мають найвищу проліферативну активність [49].

Отже, зміни розмірів еритроцитів (анізоцитоз) і концентрації гемоглобіну в еритроциті лежать в основі ознак різних форм анемій.

Нашими дослідженнями встановлено, що якщо рівень заліза у сироватці крові знаходиться в межах норми або підвищений, то це може вказувати на анемію, пов'язану з порушенням синтезу порфіринів, оскільки знижується рівень гемоглобіну та кількість еритроцитів при всіх видах анемій. Тому, на наступному етапі дослідження, який потрібний для диференційної діагностики було визначення інших показників. Окрім того виявлення зниженого рівня заліза у сироватці крові при ЗДА або підвищення при В₁₂ДА однозначно вказує на необхідність визначення інших показників обміну заліза – ЗЗЗК та рівня трансферину.

ЗЗЗК відображає резервну «незаповнену» залізом ємність транспортного білка – трансферину. Результати проведених досліджень показали, що при ЗДА спостерігалось підвищення ЗЗЗК порівняно з показниками верхньої межі норми (рис.3.5), що може вказувати на

порушення певних етапів обміну заліза. Водночас, при вітамінодефіцитних анеміях виявлено незначне зниження показника ЗЗЗК порівняно зі значеннями нижньої межі норми (рис.3.5), що вказує на інший патогенетичний механізм розвитку В₁₂ДА і ФДА.

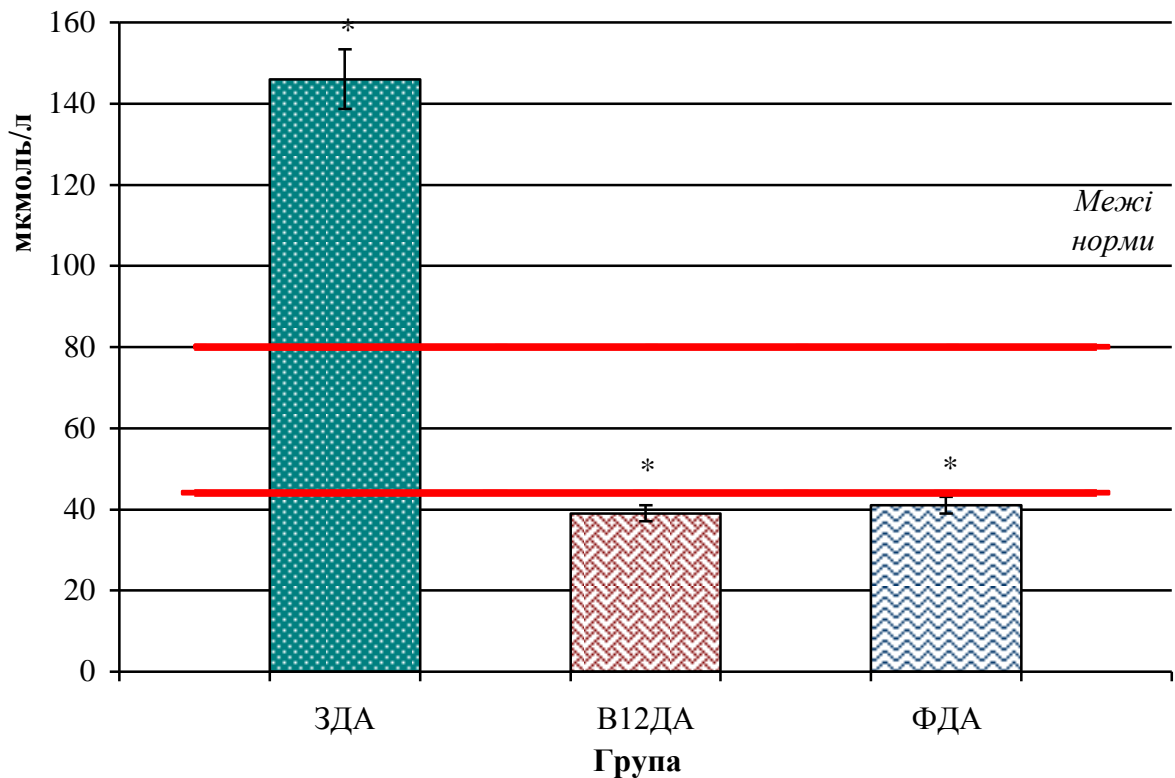


Рис.3.5. Загальна залізовв'язуюча здатність крові за умов розвитку в організмі різних видів анемій

Поряд із підвищенням ЗЗЗК у сироватці крові хворих ЗДА підвищується концентрація трансферину у 1,8 рази порівняно із показником верхньої межі норми (рис.3.6А). Трансферин – протеїн, що транспортує залізо в організмі, тому зміни його концентрації в крові мають діагностичне значення [15]. Так, збільшення рівня трансферину при ЗДА може бути пов'язане з підвищенням його синтезом, що може відбуватися як компенсаторна реакція організму людини у відповідь на тканинний дефіцит заліза. Іншим інформативним показником оцінки метаболізму заліза є коефіцієнт насичення трансферину залізом, який розраховується математичним методом.

Аналіз визначення коефіцієнту насичення трансферину залізом показав його зниження при ЗДА у 1,3 рази порівняно з показником норми (рис.3.6Б), що вказує на порушення транспорту заліза в організмі за умов ЗДА.

Отже, зниження відсотка насичення трансферину залізом (наслідок зниження концентрації заліза та зростання концентрації трансферину) вказує на анемію, обумовлену нестачею надходження заліза. Зниження насичення трансферину залізом вказує на порушення його доставки заліза до еритроцитарного ростка кісткового мозку, що і відображається у зниженні рівня гемоглобіну та кількості еритроцитів.

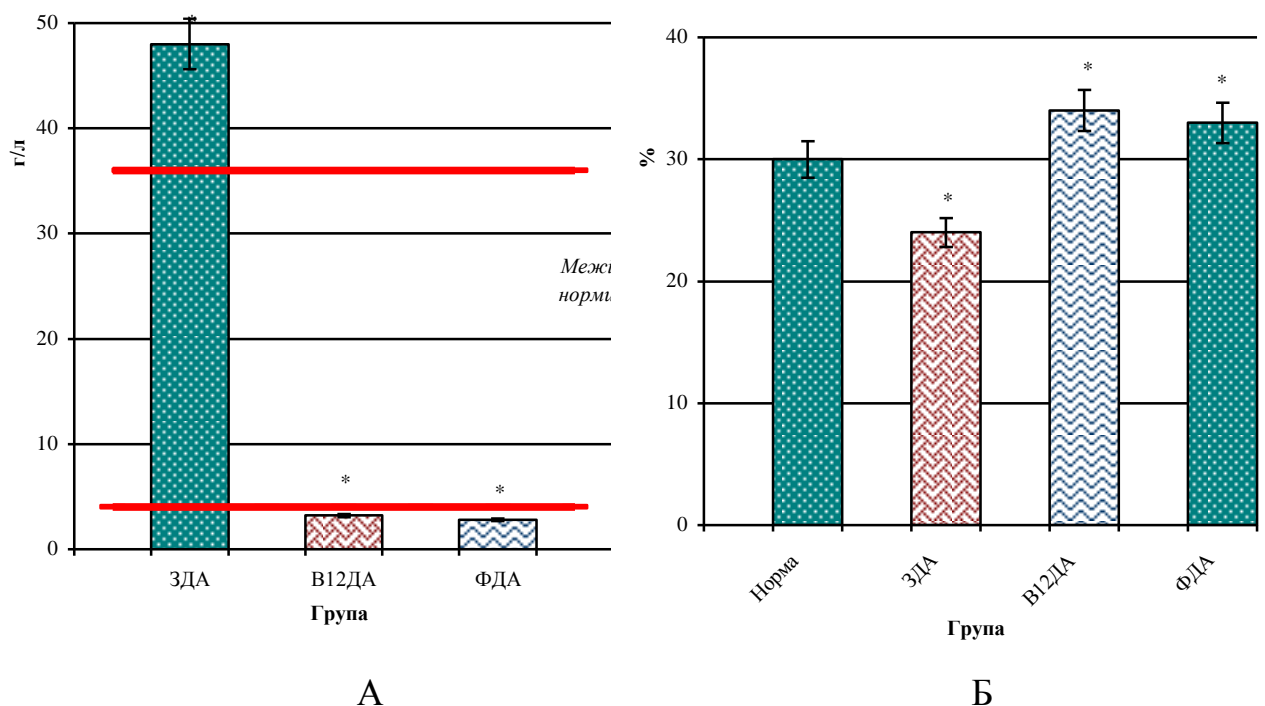


Рис.3.6. Вміст трансферину в сироватці крові (А) та коефіцієнт насичення трансферину залізом (Б) за умов розвитку в організмі різних видів анемій

За умов вітамінодефіцитних анемій виявлено зниження концентрації трансферину в сироватці крові у 1,3 рази і в 1,2 рази при В₁₂ДА і ФДА, відповідно (рис.3.6А). Водночас виявлено незначне підвищення насичення трансферину залізом при В₁₂ДА і ФДА (рис.3.6Б), що може мати негативні наслідки для організму. Так, при збільшенні відсотка насичення трансферину

залізом у крові може з'являється низькомолекулярне залізо, яке відкладатиметься у підшлунковій залозі та печінці, викликаючи їхнє пошкодження [31].

Якщо вміст залізов'язуючого протеїну трансферину відображає стан транспорту заліза по організму, а коефіцієнт насичення трансферину залізом – показник надходження заліза в тканини організму, то сироватковий феритин є показником запасів заліза в організмі [30].

Феритин – основний білковий комплекс, який виконує функцію депо заліза та відіграє важливу роль у гомеостазі останнього. За відсутності запалення концентрація феритину у плазмі чи сироватці крові позитивно корелює з рівнем загальних запасів заліза в організмі [32]. Результати проведених досліджень показали, що при ЗДА в сироватці крові знижувався вміст феритину в 2,1 рази порівняно з нижньою межею норми (рис.3.7). Низька концентрація феритину в сироватці крові при ЗДА свідчить про виснаження запасів заліза, але не обов'язково може відображати ступінь цього виснаження [34].

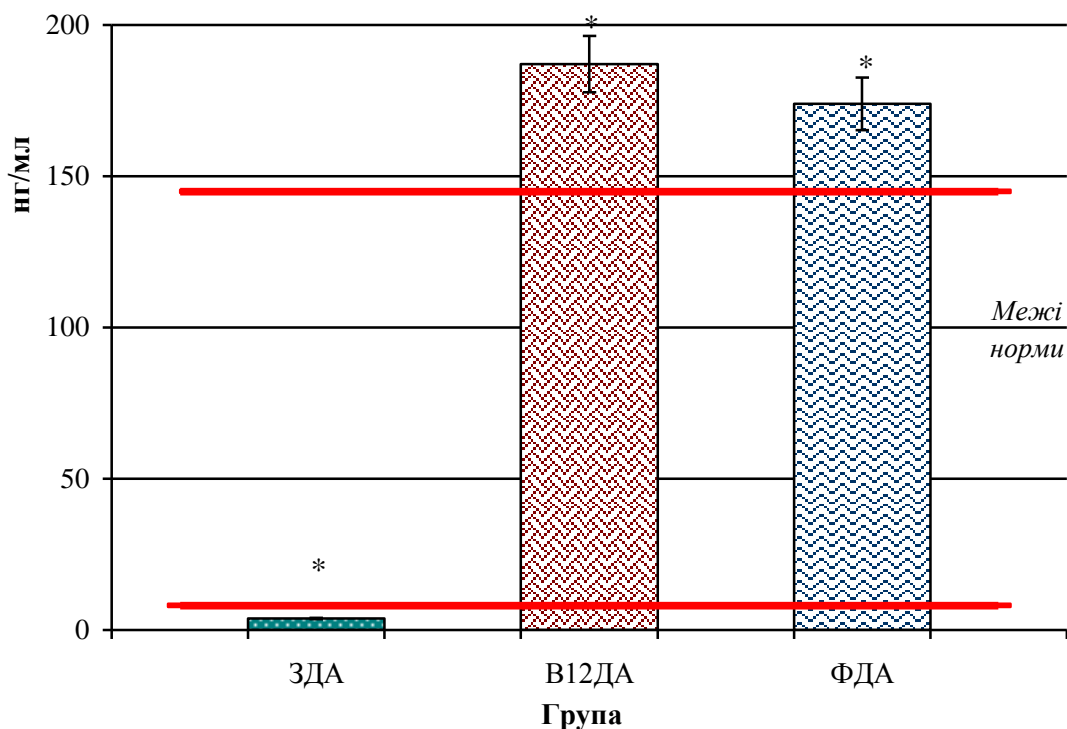


Рис.3.7. Вміст феритину в сироватці крові за умов розвитку в організмі різних видів анемії

Дослідження концентрації феритину в сироватці крові при V_{12} ДА і ФДА показало його підвищення за умов цих двох видів анемії. Так, вміст феритину підвищувався у 1,3 рази при V_{12} ДА та у 1,2 рази при ФДА порівняно з показником верхньої межі норми (рис.3.7).

Слід наголосити, що поряд з феритином аналізували результати С-реактивного білка (СРБ), оскільки феритин, як і СРБ є білком гострої фази запалення [36]. Тому, рівень феритину оцінювали лише у тих випадках, коли значення СРБ знаходилося в межах норми. Аналіз результатів показав, що високий рівень феритину при вітамінодефіцитних анеміях був на фоні нормальних значень СРБ, що не могло спричинити помилковий висновок про відсутність залізодефіцитного стану.

Феритин – внутрішньоклітинний білок, що забезпечує зберігання заліза у тканинах, тому концентрація феритину в крові відображає запаси заліза в організмі. Трансферин – білок плазми, що забезпечує транспорт заліза [30]. Як видно з результатів дослідження, концентрація трансферину і феритину в крові знаходяться у зворотній пропорційній залежності: чим вищий рівень феритину, тим нижчий рівень трансферину. Причому напрямок цих змін різний при різних формах анемії. Так, при ЗДА знижується інтенсивність використання заліза кістковим мозком для еритропоезу, що призводить до підвищення гіпохромних еритроцитів, зі зниженим об'ємом еритроцитів та вмістом гемоглобіну в ретикулоцитах. На тлі зниження рівня заліза і феритину в сироватці крові підвищується вміст трансферину, проте його насичення залізом знижується.

При V_{12} ДА і ФДА підвищується рівень заліза та феритину з одночасним зниженням концентрації трансферину, проте підвищується його насичення залізом. Виявлені зміни вказують на ризик навантаження органів залізом. Такі зміни є причиною порушення кровотворення, яке спричинене дефіцитом вітаміну V_{12} (кобаламіну, ціанокобаламіну) [7]. У крові знижується кількість еритроцитів та падає рівень гемоглобіну.

Отже, для ЗДА типовими ознаками є: гіпохромія та мікроцитоз еритроцитів, що є причиною недостатнього вмісту заліза в організмі обумовленими різними факторами, в тому числі аліментарними. Якщо ж ЗДА має постгеморагічний генезис, гіпохромія та мікроцитоз еритроцитів можуть супроводжуватися ретикулоцитозом. Водночас для анемій, які зумовлені нестачею в організмі як вітаміну В₁₂, так і фолієвої кислоти характерні гіперхромія та макроцитоз еритроцитів. Також може спостерігатися ретикулоцитопенія. При ЗДА знижується рівень заліза, феритину, насичення трансферину залізом, проте підвищується концентрація трансферину. При В₁₂ДА і ФДА підвищується рівень заліза, феритину, та насичення трансферину залізом, проте знижується вміст трансферину в сироватці крові.

ВИСНОВКИ

1. Зниження кількості еритроцитів та концентрації гемоглобіну до рівня 70-90 г/л вказувало на розвиток анемії середнього ступеня тяжкості та не залежить від виду анемії.

2. Розвиток в організмі ЗДА супроводжується зниженням об'єму еритроцитів та вмісту гемоглобіну в еритроциті при цьому спостерігається підвищення ЗЗЗК. Водночас для анемії, які зумовлені нестачею в організмі як вітаміну В₁₂, так і фолієвої кислоти характерні макроцитоз еритроцитів, гіперхромія і зниження ЗЗЗК.

3. Зниження вмісту заліза і феритину в сироватці крові відбувається на тлі підвищення вмісту трансферину, проте його насичення залізом знижується при ЗДА. При В₁₂ДА і ФДА виявлено підвищення рівня заліза, феритину та насичення трансферину залізом з одночасним зниженням концентрації трансферину в сироватці крові.