

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФЕРРОКИНЕТИКИ И АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА ПРИ ДЕФИЦИТЕ ЖЕЛЕЗА

Пашкова О.Л., Кабаева Е.Н., Гармаза Ю.М.

Пашкова О.Л.

*Старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии антител и цитокинов государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»,
г. Минск, Республика Беларусь
pashkova@blood.by*

Кабаева Е.Н.

*Кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической гематологии и трансфузиологии государственного УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь
kate_kabaeva@mail.ru*

Гармаза Ю.М.

*кандидат биологических наук, доцент,
Ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии антител и цитокинов государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»,
г. Минск, Республика Беларусь
garmaza@yandex.com*

Понимание патогенетических механизмов развития анемий различного генеза является краеугольным камнем для разработки эффективных стратегий диагностики и лечения. Однако, традиционные методы оценки часто не в полной мере отражают сложность происходящих в организме процессов. Представленные в данной статье результаты комплексного исследования основных биомаркеров феррокинетики и антиоксидантного статуса впервые демонстрируют значимость именно сочетанного анализа данных показателей в углубленном понимании патогенетических механизмов анемического процесса. Выявленная взаимосвязь между феррокинетикой, антиоксидантным статусом и степенью повреждения тканей подтверждает необходимость внедрения подобных комплексных оценок для более точного определения генеза и тяжести анемий, что, в свою очередь, критически важно для персонализированной терапии.

Ключевые слова: *растворимый рецептор трансферрина; ферритин; общая антиоксидантная активность; метаболизм железа; железodefицитная анемия; анемия хронических заболеваний; анемия неуточненная*

A STUDY OF FERROKINETICS AND ANTIOXIDANT STATUS INDICATORS IN IRON DEFICIENCY

Pashkova O.L.

*Senior Researcher of the Laboratory of Biotechnology of Antibodies and Cytokines of the State Institution «Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies», Minsk, Republic of Belarus
pashkova@blood.by*

Cabaeva E.N.

*Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Clinical Hematology and Transfusiology of the State Educational Institution «Belarusian State Medical University», Minsk, Republic of Belarus
kate_kabaeva@mail.ru*

Harmaza Y.M.

*Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Biotechnology of Antibodies and Cytokines of the State Institution «Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies», Minsk, Republic of Belarus
garmaza@yandex.com*

Understanding the pathogenetic mechanisms underlying the development of anemias of various origins is a cornerstone for developing effective diagnostic and treatment strategies. However, traditional assessment methods often fail to fully capture the complexity of the processes occurring in the body. The results of a comprehensive study of key biomarkers of ferrokinetics and antioxidant status presented in this article demonstrate for the first time the importance of a combined analysis of these parameters for a deeper understanding of the pathogenetic mechanisms of anemia. The identified relationship between ferrokinetics, antioxidant status, and the degree of tissue damage confirms the need for such comprehensive assessments to more accurately determine the genesis and severity of anemia, which, in turn, is critical for personalized therapy.

Key words: *soluble transferrin receptor; ferritin; total antioxidant activity; iron metabolism; iron deficiency anemia; anemia of chronic diseases; anemia of unspecified origin.*

Актуальность. Дефицит железа – это не просто низкий гемоглобин, это системный сбой метаболизма, который лишает человека энергии на клеточном уровне. Это “тихий” процесс, проходящий через три стадии развития, постепенно подрывая работу всех систем организма. Постановка диагноза анемия также может быть осложнена наличием у пациентов сопутствующих патологий, таких как воспалительные и аутоиммунные заболевания, злокачественные новообразования или инфекции (острые или хронические) [1]. И довольно часто анемия, возникающая в этих условиях, может являться как причиной, так и осложнением основного заболевания, создавая “порочный круг”.

Биохимическим тестом первого уровня для диагностики анемии является определение концентрации ферритина в сыворотке крови, который отражает запасы железа в организме. Дополнительным биомаркером, на который не влияет одновременное наличие хронического заболевания и воспаления и, следовательно, способным идентифицировать анемию, является растворимый рецептор трансферрина (sTfR), который, в первую очередь, экспрессируется на поверхности клеток (в 80 % случаев на эритроцитах), нуждающихся в железе [2,3].

При любом виде анемии страдает основная кислородтранспортная функция эритроцитов, в результате чего нарушаются окислительные процессы в организме и развивается гипоксия. Гипоксия – это типовой патологический процесс, характеризующийся кислородной недостаточностью в тканях с развитием патологических и защитно-компенсаторных реакций [4]. Гипоксия и воспаление являются взаимосвязанными патологическими процессами. Активный воспалительный процесс потребляет большое количество кислорода. Анемия любого генеза вызывает тканевую гипоксию, что в свою очередь запускает адаптивные механизмы [5]. Эритроциты, играют жизненно важную роль в адаптации к гипоксии; они могут поглощать кислород в легких и транспортировать его в ткани с низким содержанием кислорода, тем самым поддерживая функции тканей и выживаемость [6].

Целью нашего исследования явилось проведение комплексного исследования показателей феррокинетики и антиоксидантного статуса и изучение взаимосвязи между дефицитом железа и изменениями общей антиоксидантной активности плазмы крови у пациентов с анемиями различной этиологии для оценки адаптационного резерва организма.

Материалы и методы исследования. В работе использовалась периферическая кровь практически здоровых доноров (n=15), полученная в ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» (группа сравнения). Периферическая кровь пациентов с диагнозом (группы исследования): 1) анемия хронических заболеваний (АХЗ, D63) (n=15); 2) железодефицитная анемия (ЖДА, D50) (n=15); 3) анемия неуточненная (АН, D64.9) (n=15) была предоставлена отделениями гематологии №1, 2 и 4 ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии».

Предмет исследования: общая антиоксидантная активность плазмы крови (ОАА), концентрация ферритина, растворимого рецептора трансферрина (sTfR), ферритиновый индекс (sTfR/log ферритина).

Методы исследования:

- оценка концентрации ферритина в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью коммерческого набора реагентов фирмы «Вектор-Бест», РФ. Измерение концентрации sTfR – с помощью ИФА-набора собственного производства «Растворимый рецептор трансферрина – ИФА» (РНПЦ ТМБ, РБ);

- определение общей антиоксидантной активности плазмы периферической крови проводили с помощью метода «тролокс-эквивалент антиоксидантной активности», основанный на модельной системе «миоглобин-пероксид водорода-

(2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфо кислоты) диаммониевая соль)-тролокс».

Измерение оптической плотности проводили на планшеточном спектрофотометре Sunrise Micro Plate Reader Standart («ТЕСАН», Швейцария).

Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,001$ в программе STATISTICA 8.0.

Результаты и обсуждение. В таблице 1 представлены результаты определения маркеров феррокинетики и гипоксии в периферической крови доноров и пациентов с анемиями различного генеза.

Показано, что при ЖДА наблюдается достоверное снижение уровня ферритина – белка, отражающего запасы железа в депо (гепатоциты, макрофаги, сидеробласты). Уровень ферритина падает первым на стадии латентного дефицита железа еще до снижения гемоглобина. При этом минимальные значения концентрации данного белка в сыворотке крови лиц с железодефицитной анемией находились в диапазоне 5-6 нг/мл. Оценка концентрации sTfR в исследуемой группе выявила, что в плазме крови пациентов с ЖДА растет, поскольку в условиях, когда уровень железа в клетке падает, она начинает синтезировать и экспрессировать на своей поверхности больше рецепторов, чтобы «поймать» больше молекул Fe^{3+} , отражая тем самым степень «клеточного голода». Расчет ферритинового индекса по этим двум показателям позволяет оценить содержание железа в организме в широком диапазоне нормальных и истощенных запасов железа. В нашем случае в группу пациентов с ЖДА включены лица, у которых индекс sTfR/log ферритина был выше 2,5.

При АХЗ концентрация ферритина осталась на уровне нормы, поскольку это белок острой фазы воспаления и не всегда отражает реальный дефицит железа, которое остается запертым в клетке и недоступным для синтеза гема. Выход Fe из депо блокирует выработка под действием воспалительных цитокинов (особенно интерлейкина-6) гепсидина. Железо остается внутри клеток в виде ферритина, его уровень растет в крови, создавая ложное впечатление избытка, в то время, когда эритроциты «голодают». sTfR также не изменился, остался в норме, поскольку синтез рецепторов резко не увеличивается либо тормозится самим воспалительным процессом. Эти результаты могут опосредованно свидетельствовать о наличии странной зависимости экспрессии TfR от содержания накопленного железа в теле человека: уровень sTfR резко возрастет только в тех случаях, когда резервы микроэлемента не кончатся полностью. Расчет sTfR/log ферритина индекса (низкий, < 1) подтвердил диагноз АХЗ.

При изучении содержания ферритина в сыворотке крови лиц с АН было установлено, что он находился в диапазоне 290,02-862,40 нг/мл. Стоит отметить, что у 13 из 15 пациентов, находящихся в выборке для исследования, наблюдалась умеренная гиперферритинемия. Оценка концентрации sTfR в плазме крови пациентов с неуточненной формой анемии установила значения в пределах нормы. Расчет ферритинового индекса составил в среднем 0,531 [1,561;0,294], что ниже физиологических значений и может свидетельствовать об избытке доступного железа.

Таблица 1

Показатели феррокинетики и гипоксии в исследуемых группах

	Гемоглобин, г/л	Гематокрит, %	Ферритин, нг/мл	sTfR, мг/л	Феррити-но- вый индекс (sTfR/log ferritin)	ОАА, мМ/л
пациенты с ЖДА (n=15)	80,45±9,05***	24,14±2,72***	24,22±6,74***	3,55±0,77 *	2,92±1,67***	0,18±0,09***
пациенты с АХЗ (n=16)	84,17±3,73***	23,45±6,83***	127,46±96,64***	1,49±0,53	0,79±0,31	0,58±0,13*
пациенты с АН (n=15)	84,31±1,93***	28,10±0,79***	651,39±49,44***	1,45±0,21	0,53±0,09*	0,55±0,06*
доноры (n=15)	152,87±1,66	45,72±0,48	45,86±13,13	1,82±0,19	0,80±0,09	0,34±0,10
Норма	мужчины 130-170 женщины 120-150	мужчины 39-50 женщины 35-45	мужчины 20-350 женщины 10-150	0,76-1,76	0,8-2,2	-

Примечание: 1. Значения показателей приводятся как $X_{\text{ср.}} \pm SD$;

2. Критический уровень статистической значимости между показателями у доноров и пациентов с анемией неутонченной по критерию U-критерия Манна-Уитни: * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$.

Известно, что живые организмы имеют развитую антиоксидантную сеть, которая противостоит действию активных форм кислорода, при этом плазма крови является сложной химической системой в отношении антиоксидантной активности. Неферментативные антиоксиданты, такие как альбумин, α -токоферол, аскорбиновая кислота, мочевая кислота, глутатион, билирубин и флавоноиды формируют сеть плазменных антиоксидантов, изучение которых необходимо для оценки антиоксидантного статуса организма человека *in vivo* [6], а также может быть важным показателем при мониторинге клинического статуса пациента и являться полезной мерой для решения вопроса о необходимости применения антиоксидантных препаратов. По этой причине в последнее десятилетие предложены самые разнообразные методы интегральной оценки общей антиоксидантной активности биологических жидкостей, но так как наиболее удачным считается метод «тролокс-эквивалент антиоксидантной активности» (ТЭАА), основанный на модельной системе «метмиоглобин– H_2O_2 –АБТС–тролокс» [6], в данной работе нами проведена оценка ОАА плазмы крови у обследованных групп доноров и пациентов. Как видно из таблицы 1, у пациентов АХЗ наблюдается достоверное ($p < 0,001$) увеличение ОАА плазмы крови в среднем на 50-80 %, которое составило в ТЭАА $0,58 \pm 0,13$ мМ/л относительно $0,34 \pm 0,10$ мМ/л в группе доноров. Данный факт можно объяснить адаптацией организма к хроническому воспалению: при системном воспалительном процессе повышается концентрация определенных белков и молекул (церулоплазмин, билирубин, мочевая кислота), обладающих антиоксидантными свойствами, а также гиперферритинемией, при которой снижается количество «свободного» железа в плазме, и тем самым уменьшается интенсивность перекисного окисления липидов, что может отражаться как рост ОАА. Происходит развитие компенсаторной реакции организма на хронический стресс. При этом, у пациентов с ЖДА наблюдается достоверное

снижение ОАА плазмы крови в среднем на 80-100 %, которое составило в ТЭАА $0,18 \pm 0,09$ мМ/л относительно группы доноров. Дефицит железа приводит к дефициту антиоксидантных ферментов (например, каталазы), активно расходуются низкомолекулярные антиоксиданты, что отражается на суммарном показателе ОАА. У пациентов с АН наблюдается также достоверное увеличение ОАА плазмы крови в среднем в 1,55 раза, которое составило в ТЭАА $0,55 \pm 0,06$ мМ/л относительно группы доноров ($p=0,057$), что показывает общее состояние компенсации при скрытом воспалительном процессе. Данный показатель позволяет перевести анемию из неуточненной в анемию хронических заболеваний.

Проведенный корреляционный анализ между параметрами обмена железа и редокс-баланса плазмы крови у доноров и пациентов с АХЗ выявил статистически достоверную обратную взаимосвязь между концентрацией ферритина и уровнем ОАА в плазме крови доноров ($R_s = -0,56$, $p=0,048$), в то время как в группе пациентов была выявлена положительная статистически достоверная корреляция ($R_s = 0,66$, $p=0,038$). Объяснением этого результата может явиться тот факт, что, несмотря на то, что уровень ферритина в обеих группах находится в пределах нормальных значений, пациенты с анемическими состояниями характеризуются сниженной концентрацией гемоглобина в эритроцитах и измененными параметрами МСНС (средняя концентрация гемоглобина в одном эритроците) и МСV (средний объем эритроцита), что имеет непосредственную связь с нарушенной функцией транспорта кислорода и активацией окислительных процессов в клетке [4]. А повышение ОАА плазмы в группе пациентов с АХЗ – это лишь результат адаптативных реакций организма на развивающийся окислительный стресс, который помогает поддержать баланс оксиданты–прооксиданты, а также рН крови.

В свою очередь, корреляционный анализ между концентрацией растворимого рецептора трансферрина в плазме крови и общей антиоксидантной активностью, как в случае группы доноров ($R_s = -0,7$, $p=0,012$), так и в случае группы пациентов с АХЗ ($R_s = -0,84$, $p=0,00064$) выявил достоверную обратную корреляцию. Корреляционный анализ между концентрациями ферритина и низкомолекулярных антиоксидантов в плазме пациентов с ЖДА ($R_s = 0,348$, $p=0,243$), так и между концентрациями растворимого рецептора трансферрина и низкомолекулярными антиоксидантами ($R_s = -0,104$, $p=0,700$) не выявил статистически значимых корреляций. Эти результаты могут опосредованно подтверждать тот факт, что истинный дефицит железа влияет на синтез не только классических Fe^{2+} -зависимых белков (ферритин и трансферрин), но и на синтез других Fe^{2+} -содержащих белков, таких как цитохромы, миоглобин, каталаза и пероксидаза [5].

Проведенный корреляционный анализ как между концентрациями ферритина и низкомолекулярных антиоксидантов в плазме крови пациентов с анемией неуточненной, так и между концентрациями растворимого рецептора трансферрина и низкомолекулярными антиоксидантами не выявил статистически значимых корреляций.

Заключение. Таким образом, в ходе выполнения исследования были получены следующие фундаментальные результаты:

– полученный в ходе исследования комплекс изменений концентрации ферритина и растворимого рецептора трансферрина, ферритинового индекса и ОАА при железодефицитной анемии является классическим патогенетическим профилем истинного дефицита железа и свидетельствует о глубоком системном нарушении гомеостаза Fe. Обнаруженное 2-кратное снижение содержания низкомолекулярных антиоксидантов в плазме крови пациентов с ЖДА является следствием смещения баланса «окислитель-восстановитель» в пользу первого, что свидетельствует о несостоятельности защитных систем организма и о вкладе свободнорадикальных процессов в этиопатогенез ЖДА.

– оценка концентрации ферритина и sTfR в крови пациентов с АХЗ выявила, что для данной группы исследования характерна функциональная блокада железа, при которой сохранение нормальных показателей обмена железа сочетается с активацией системной антиоксидантной защиты.

– оценка комплекса исследуемых показателей в крови пациентов с анемией неуточненной позволяет уточнить диагноз анемии и перевести из ранга «неуточненной» в АХЗ или ЖДА в зависимости от значения ферритинового индекса.

– установлено, что сочетанное изучение ферритина, sTfR, sTfR/log ферритина индекса и ОАА позволяет сформировать уникальный метаболический профиль для каждого типа анемии, что важно для дифференциальной диагностики и корректировки проводимой терапии.

Список литературы

1. Haas, J.D. Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship / J.D. Haas, T. Brownlie // *J. Nutr.* – 2001. – Vol. 131, № 2S-2. – P. 676S-688S.
2. Coyer, S.M. Anemia: diagnosis and management / S.M. Coyer // *J. Pediatr. Health Care.* – 2005. – Vol. 19, № 6. – P. 380-385.
3. The Role of iron regulation in immunometabolism and immune-related disease / S.J. Cronin [et al.] // *Front. Mol. Biosci.* – 2019. – Vol. 6. – P. 116.
4. Red blood cell function and dysfunction: redox regulation, nitric oxide metabolism: anemia / V. Kuhn [et al.] // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2017. – Vol. 26, №13. – P. 718-742.
5. Hypoxic storage of red blood cells improves metabolism and post-transfusion recovery / A. D'Alessandro [et al.] // *Transfusion.* – 2020. – Vol. 9999. – P.1-13.
6. Lovasova, E. Total antioxidant status – a possible marker of environmental influences on animal organisms / E. Lovasova, E. Sesztakova // *Slovak J. Anim. Sci.* – 2009. – Vol. 42, Suppl. 1. – P. 42-45.
7. Anaemia and antioxidant defence of the red blood cells / A. Kumerova [et al.] // *Mater. Med. Pol.* – 1998. – Vol. 30. – P. 12-15.