

Ю.А. Прохорова<sup>1</sup>, Е.Е. Зуева<sup>1, 2</sup>, Н.Е. Соколова<sup>3</sup>, Г.Н. Салогуб<sup>1</sup>, В.И. Голубева<sup>1</sup><sup>1</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Российская Федерация<sup>2</sup> Ариэльский университет, Израиль<sup>3</sup> Детская городская больница № 1, Санкт-Петербург, Российская Федерация

# Выявление и верификация наследственного сфероцитоза средствами лабораторной диагностики

## Контактная информация:

Прохорова Юлия Александровна, биолог лаборатории клинической иммунологии и молекулярной диагностики отделения лабораторной диагностики Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова

Адрес: 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8, тел.: +7 (812) 234-34-07, e-mail: j.a.prohorova@gmail.com

Статья поступила: 26.04.2014 г., принята к печати: 21.07.2014 г.

**Введение.** Дифференциальная диагностика наследственного сфероцитоза (НС) до последнего времени во многом опирается на использование нестандартизированных лабораторных методик, не позволяющих проводить контроль качества исследования. **Цель исследования:** разработка метода верификации наследственного сфероцитоза.

**Пациенты и методы.** В исследование включены образцы крови 13 взрослых и 42 детей с верифицированным диагнозом НС и 311 взрослых и 42 детей с доказанным отсутствием гематологических нарушений. Диагноз НС в исследовании подтвержден методом проточной цитометрии (тест на связывание эозин-5 малеимида), методом оценки осмотической резистентности эритроцитов по Дейчи и методом электрофореза белков мембран эритроцитов в полиакриламидном геле по Лэммли. Проведена оценка диагностической ценности гематологических параметров для выявления степени расстройства эритропоэза при НС на стадии созревания ретикулоцитов и оценка значимости расчетных показателей RET/IRF, MCV-MSCV для первичной диагностики НС. **Результаты.** Выявлены статистически значимые различия между группами контроля и пациентами с НС по величине расчетного показателя MCV-MSCV. Для стандартизации результатов разработан расчетный коэффициент  $S$  для 6 контрольных образцов (средняя интенсивность флуоресценции эозин-5 малеимида исследуемого образца/ $X_{mean}$  средней интенсивности флуоресценции эозин-5 малеимида), установлена точка отсечки  $S < 0,84$  для положительных случаев НС ( $p = 0,0001$ ; специфичность теста 98,2%, чувствительность 99,2%, площадь под ROC-кривой 0,99). **Выводы.** В качестве скринингового теста для выявления НС может быть рекомендована оценка расчетных ретикулоцитарных показателей MCV-MSCV и RET/IRF с использованием данных автоматизированного гематологического анализатора. В качестве теста верификации диагноза НС наиболее информативен высокоспецифичный и чувствительный метод проточной цитометрии с применением красителя эозин-5 малеимид. Для уточнения молекулярного дефекта, лежащего в основе исследуемого материала, может быть рекомендован электрофорез мембранных белков эритроцитов.

**Ключевые слова:** наследственный сфероцитоз, мембранопатия, цитоскелет эритроцитов, средняя интенсивность флуоресценции, эозин-5 малеимид, проточная цитометрия, автоматизированный гематологический анализатор, параметры ретикулоцитов, скрининг наследственного сфероцитоза.

(Педиатрическая фармакология. 2014; 11 (4): 67–74)

Y.A. Prokhorova<sup>1</sup>, E.E. Zuyeva<sup>1, 2</sup>, N.E. Sokolova<sup>3</sup>, G.N. Salogub<sup>1</sup>, V.I. Golubeva<sup>1</sup><sup>1</sup> Academician Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Russian Federation<sup>2</sup> Ariel University, Israel<sup>3</sup> Pediatric Clinical Hospital No. 1, Saint Petersburg, Russian Federation

## Identification and Verification of Hereditary Spherocytosis by Means of Laboratory Diagnosis

**Introduction.** Differential diagnosis of hereditary spherocytosis (HS) has been largely based upon the use of non-standardized laboratory methods, which do not provide means to control quality of the study. **The study was aimed at** developing a method of verification of hereditary spherocytosis. **Patients and methods.** The study involved blood samples of 13 adults and 42 children with verified diagnosis of HS and of 311 adults and 42 children with confirmed absence of hematological disorders. In this study, diagnosis of HS was confirmed by means of flow cytometry (eosin-5 maleimide binding test), erythrocyte osmotic resistance test and erythrocyte membrane protein electrophoresis in polyacrylamide gel. The authors assessed diagnostic value of hematological parameters for identifying degree of erythropoietic disorder at HS at the stage of reticulocyte maturation and significance of estimates of such parameters as RET/IRF, MCV-MSCV for primary diagnosis of HS. **Results.** The authors revealed statistically significant differences between the control group and the group of HS patients in terms of estimated parameter MCV-MSCV. The authors developed coefficient  $S$  for 6 control samples in order to standardized results (mean eosin-5 maleimide fluorescence intensity of the analyzed sample/ $X_{mean}$  of the mean eosin-5 maleimide fluorescence intensity) and established a cutoff point  $S < 0.84$  for positive HS cases ( $p = 0.0001$ ; test specificity — 98.2%, sensitivity — 99.2%, area under ROC — 0.99). **Conclusion.** Assessment of estimated reticulocyte parameters MCV-MSCV and RET/IRF using data of an automatic blood analyzer may be recommended as a screening test for identifying HS. A highly specific and sensitive method of flow cytometry with coloring material eosin-5 maleimide features the highest informative value as an HS diagnosis verification test. Erythrocyte membrane protein electrophoresis may be recommended for specifying the molecular defect underlying the matter under study.

**Key words:** hereditary spherocytosis, membranopathy, erythrocyte cytoskeleton, mean eosin-5 maleimide fluorescence intensity, flow cytometry, automatic blood analyzer, reticulocyte parameters, hereditary spherocytosis screening.

(Pediatricheskaya farmakologiya — Pediatric pharmacology. 2014; 11 (4): 67–74)

## ВВЕДЕНИЕ

Дефекты белков цитоскелета при наследственном сфероцитозе (НС) приводят к тому, что мембрана эритроцитов утрачивает стабильность, и ее участки отщепляются. Эритроцит превращается в микросфероцит, не способный к деформации. Микросфероциты не могут пройти через щели в стенках синусов красной пульпы селезенки. Лишившись возможности поддерживать метаболизм из-за гипоксии, микросфероциты теряют еще часть мембраны. В результате в крови появляется субпопуляция совершенно круглых эритроцитов — микросфероцитов [1].

Предшествующие исследования показали, что механизмы, ведущие к сокращению площади поверхности клетки при наследственных мембранопатиях и аутоиммунных гемолитических анемиях, различны: при наследственном сфероцитозе сокращение клеточной поверхности происходит уже на стадии циркулирующих ретикулоцитов, в то время как при аутоиммунных гемолитических анемиях ретикулоциты не затронуты [2]. Таким образом, оценка ретикулоцитарных показателей может представлять значительный интерес для диагностики наследственного сфероцитоза.

В настоящее время для верификации диагноза НС проводится комплексная оценка результатов традиционных лабораторных тестов: определение осмотической резистентности эритроцитов, определение в мазке крови морфологически различных типов эритроцитов, оценка неспецифических для НС изменений расчетных показателей клинического анализа крови (МНС, MCV, MCHN). Генетический анализ как способ верификации НС у пациентов без наследственной истории затруднен, поскольку мутации, определяющие заболевание, уникальны [3].

**Цель исследования:** разработка метода верификации наследственного сфероцитоза.

### Задачи исследования:

- 1) разработать протокол выявления дефекта цитоскелета эритроцитов;
- 2) сопоставить данные цитометрии, морфологии, метода определения осмотической стойкости и электрофореза для выявления возможности верификации дефекта в клинической практике.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 4 группы образцов периферической крови пациентов, обратившихся в клинику с ноября 2011 по ноябрь 2013 г.

**Группа 1 (сравнения).** Взрослые пациенты (мужчины и женщины в возрасте от 21 года до 74 лет; медиана 46 лет;  $n = 311$ ) с доказанным отсутствием отклонений в значениях показателей клинического анализа крови от биологически референтных значений (остаточные образцы крови, полученной для проведения рутинных гематологических исследований; отделение лабораторной диагностики ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова).

**Группа 2 (сравнения).** Дети (мальчики и девочки в возрасте от 3 мес до 17 лет;  $n = 42$ ) с доказанным в рутинных гематологических исследованиях отсутствием отклонений в значениях показателей клинического анализа крови от биологически референтных значений (пациенты Детской городской больницы № 1, Санкт-Петербург).

**Группа 3.** Взрослые пациенты (мужчины и женщины в возрасте от 21 года до 45 лет;  $n = 13$ ) с верифицированным диагнозом наследственного сфероцитоза (родители детей, наблюдающихся по поводу наследственного сфероцитоза в Детской городской больнице № 1, Санкт-Петербург).

**Группа 4.** Дети (мальчики и девочки в возрасте от 1 мес до 15 лет;  $n = 42$ ) с диагнозом наследственного сфероцитоза с различной степенью выраженности симптомов (пациенты Детской городской больницы № 1, Санкт-Петербург).

При проведении исследования получено информированное согласие каждого пациента (для детей — согласие их родителей/опекунов).

### Образцы крови

Образцы периферической венозной крови были забраны в вакуумные пробирки с антикоагулянтом этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) или гепарином — в случаях, когда для исследования было доступно достаточное количество биологического материала.

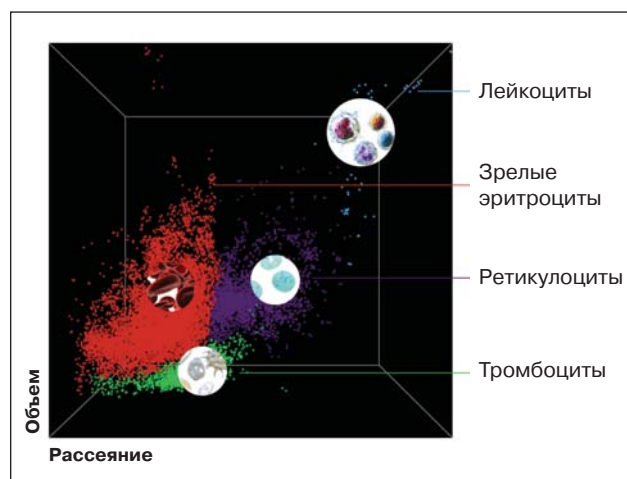
**Морфологический анализ.** Для всех образцов крови пациентов с диагнозом наследственного сфероцитоза выполнены мазки крови с окраской по Романовскому, микроскопия при увеличении  $\times 500$ , фотографии мазков периферической крови на цифровом микроскопе проходящего света Microvisor 500 (ОАО «ЛОМО», Россия).

**Гематологические параметры.** Для всех образцов в исследовании были получены значения следующих классических эритроцитарных индексов с использованием автоматизированного гематологического анализатора Beckman Coulter UniceL DxH 800 (Beckman Coulter, США рис. 1): количество эритроцитов (RBC), концентрация гемоглобина (HGB), MCV (средний объем эритроцита), MCH (среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците), MCHC (средняя концентрация гемоглобина в эритроците), RDW (анизоцитоз, или колебания объема эритроцитов). Для части образцов групп 3 и 4 пациентов детского и взрослого возраста ( $n = 23$ ) и образцов группы контроля ( $n = 30$ ) проведена оценка двух групп параметров ретикулоцитов.

#### 1. Классические параметры:

- Retic% — доля ретикулоцитов от числа эритроцитов;
- Retic# — количество ретикулоцитов в единице объема крови ( $10^{12}/L$ );
- IRF — показатель степени зрелости ретикулоцитов (соотношение фракции незрелых эритроцитов ко всем ретикулоцитам);
- HLR% — доля высокорассеивающих ретикулоцитов (относительное содержание незрелых ретикулоцитов в общем количестве красных кровяных клеток, %);

**Рис. 1.** Пример анализа результатов, полученных на гематологическом анализаторе Beckman Coulter Cellular Analysis System DxH 800



- HLR# — абсолютное количество высокорассеивающих ретикулоцитов (количество незрелых ретикулоцитов в единице объема крови ( $10^{12}/L$ );

2. Параметры, предложенные в качестве «показателей для исследовательских целей» в автоматизированном гематологическом анализаторе Beckman Coulter Unicel DxH 800:

- MRV — средний объем ретикулоцита (средний объем ретикулоцита после воздействия реагента, обеспечивающего прозрачность клеток, fl);
- MSCV — средний объем сферической клетки (средний объем всех красных клеток, включая ретикулоциты, после обработки реагентом, обеспечивающим прозрачность, fl) [4].

Предшествующие исследования показали, что индекс MSCV напрямую зависит от величины MCV, и информативна лишь их параллельная оценка. Для пациентов с диагнозом наследственного сфероцитоза отмечено понижение показателя MSCV относительно MCV [5]. Оценка ретикулоцитарных показателей не входит в состав классического клинического анализа крови. Параметры ретикулоцитов предложены в программном обеспечении гематологического анализатора в качестве опциональных на основании теоретического предположения, что площадь клеточной поверхности при наследственном сфероцитозе снижена не только у зрелых эритроцитов, но и на стадии ретикулоцитов. Анализ ретикулоцитов с помощью метода Култера проводят в 3 этапа:

- суправитальное окрашивание с помощью New Methylen Blue для детекции и преципитации РНК в эндоплазматическом ретикулуле;
- добавление специального реагента для придания эритроцитам сферической формы и удаления гемоглобина; эритроциты становятся оптически нейтральными;
- анализ 32000 эритроцитов и представление данных в виде трехмерного куба в осях «объем», «проводимость» (отражает внутреннюю структуру клетки и дает возможность оценить объем клеточного ядра), «рассеяние» (VCS; дает информацию о гранулярности цитоплазмы, структуре клеточной поверхности и структуре ядра; аналог трехмерной диаграммы лейкоцитов при дифференцировке) [6].

**Тест на связывание эозин-5 малеимида (метод проточной цитометрии).** Для всех образцов в исследовании проведена оценка сохранности белков цитоскелета эритроцитов методом проточной цитометрии. Для выявления дефектов в структуре эритроцитарного цитоскелета применяли краситель эозин-5 малеимид (э5м; eosin-5 maleimide, Sigma, США), который (75–95%) ковалентно связывается с лизоцим-430 первой внеклеточной петли белка полосы 3 в составе мембран эритроцитов [7]. Незначительная часть красителя связывается с CD47, RH-ассоциированными белками. Снижение уровня экспрессии э5м на эритроцитах у пациентов с наследственным сфероцитозом отражает дефицит мембранных белков, включая белок полосы 3, спектрин и белок полосы 4.2 [8, 9].

Подготовка образцов крови к исследованию для выявления уровня сохранности мембранных белков в цитоскелете эритроцитов включала отмывку эритроцитов периферической крови в фосфатно-солевом буфере pH 7,0 при 1000 об./мин, инкубацию с красителем э5м в темноте при комнатной температуре в течение 60 мин, отмывку от несвязавшегося красителя в фосфатно-солевом буфере pH 7,0 при 1000 об./мин в течение 10 мин и удаление надосадка [2, 9–13]. В каждой постановке средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) э5м

у пациента с подозрением на наследственный сфероцитоз была сопоставлена с аналогичным показателем для 6 человек с доказанным отсутствием гематологических заболеваний. Сбор данных проведен на проточном цитометре FC500 (Beckman Coulter). Анализ СИФ э5м проведен с использованием программы CXP Analysis (Beckman Coulter) по данным для 10000 эритроцитов, гейтированных по параметрам светорассеяния.

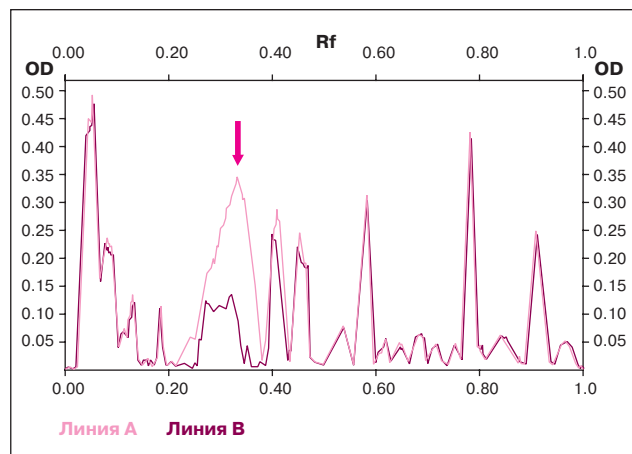
**Осмотическая резистентность эритроцитов по Дейчи.** Определение осмотической резистентности эритроцитов было проведено для 18 образцов периферической крови больных НС. Пробоподготовка для определения осмотической резистентности эритроцитов включала подготовку серии рабочих растворов NaCl с концентрациями от 1 до 0,1% (30 пробирок + 1 контрольная). После инкубирования крови с солевым раствором в течение 30 мин при комнатной температуре образцы центрифугировали и оценивали величину экстинкции (ослабления) надосадочной жидкости для каждого рабочего раствора на фотоэлектроколориметре «КСК-3» (Нижнетуринский машиностроительный завод, Россия) при длине волны 500–560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы (1% раствор хлористого натрия). Повторное исследование образцов периферической крови пациентов с подозрением на НС проведено после инкубации в термостате при 37°C в течение 24 ч (основанием для отсроченной оценки осмотической резистентности являются данные литературы, согласно которым, в ряде случаев понижение осмотической резистентности эритроцитов выявляют только после инкубации) [3].

**Электрофорез мембранных белков эритроцитов в полиакриламидном геле (метод Лэммли).** Молекулярные дефекты при НС гетерогенны. Около 40–65% случаев наследственного сфероцитоза в североамериканской популяции составляет частичный дефект  $\alpha$ -спектрина. Менее часто встречаются комбинированный дефект спектрина и анкирина, частичный дефект цепи протеина 3, дефицит протеина 4.2 и др. [1]. У эритроцита есть только плазматическая мембрана, что позволяет выделить ее в чистом виде, без примеси других внутренних мембран, и разделять мембранные белки методом электрофореза. Результаты электрофореза позволяют определить, какой из возможных молекулярных дефектов послужил причиной изменений в структуре цитоскелета эритроцитов в каждом случае НС. Поскольку для проведения электрофореза необходимо 2 мл периферической крови с антикоагулянтом гепарином, исследование было проведено для 5 пациентов — в случаях, когда биологический материал был доступен в достаточном количестве.

Эритроциты периферической крови, забранной в пробирки с гепарином, трижды отмывали в фосфатном буфере. Для предотвращения деградации белков в процессе пробоподготовки во все образцы добавляли ингибитор протеаз фенилметилсульфонилфторид (PMSF) в концентрации 1 mM. Для разделения мембранных белков использовали буферную систему Лэммли (основной переносчик тока — глицин), разделяющий 7% полиакриламидный гель (ПААГ) pH 8,5 и концентрирующий 4% ПААГ pH 6,8. В дорожки геля вносили по 5 мкл образца (10 мкл отмывых мембран эритроцитов + 90 мкл H<sub>2</sub>O + 50 мкл буфера для нанесения). Электрофорез проводили при силе тока 25 мА на пластину.

После окончания электрофореза электрофореграмму окрашивали. Окрашенные Coomassie Blue R250 полосы помещали в денситометр для определения оптической

**Рис. 2.** Результаты электрофореза: пример денситограммы больного НС (дефицит белка полосы 3) и контрольного образца с сохранным цитоскелетом эритроцитов



*Примечание.* Линия А — контрольный образец (мембраны эритроцитов с сохранным цитоскелетом). Линия В — образец больного НС. Выявлен дефицит белка полосы 3 мембраны эритроцитов. Положение белка полосы 3 на денситограмме обозначено стрелкой.

плотности (OD) и по интенсивности окраски определяли количество мембранных белков эритроцитов в исследуемом образце. Поскольку для диагностики НС методом проточной цитометрии необходимо сопоставление исследуемого образца с шестью контрольными, дизайн исследования в каждой постановке электрофореза был аналогичным: параллельно проводили анализ семи образцов, включая 1 образец с предположительным

диагнозом НС и 6 образцов гематологически здоровых людей (рис. 2).

Нормализацию проводили исходя из молекулярной массы актина. Расчет молекулярной массы исследуемых белков осуществляли относительно электрофоретической подвижности Rf (постоянная величина для данного соединения в данной системе, по этой величине проводят идентификацию компонентов в смеси).

### Статистические методы

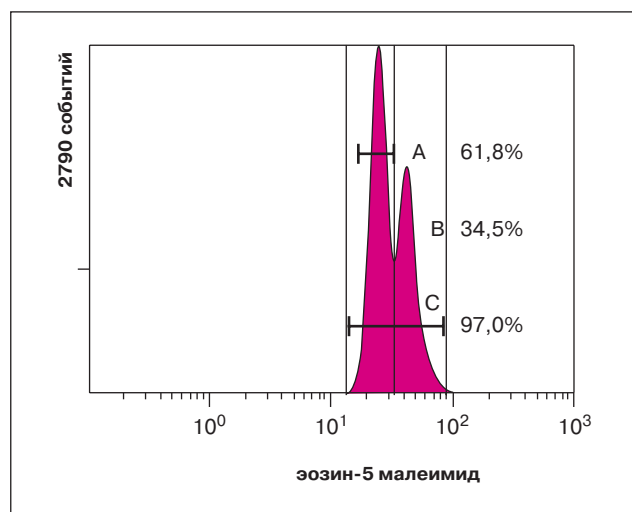
Поскольку численность групп в исследовании невелика, и распределение большинства показателей в них не похоже на нормальное, были использованы два непараметрических критерия — Вальда–Вольфовица и Манна–Уитни. Дополнительно были оценены средние и стандартные отклонения в группах и проведено сравнение методом ANOVA. При совпадении (с точностью до 1–3%) среднего и медианы для характеристики групп использовали среднее и стандартное отклонение, в противном случае — медиану и квартили. Для оценки нормальности выборок, непараметрического анализа, построения графиков описательной статистики использованы программы Statistica (версия 7.0 для Windows). ROC-анализ выполнен с использованием программы MedCalc (версия 7.4.4.1 для Windows).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Проточная цитометрия

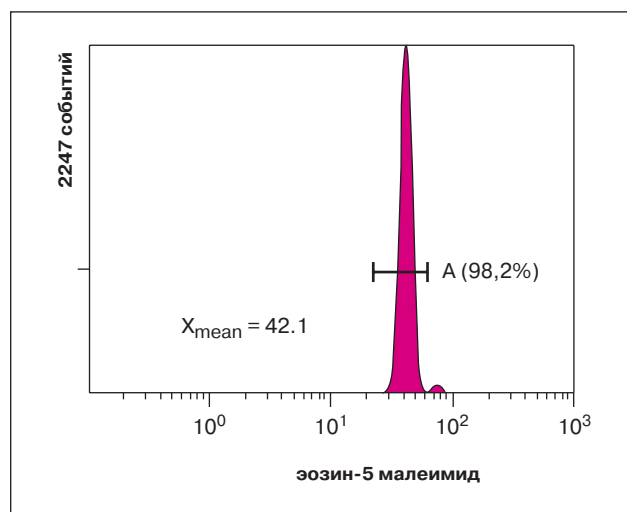
Результаты получены в виде одномерных гистограмм (рис. 3, 4). Для всех пациентов с установленным диагнозом наследственного сфероцитоза (группа 3 — взрослые, группа 4 — дети) было получено подтверждение методом проточной цитометрии в тесте на связывание эозин-5 малеимида. Средняя интенсивность флуорес-

**Рис. 3.** Проточная цитометрия, одномерная гистограмма, интерпретация результатов. Интенсивность флуоресценции красителя эозин-5 малеимид у пациента после трансфузии эритроцитарной массы



*Примечание.* А — пик интенсивности флуоресценции эозин-5 малеимида для эритроцитов пациента, В — пик интенсивности флуоресценции эозин-5 малеимида для трансфузионной эритроцитарной массы, С — общий пик интенсивности флуоресценции эозин-5 малеимида для обеих популяций эритроцитов.  $X_{mean}$  отражает среднестатистическое положение максимума пика распределения частиц на гистограмме в выбранном канале флуоресценции. Для расчета коэффициента S в этом случае использована  $X_{mean}$  С.

**Рис. 4.** Проточная цитометрия, одномерная гистограмма, интерпретация результатов. Пик интенсивности флуоресценции красителя эозин-5 малеимид для эритроцитов взрослого пациента без гематологических нарушений



*Примечание.* А — пик интенсивности флуоресценции эозин-5 малеимида для эритроцитов пациента без гематологических отклонений.  $X_{mean}$  отражает среднестатистическое положение максимума пика распределения частиц на гистограмме в выбранном канале флуоресценции.  $X_{mean}$  использована в качестве одной из шести величин интенсивности флуоресценции в группе контроля для расчета среднеарифметической  $X_{mean}$  группы контроля в постановке.



ценции эритроцитов каждого пациента обеих групп была снижена по сравнению с шестью контрольными образцами.

Для стандартизации результатов исследования введен расчетный показатель S:

$$S = \text{СИФ пациента} / \text{среднее арифметическое значение СИФ шести контрольных образцов.}$$

Уровень отсечки S для пациентов с наследственным сфероцитозом составляет  $\leq 0,8$  при соблюдении условия оценки СИФ э5м до проведения трансфузии [10].

Величина расчетного показателя S для пациентов с диагнозом наследственного сфероцитоза (дети и взрослые) принимала значения от 0,62 до 0,82 (табл. 1). Результат  $S = 0,82$  установлен для пациента, предварительно получившего трансфузию эритроцитарной массы.

Для оценки достоверности различий между всеми группами проведено попарное сравнение групп с помощью критерия множественных сравнений Шеффе (ANOVA). Для всех образцов групп сопоставления (1 и 2): величина  $S \geq 0,84$  у.е. Различия в значениях критерия S для образцов 1-й и 2-й групп контроля (здоровые дети и взрослые) не выявлены. Между группами сопоставления и группами пациентов с установленным диагнозом

НС выявлены значимые различия ( $F = 326,8$ ;  $p = 0,00$ ). Специфичность теста на связывание э5м составляет 99,2%; чувствительность — 98,2%. Установлена точка отсечки критерия S для положительных случаев НС:  $S < 0,84$  при  $p = 0,0001$  (ROC-анализ, MedCalc), площадь под кривой — 0,99.

**Морфологический анализ**

В половине случаев при анализе мазков крови образцов групп 3 и 4 (дети и взрослые, больные наследственным сфероцитозом;  $n = 55$ ) выявлен анизоцитоз, анулоцитоз и пойкилоцитоз эритроцитов (48; 52 и 56% случаев, соответственно).

**Осмотическая резистентность**

Нормальные эритроциты сохраняют форму в гипотоническом растворе NaCl вплоть до 0,44–0,48% NaCl. При НС гемолиз начинается при концентрации солевого раствора 0,6–0,7% NaCl. Для подтверждения диагноза НС важно значительное понижение минимальной осмотической резистентности. В нашем исследовании диагноз НС был подтвержден методом определения осмотической резистентности эритроцитов для 17 пациентов (группа 4), только один результат находился в рамках биологически референтных значений (табл. 2).

**Таблица 1.** Значения критерия S (средняя интенсивность флюоресценции эозин-5 малеимида исследуемого образца /  $X_{\text{mean}}$  средней интенсивности флюоресценции эозин-5 малеимида 6 контрольных образцов)

Группа	Характеристика	Количество пациентов, n	Критерий S $\pm$ станд. откл.	Критерий S: диапазон значений
1	Взрослые	311	$0,99 \pm 0,06$	0,93–1,05
2	Дети	42	$0,99 \pm 0,05$	0,94–1,04
3	Больные НС (взрослые)	13	$0,76 \pm 0,06$	0,7–0,82
4	Больные НС (дети)	42	$0,69 \pm 0,07$	0,62–0,76

**Таблица 2.** Осмотическая стойкость эритроцитов больных наследственным сфероцитозом (группа 4, дети)

Пациент	Осмотическая стойкость после инкубации 24 ч, %NaCl	Биологически референтные значения, % NaCl
1	0,76/0,6	min 0,34–0,32 max 0,48–0,42
2	0,76/0,64	
3	0,46/0,36	
4	0,6/0,54	
5	0,7/0,6	
6	0,74/0,6	
7	0,68/0,46	
8	0,7/0,6	
9	0,76/0,64	
10	0,76/0,64	
11	0,74/0,6	
12	0,76/0,6	
13	0,76/0,64	
14	0,74/0,6	
15	0,76/0,6	
16	0,7/0,58	
17	0,74/0,62	
18	0,76/0,64	

### Электрофорез мембранных белков эритроцитов

В случаях, когда были доступны образцы периферической крови, забранные в пробирки с гепарином, проведен электрофорез мембранных белков эритроцитов и выявлены гетерогенные для разных пациентов молекулярные дефекты — дефект белка полосы 3 (см. рис. 2), спектрина, анкирина; комбинированный дефицит белка полосы 3, анкирина, белка полосы 4.1 и 4.2.

### Клинический анализ крови

Для всех образцов в исследовании проведена оценка эритроцитарных индексов. Выявлены достоверные различия параметров RBC, Hgb, MCHC, RDW между группой пациентов без гематологических нарушений взрослого возраста (группа 1) и группами пациентов с наследственным сфероцитозом (группы 3 и 4; табл. 3).

Для 27 образцов взрослых и детей с наследственным сфероцитозом и 16 взрослых с доказанным отсутствием гемолиза получены значения ретикулоцитарных индексов, проведена оценка расчетных показателей RET/IRF и MCV-MSCV. Во всех случаях НС выявлен ретикулоцитоз.

Показатель RET/IRF (общее количество ретикулоцитов в единице объема крови ( $10^{12}/L$ )/фракция незрелых ретикулоцитов, IRF,%) в литературе рекомендован в качестве диагностического индекса для верификации диагноза наследственного сфероцитоза [5]. Среднее значение расчетного индекса RET/IRF для группы больных наследственным сфероцитозом в нашем исследовании составило 19,5 у.е. Среднее значение RET/IRF для группы контроля — 3,6 у.е. Различия между группами статистически достоверны ( $p < 0,0001$ ; критерий Манна–Уитни, Вальда–Вольфовица). Специфичность для данного параметра составила 94,0%, чувствительность — 96,3%. По данным ROC-анализа, значения параметра RET/IRF для положительных случаев наследственного сфероцитоза  $> 6,9$ , площадь под ROC-кривой равна 0,97.

Среднее значение MCV-MSCV для пациентов с наследственным сфероцитозом составило  $24,5 \pm 4,1$  у.е.; для группы контроля —  $6,2 \pm 3,8$  у.е. (см. табл. 3). Различия между группой пациентов с диагнозом наследственного сфероцитоза (взрослые и дети) и группой пациентов без гематологических отклонений статистически достоверны ( $p < 0,0001$ ). Точка отсечки значения дельты

**Таблица 3.** Значения эритроцитарных и ретикулоцитарных показателей гематологического анализатора Beckman Coulter Cellular Analysis System DxH 800 для пациентов с наследственным сфероцитозом и пациентов без гематологических нарушений (средние значения и границы варьирования параметров)

Показатель	Пациенты с диагнозом наследственного сфероцитоза (взрослые и дети)	Пациенты без гематологических нарушений (взрослые)	ANOVA	Критерий Вальда–Вольфовица	Критерий Манна–Уитни
RBC	<b>3,7 (2,9; 4,0)</b>	<b>4,5 (4,2; 4,9)</b>	0,0006	0,002	0,0002
HGB	<b>112 (86; 138)</b>	<b>131 (111;151)</b>	0,02	0,26	0,02
MCV	90(82; 98)	90 (80;100)	0,96	0,83	0,88
MCH	31 (29; 34)	29 (27; 32)	0,14	0,83	0,11
MCHC	<b>356 (346; 363)</b>	<b>334 (320; 340)</b>	$< 0,0001$	0,01	$< 0,0001$
RDW	<b>18 (16; 22)</b>	<b>15 (13; 18)</b>	0,007	0,90	0,005
RET	<b>9,6 (6,1; 11,5)</b>	<b>0,9 (0,7; 1,5)</b>	$< 0,0001$	$< 0,0001$	$< 0,0001$
RET#	<b>0,32 (0,21; 0,39)</b>	<b>0,04 (0,03; 0,09)</b>	$< 0,0001$	0,0001	$< 0,0001$
MRV	<b>86 (75; 97)</b>	<b>110 (104;116)</b>	$< 0,0001$	$< 0,0001$	$< 0,0001$
IRF	<b>0,47 (0,39; 0,55)</b>	<b>0,40 (0,28; 0,52)</b>	0,03	0,65	0,07
MSCV	<b>68 (59; 77)</b>	<b>85 (77; 93)</b>	$< 0,0001$	0,0001	$< 0,0001$
HLR	<b>7,6 (3,5; 9,2)</b>	<b>0,4; (0,2; 0,8)</b>	$< 0,0001$	$< 0,0001$	$< 0,0001$
HLR#	<b>0,19 (0,10; 0,31)</b>	<b>0,02 (0,01; 0,04)</b>	$< 0,0001$	0,002	$< 0,0001$
RSF	<b>89 (81; 97)</b>	<b>99 (93; 105)</b>	$< 0,0001$	0,002	$< 0,0001$
RDWR	<b>29,8 (28; 31,6)</b>	<b>26,2 (24,2; 28,2)</b>	$< 0,0001$	0,002	$< 0,0001$
MCV-MSCV	<b>24,5 (20,5; 25,5)</b>	<b>6,2 (2,6; 7,7)</b>	$< 0,0001$	$< 0,0001$	$< 0,0001$
RET/IRF	<b>19,5 (7,1; 41,4)</b>	<b>3,6; (1,5; 6,9)</b>	$< 0,0001$	$< 0,0001$	$< 0,0001$

*Примечание.* Жирным шрифтом выделены параметры, для которых выявлены достоверные различия между группами пациентов с/без наследственного сфероцитоза. RBC — количество эритроцитов,  $\times 10^{12}/л$ ; HGB — концентрация гемоглобина, г/л; MCV — средний объем эритроцита, фл; MCH — среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците, pg; MCHC — средняя концентрация гемоглобина, г/л; RDW — колебания объема эритроцитов, %; Ret% — доля ретикулоцитов от числа эритроцитов; Ret# — количество ретикулоцитов в единице объема крови,  $\times 10^{12}/л$ ; IRF — показатель степени зрелости ретикулоцитов (фракции незрелых эритроцитов / все ретикулоциты); HLR% — доля высокорассеивающих ретикулоцитов (процентное содержание незрелых ретикулоцитов в общем количестве красных кровяных клеток, %); HLR# — абсолютное количество высокорассеивающих ретикулоцитов (количество незрелых ретикулоцитов в единице объема крови,  $\times 10^{12}/л$ ; MRV — средний объем ретикулоцита, фл; MCV-MSCV — средний объем сферической клетки (средний объем всех красных клеток), фл; RSF — фактор размера эритроцитов, фл; RDWR — ширина распределения ретикулоцитов, %; MCV-MSCV — расчетный показатель для выявления сфероцитоза, фл; RET/IRF — расчетный показатель для выявления сфероцитоза.

MCV-MSCV по результатам ROC-анализа соответствует 11 у.е. Специфичность для данного показателя составила 100%, чувствительность — 100%. Площадь под ROC-кривой равна 1,0. Таким образом, по нашим данным, значение показателя MCV-MSCV < 11 позволяет исключить диагноз наследственного сфероцитоза.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Принятые в лабораторной практике методы верификации наследственного сфероцитоза — это определение осмотической резистентности эритроцитов и определение в мазке крови морфологически различных типов эритроцитов. В литературе описаны случаи получения ложноположительных результатов при определении осмотической резистентности эритроцитов: например, при токсикозах у беременных, бронхопневмониях, туберкулезе, циррозе печени и других состояниях [14]. В нашем исследовании для одного из пациентов с диагнозом НС осмотическая резистентность эритроцитов находилась в границах биологического референтного интервала. Морфологическое исследование показало, что не во всех случаях наследственного сфероцитоза в мазке периферической крови выявляют морфологические изменения эритроцитов. Таким образом, диагностическая ценность классических лабораторных тестов для верификации наследственного сфероцитоза не абсолютна.

Значения классических эритроцитарных индексов автоматизированного гематологического анализатора у пациентов с наследственным сфероцитозом могут отличаться от биологического референтного интервала. В нашем исследовании выявлены достоверные различия показателей RBC, Hgb, MCHC, RDW между группами пациентов с НС и группой пациентов без гематологических нарушений (взрослые). Описанные в литературе возрастные колебания значений RBC и Hgb у детей, повышение RDW при различных видах анемий, неспецифичность изменений MCHC при НС не позволяют опираться на данные индексы в верификации мембранопатий эритроцитов [3].

Исследование сохранности цитоскелета эритроцитов методом проточной цитометрии — альтернативная методика с высокой специфичностью и чувствительностью; ее эффективность в верификации наследственного сфероцитоза подтверждена независимыми исследователями [7–9, 12]. В нашем исследовании эффективность метода проточной цитометрии с применением эозин-5 малеимида как диагностического теста для верификации диагноза наследственного сфероцитоза подтверждена для пациентов групп взрослого и детского возраста, за исключением пациента, перенесшего трансфузию за несколько дней до проведения исследования. Сопоставление полученных результатов с опубликованными ранее данными других исследований затруднено, поскольку полученные величины средней интенсивности флуоресценции часто значительно отличаются в разных постановках (в зависимости от количества и качества проведенных отмывок проб). Для стандартизации результатов исследования введен расчетный показатель S, который позволяет сопоставить данные разных постановок. Метод проточной цитометрии с применением эозин-5 малеимида представляет собой диагностический тест с высокой специфичностью и чувствительностью и не требует большого количества биологического материала для проведения исследования (достаточный объем — 5 мкл периферической крови).

Для уточнения молекулярного дефекта, лежащего в основе частного случая наследственного сфероцитоза, мы использовали метод электрофореза в полиакрила-

мидном геле. Информация о молекулярной причине наследственного сфероцитоза не определяет ход лечения мембранопатии: данное исследование может быть проведено в научных целях или по желанию пациента в качестве дополнительного. Минусом метода можно считать значительный объем биологического материала, необходимого для исследования (минимальный объем биологического материала — 2 мл периферической крови).

Теоретическое предположение об изменениях в структуре цитоскелета на ранних этапах развития ретикулоцитов позволяет предположить, что ретикулоцитарные показатели могут быть информативны для диагностики наследственного сфероцитоза. В процессе созревания ретикулоцита до зрелого эритроцита происходит постепенное уменьшение содержания РНК. Пробоподготовка для исследования ретикулоцитов на гематологическом анализаторе включает окрашивание РНК флуоресцентным красителем. Значительное изменение соотношения RET/IRF при наследственном сфероцитозе, показанное в нашей работе, может быть следствием снижения проницаемости мембраны ретикулоцитов для флуоресцентного красителя благодаря ранней потере белков цитоскелета и уменьшению клеточной поверхности уже на стадии ретикулоцитов (незрелые ретикулоциты могут быть ложно классифицированы как клетки более поздних стадий созревания).

Ранее опубликованные работы по оценке показателя RET/IRF для больных НС, другими гемолитическими анемиями, железодефицитной анемией и функциональным дефицитом железа, а также для пациентов без гематологических нарушений выполнены на автоматизированных гематологических анализаторах XE-2100, XE-5000 (Sysmex, Kobe, Япония) и Coulter GEN.S (Beckman Coulter, США) [2, 5, 15]. Для всех случаев наследственного сфероцитоза описан ретикулоцитоз без равнозначного увеличения фракции незрелых ретикулоцитов (IRF). Показатель RET/IRF во всех случаях НС принимал значения выше 7,7. Для случаев НС с яркой клинической картиной соотношение RET/IRF составляет > 19. Выявлены статистически значимые различия в значениях показателя RET/IRF между группами пациентов с НС, гемолитическими анемиями, микроцитическими анемиями, пациентами без гематологических нарушений [16]. В нашем исследовании для всех случаев наследственного сфероцитоза показатель RET/IRF принимал значения более 19,5. Таким образом, результаты анализа ретикулоцитов различных автоматизированных гематологических анализаторов сопоставимы. Поскольку измерение показателя IRF предусмотрено в гематологических анализаторах различных производителей, оценка соотношения RET/IRF представляет собой доступный этап диагностики сфероцитоза.

Показатель MCV предложен в панели индексов анализа ретикулоцитов анализатора Beckman Coulter Unicel DxH 800 в качестве «параметра для исследовательских целей». В работе по оценке значения ретикулоцитарных показателей гематологических анализаторов Beckman-Coulter LH 750 Hematology Analyzer и Coulter GEN.S в верификации диагноза наследственного сфероцитоза описаны случаи, когда для гематологически здоровых пациентов регистрировали значения дельты MCV-MSCV на уровне значений этого показателя для пациентов с верифицированным диагнозом наследственного сфероцитоза. Для исключения ложноположительных результатов выбирают точку отсечки, при которой достигается 100% чувствительность при максимально возможной специфичности [17].

Воспроизводимость методики в других лабораториях подтверждают материалы исследования Е. Лазаровой (анализатор Beckman Coulter Unicel DxH 800). В указанной работе выявлены достоверные различия в значении расчетного показателя MCV-MSCV между группой пациентов с наследственным сфероцитозом (среднее значение дельты MCV-MSCV составило 27 у.е.), группой пациентов с железодефицитными анемиями (среднее значение дельты MCV-MSCV 5 у.е.), группой пациентов с аутоиммунными гемолитическими анемиями (среднее значение дельты MCV-MSCV 15 у.е.) [16].

По нашим данным, среднее значение дельты MCV-MSCV для пациентов с наследственным сфероцитозом составляет 24,5 у.е., для пациентов без гематологических нарушений — 6,2 у.е. Достоверность различий между группами пациентов с наследственным сфероцитозом и пациентов без гематологических нарушений в нашем исследовании подтверждена для выборок достаточного объема. Полученные данные позволяют рекомендовать расширение области применения показателя MCV-MSCV, его использование в практической клинической работе, а не только при оценке биологических особенностей патологии в научных исследованиях.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных эффективным представляется следующий алгоритм лабораторной диагностики наследственного сфероцитоза:

- 1) клинический анализ крови на автоматизированном гематологическом анализаторе с оценкой показателей RET и RET#, расчетного индекса RET/IRF и индекса сфероцитоза (MCV-MSCV) в качестве скринингового теста для выявления мембранопатии эритроцитов, приводящей к гемолитической анемии, в частности НС;

- 2) оценка сохранности цитоскелета эритроцитов методом проточной цитометрии с применением красителя эозин-5 малеимид;
- 3) электрофорез мембранных белков эритроцитов в полиакриламидном геле в качестве дополнительного метода для уточнения молекулярного дефекта, лежащего в основе исследуемого случая наследственного сфероцитоза.

Данный алгоритм направлен на максимальное сокращение временного промежутка между первичным обращением пациента к практикующему гематологу и верификацией диагноза наследственного сфероцитоза.

## Благодарность

Авторы выражают признательность Сухачевой Елене Александровне — менеджеру научно-исследовательских программ Beckman Coulter Eurocenter (Швейцария); Поляковой Елизавете Тимовне и коллективу лаборатории клинической гематологии отделения общей лабораторной диагностики Первого Санкт-Петербургского медицинского университета им. акад. И.П. Павлова; Михалевич Юлиане — специалисту компании Labtech (Санкт-Петербург); Слите Александру Валентиновичу — старшему научному сотруднику лаборатории молекулярной вирусологии и геномной инженерии научно-исследовательского института гриппа Российской академии медицинских наук.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки, которую необходимо обнародовать. Работа была частично поддержана компанией Beckman Coulter в 2012 году в формате консультаций с профессором Зуевой ЕЕ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рукавицын О.А., Павлов А.Д. Анемии. Под ред. О.А. Рукавицына, А.Д. Павлова. СПб.: Детство-Пресс. 2011. С. 67–68.
2. Mullier F., Lainey E., Fenneteau O., Da Costa L., Schillinger F., Bailly N., Cornet Y., Chatelian C., Dogne J.-M., Chatelian B. Additional erythrocytic and reticulocytic parameters helpful for diagnosis of hereditary spherocytosis: results of a multicentre study. *Annals of hematology*. July 2011; 90: 759–768.
3. Гусева С.А., Вознюк В.П., Дубкова А.Г. Анемии: принципы диагностики и лечения. Под ред. С.А. Гусевой. Киев. 1999. С. 74–75.
4. Fourcade Ch., Jary L., Belaoui H. Reticulocyte Analysis Provided by the Coulter GEN S significance and interpretation in regenerative and nonregenerative hematologic conditions. *Laboratory hematology*. 1999; 5: 1–xx.
5. Cniron M., Cynober T., Mielot F., Tchernia G., Croisille L. The GENs: a fortuitous finding of a routine screening test for hereditary spherocytosis. *Hematol Cell Ther*. 1999; 41: 113–116.
6. Agre P., Orringer E.P., Bennett V. Deficient red-cell spectrin in severe, recessively inherited spherocytosis. *N Engl J Med*. 1982; 306: 1155–61.
7. King M.J., Zanella A. Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing. *Int J Lab Hematol*. 2013 Jun; 35 (3): 237–43.
8. Girodon F., Garçon L., Bergion E., Largier M., Delaunay J., Feneant-Thibault M., Maynadie M., Couillaud G., Moreira S., Cynober T. Usefulness of the eosin-5 maleimide cytometric method as a first-line screening test for the diagnosis of hereditary spherocytosis: Comparison with ektacytometry and electrophoresis. *Br J Haematol*. 2008; 140: 468–70.
9. Kar R., Mishra P., Pati H.P. Evaluation of eosin-5-maleimide flow cytometric test in diagnosis of hereditary spherocytosis. *Int J Lab Hem*. 2010; 32: 8–16.
10. Прохорова Ю.А., Зуева Е.Е., Соколова Н.Е. Применение метода проточной цитометрии в диагностике наследственного сфероцитоза (тест на связывание эозин-5 малеимида). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 7: 31–5.
11. Doherty G.J., McMahon H.T. Mediation, modulation and consequences of membrane-cytoskeleton interactions. *Annual Review of Biophysics*. 2008; 37: 73.
12. King M.J., Jepson M.A., Guest A., Mushens R. Detection of hereditary pyropoikilocytosis by the eosin-5 maleimide (EMA)-binding test is attributable to a marked reduction in EMA-reactive transmembrane proteins. *Int. Journal of laboratory Hematology*. 2011; 33: 205–211.
13. Kedar P.S., Colah R.B., Kulkarni S., Ghosh K., Mohanty D. Experience with eosin-5-maleimide as a diagnostic tool for red cell membrane cytoskeleton disorders. *Clin Lab Haematol*. 2003; 25: 373–6.
14. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. Москва: Изд.: Медицина. 2005. С. 39–41.
15. Баранов А.А., Семикина Е.Л., Мельничук О.С., Гордеева О.Б., Намазова-Баранова Л.С., Морозова Н.А., Кожевникова О.В., Геворкян А.К., Маянский Н.А. Показатели ретикулоцитарных индексов у здоровых детей. *Вопросы диагностики в педиатрии*. 2010; 4 (2): 19–21.
16. Lazarova E., Pradier O., Cotton F., Gulbis B. Automated reticulocytes parameters for hereditary spherocytosis screening. *Ann Hematol*. 2014 Jun; 10: 58–69.
17. Broseus J., Visomblain B., Guy J., Maynadie M., Girodon F. Evaluation of mean sphere corpuscular volume for predicting hereditary spherocytosis. *Int J Lab Hem*. 2010; 32 (5): 521–522.