

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.633.963.42-039

Плеханова О.С., Наумова Е.В., Луговская С.А., Почтарь М.Е., Бугров И.Ю., Долгов В.В.

## МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ ПАРОКСИЗМАЛЬНОЙ НОЧНОЙ ГЕМОГЛОБИНУРИИ

Кафедра клинической лабораторной диагностики ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава РФ, 123995, г. Москва

*Представлена диагностика пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ). ПНГ – орфанное заболевание, характеризующееся отсутствием GPI-якоря на клетках крови в результате мутации гена PIG-A на коротком плече X-хромосомы. Некоторые белки, связанные с GPI-якорем, выполняют функцию защиты от активации компонентов комплемента и образования мембранатакующего комплекса (МАК). Наиболее подвержены действию МАК эритроциты, подвергающиеся разрушению в кровеносном русле. Поэтому одним из основных признаков ПНГ является комплемент-зависимый внутрисосудистый гемолиз, показатели которого длительное время играли ключевую роль в диагностике ПНГ. Современным методом диагностики ПНГ является проточная цитометрия. Рекомендовано направлять на исследование ПНГ-клона пациентов с гемолизом неясного генеза, тромбозом церебральных вен и вен живота, тромбоцитопенией и макроцитозом, а также больных с апластической анемией, миелодиспластическим синдромом, миелофиброзом. Для диагностики ПНГ используется международный протокол, рекомендованный Международным обществом клинической цитометрии (2010 г.). Нами разработан метод оценки ретикулоцитов с целью выявления ПНГ-клона. Доказана высокая корреляция размера ПНГ-клона, измеренного среди ретикулоцитов согласно предложенному способу, с ПНГ-клоном в числе гранулоцитов и моноцитов, определенных согласно международному стандартизованному подходу.*

**Ключевые слова:** пароксизмальная ночная гемоглобинурия; проточная цитометрия; моноклональные антитела.

**Для цитирования:** Плеханова О.С., Наумова Е.В., Луговская С.А., Почтарь М.Е., Бугров И.Ю., Долгов В.В. Методологические подходы к диагностике пароксизмальной ночной гемоглобинурии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (3): 151-154, 167,168. DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-3-151-154, 167,168.

*Plekhanova O.S., Naumova E.V., Lugovskaya S.A., Potchtar M.E., Bugrov I.Yu., Dolgov V.V.*

### THE METHODOLOGICAL APPROACHES TO DIAGNOSTIC OF NIGHT PAROXYSMAL HEMOGLOBINURIA

The Russian medical academy of post-graduate education of Minzdrav of Russia, 123995 Moscow, Russia

*The article presents diagnostic of night paroxysmal hemoglobinuria. The night paroxysmal hemoglobinuria is an orphan disease characterized by absence of GPI-anchor on blood cells as a result of mutation of PIG-A gene on the short arm of X-chromosome. The particular proteins bounded with GPI-anchor implement function of defense from activation of components of complement and development of membrane-attacking complex. The erythrocytes exposed to destruction in bloodstream are among the most impacted. Therefore, one of the main signs of night paroxysmal hemoglobinuria is complement-dependent intravascular hemolysis which indicators for a long time played a key role in diagnostic of night paroxysmal hemoglobinuria. The actual technique of diagnostic of night paroxysmal hemoglobinuria is flow cytometry. The analysis of night paroxysmal hemoglobinuria clone is recommended to patients with hemolysis of unclear genesis, thrombosis of cerebral and abdominal veins, thrombocytopenia and macrocytosis and also patients with AA, myelodysplastic syndrome, myelofibrosis. The international protocol recommended by the International Society of Clinical Cytometry (2010) is implemented to diagnose night paroxysmal hemoglobinuria. The original technique of evaluation of reticulocytes was developed with purpose to detect night paroxysmal hemoglobinuria clone. The high correlation was substantiated between size of night paroxysmal hemoglobinuria clone measured among reticulocytes according to proposed mode and night paroxysmal hemoglobinuria clone measured among granulocytes and monocytes detected according international standardized approach.*

**Key words:** night paroxysmal hemoglobinuria; flow cytometry; monoclonal antibodies

**For citation:** Plekhanova O.S., Naumova E.V., Lugovskaya S.A., Potchtar M.E., Bugrov I.Yu., Dolgov V.V. The methodical approaches to diagnostic of night paroxysmal hemoglobinuria. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (3): 151-154, 167,168 (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-3-151-154, 167,168

**For correspondence:** Naumova E.V., candidate of medical sciences, assistant professor of the chair of clinical laboratory diagnostic. e-mail: naum@mail.ru

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Financing.** The study had no sponsor support.

Received 30.11.2015  
Accepted 15.12.2015

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ) – редкое приобретенное клональное заболевание, развивающееся в результате экспансии одного или нескольких клонов гемопоэтических стволовых клеток с соматической мутацией PIG-A (phosphatidylinositol glycan-class A) гена, который локализуется на X-хромосоме [1–4]. Данный генетический дефект приводит к нарушению синтеза гликозилфосфатидилиннозитолового (GPI) якоря, осуществляющего фиксацию целого ряда молекул на мембране клеток крови [5]. Клинически ПНГ характеризуется хроническим внутрисосудистым комплементопосредованным гемолизом [6–8], рецидивирующими тромбозами, часто с необычными локализациями (печеночные, мезентериальные, нижняя полая, портальная, церебральные вены и др.) [9, 10], развитием недостаточности костного мозга, приводящей к панцитопении, и других редких симптомов [10, 11]. Также для ПНГ характерны анемия, гемоглобинурия, тромботические осложнения, дисфагия, вялость, эректильная дисфункция, хроническая почечная недостаточность, легочная гипертензия.

Патогенез клинических проявлений заболеваний связан с гемолизом эритроцитов в результате атаки системой комплемента через образование мембраноатакующего комплекса (МАК), который в норме инактивируется присутствием на эритроцитах GPI-связанных белков CD55, CD59 [12]. Молекула CD55 является одной из блокаторов постоянной активации (посредством C3- и C5-конвертаз) системы комплемента и защищает клетки от образования на их поверхности МАК и постоянной продукции C5a- и C5b-компонентов комплемента. В случае отсутствия CD55 за счет повышенной концентрации C5a происходит активация лейкоцитов и тромбоцитов, возникают воспаление и тромбозы. Важную роль в механизме патогенеза также играет CD59, препятствующий компоненту C9 внедриться в комплекс C5b–C8 с образованием МАК. В результате эритроциты подвергаются комплементопосредованному лизису. На эритроцитах при наличии ПНГ-клона можно наблюдать как частичное (ПНГ-клон II типа), так и полное отсутствие (ПНГ-клон III типа) GPI-якоря и соответственно CD55 и CD59.

ПНГ-клон может возникать при апластической анемии (АА), аутоиммунной гемолитической анемии (АИГА), миелодиспластическом синдроме (МДС), миелофиброзе. Возрастная медиана возникновения ПНГ 30–35 лет. Заболеваемость ПНГ от 1 до 10 на 1 млн человек. Смертность без лечения при ПНГ составляет около 35% в течение 5 лет от начала заболевания, 50% – через 10 лет [13].

В настоящее время выделяют 3 формы ПНГ:

- *классическая форма* с характерными клиническими признаками, описанными выше;
- ПНГ, развивающаяся при АА (АА/ПНГ), МДС (МДС/ПНГ), а также миелофиброзе (идиопатический миелофиброз/ПНГ), в этом случае у больных имеются клинические и/или лабораторные признаки гемолиза, а также обнаруживается ПНГ-клон;
- *субклиническая форма* ПНГ. В этом случае клинические и лабораторные признаки гемолиза отсутствуют, однако в периферической крови обнаруживается ПНГ-клон, чаще минорный (менее 1%). Таким пациентам рекомендуется проводить повторные исследования с частотой 6–12 мес для мониторинга нарастания размера клона и прогрессии гемолиза [13].

До недавнего времени в терапии ПНГ существовал в основном паллиативный подход. Применялись трансфузия эритроцитарной массы, антикоагулянты, стимуляторы гемопоэза, а также кортикостероиды и андрогены (в клинической практике не было проведено подтверждающих эффективность клинических исследований). В результате этих подходов есть определенные риски (например, опасность инфицирования и риск перегрузки железом при трансфузиях; повышения риска

кровотечения при приеме антикоагулянтов; усиление кровотворения и как следствие экспансии ПНГ-клона с усилением гемолиза) [10]. Одна из терапевтических опций – трансплантация костного мозга [14]. Однако показаны невысокая выживаемость пациентов и наступление реакции трансплантат против хозяина примерно в половине случаев [15]. Для лечения ПНГ также используют иммуносупрессивные препараты – циклоспорин А и антиtimoцитарный глобулин [16].

В 2007 г. в Евросоюзе и США, а в 2011 г. в России был зарегистрирован препарат экулизумаб (компания Alexion) как фармацевтическое средство для лечения пациентов с ПНГ [17]. Экулизумаб представляет собой гуманизированные моноклональные антитела, связывающиеся специфически с C5-комплемента, препятствующих, таким образом образованию терминального комплекса комплемента (C5b–C9 и C5a) и предотвращающих запуск механизма внутрисосудистого гемолиза.

Разработка нового препарата послужила причиной развития более точных методов диагностики, в основном проточной цитометрии, позволяющей выявить наличие ПНГ-клона, его размер и тем самым подтвердить диагноз. Эффективность и адекватность лечения и мониторинга больных зависит от информативности диагностических мероприятий и полноты полученной информации.

Клинико-лабораторными признаками, повышающими возможность выявления ПНГ-клона, принято считать гипоплазию костного мозга, неясную цитопению, МДС, гемоглобинурию, неясный тромбоз (артериальный, венозный), отрицательную прямую пробу Кумбса. При лабораторной диагностике ПНГ наблюдаются следующие изменения: панцитопения (75%), гипохромная анемия (90%), повышение уровня ЛДГ и свободного гемоглобина, снижение гаптоглобина, гемоглобинурия, гемосидеринурия, ретикулоцитоз. Исторически для диагностики ПНГ использовались такие методы, как тест Хема (1936 г.) и сахарозный тест [18, 19]. Оба способа показали повышенную чувствительность ПНГ-клонов эритроцитов к комплементу. Кислотная проба Хема [18] основана на повышенной чувствительности эритроцитов больных ПНГ к кислой среде. Принцип теста заключается в том, что к сыворотке донора, сопоставимой с сывороткой больного по АВ0-системе антигенов, добавляют 0,2 N раствор HCl, изменяется pH сыворотки и в итоге вызывается активация комплемента.

Далее подкисленную сыворотку смешивают с суспензией отмытых эритроцитов. Результат пробы Хема оценивается визуально. В норме гемолиз не превышает 5% клеток, при ПНГ он достигает более 50%. При этом минимально определяемый размер клона 4,2–5%.

Сахарозная проба Хартмана [19] основана на повышенной чувствительности эритроцитов больного ПНГ к комплементу в присутствии сахарозы. К эритроцитам больного добавляют свежую сыворотку донора, идентичную по группе крови больного, и раствор сахарозы в кислом буфере. После центрифугирования супернатант оценивается на предмет видимого гемолиза. Если он наступает, его степень, выраженная в процентах, высчитывается из концентрации гемоглобина супернатанта, которая определяется цианметгемоглобиновым методом.

Эти тесты достаточно громоздки и практически не дают конкретных данных. Их недостатками являются невозможность количественной оценки результата и слабая чувствительность [20].

Более специфичным стал метод, позволяющий измерять степень гемолиза при различных концентрациях комплемента [21]; этот анализ показал, что ПНГ-клетки лизируются при более низких концентрациях, чем нормальные. Он также подтвердил, что некоторые пациенты с

ПНГ имеют популяцию клеток с промежуточной чувствительностью к комплементу (тип II) между нормальными эритроцитами (тип I) и самыми аномальными эритроцитами (тип III). Тем не менее проведенный тест тоже оказался трудоемким, сложно стандартизируемым и, применяя его, можно пропустить небольшие популяции аномальных клеток.

Определение мутации гена PIG-A не используется для диагностики ПНГ, несмотря на высокую специфичность.

На сегодняшний день золотым стандартом является проточная цитометрия. Характеристика клеток крови при ПНГ с помощью данного способа была введена в 1986 г., с 1996 г. рассматривается как метод выбора для постановки диагноза ПНГ. Анализ клеток на наличие ПНГ-клона, проведенный с использованием проточной цитометрии, имеет в настоящее время важнейшее значение для мониторинга заболеваний с точки зрения прогрессирования, регрессии или ответа на терапию и скрининг малых клонов ПНГ (< 1 %) у пациентов с АА или МДС.

Исторически сложилось отсутствие единообразия в выборе моноклональных антител (МКА) различными лабораториями. Это может быть в значительной степени связано с существованием МКА против различных GPI-якорных белков, использование которых может определить в той или иной степени ПНГ-клон, особенно при классической форме ПНГ, где такие клетки преобладают.

Протокол по диагностике ПНГ на основе определения дефицита экспрессии CD55 и CD59 на эритроцитах был разработан в 2001 г. [22]. Этот способ нашел широкое применение среди лабораторий. Однако в дальнейшем стало очевидно, что оценка содержания эритроцитов с недостаточностью этих белков не позволяет судить об истинных размерах ПНГ-клона, поскольку эритроциты подвергаются гемолизу, после гемотрансфузий изменяется соотношение нормальных и ПНГ-позитивных эритроцитов [23]. Помимо этого было показано, что определение экспрессии CD55 не позволяет четко разделить эритроциты II и III типов (частично или полностью лишены GPI-якоря). В дальнейшем принцип диагностики был построен на детекции GPI-связанных белков на гранулоцитах, моноцитах, эритроцитах.

По мере исследования GPI-связанных молекул лабораториями предлагались различные комбинации антител для обнаружения ПНГ-клона [24, 25]. Кроме того, все более широкое использование проточной цитометрии для обнаружения малых клонов увеличило различия между реагентами, так как некоторые из них, эффективно выявляющие большие ПНГ-популяции, не обладают высокой чувствительностью для малых клонов.

Одним из реагентов, доступных для изучения GPI-связанных антигенов на лейкоцитах на данный момент, является люминесцентный aerolysin или FLAER (fluorescently labeled inactive toxin aerolysin). FLAER – бактериальный токсин аэролизин, меченный флуоресцентными метками, связывающийся непосредственно с GPI-якорем [26, 27]. Он секретируется как неактивный протоксин, проаэролизин, конвертируемый в активную форму путем протеолитического расщепления С-терминального пептида. Аэролизин связывается со структурами клеточной поверхности и образует олигомеры, формируя каналы и приводя к клеточному лизису. Изначально этот реагент был использован для демонстрации резистентности ПНГ-эритроцитов к аэролизину. Для создания реагента, связывающего GPI, но с подавленной литической активностью, были проведены две точечные мутации. Путем объединения мутантного проаэролизина с флуоресцентной меткой (Alexa Fluor 488), получен реагент (FLAER), метящий клетки, содержащие GPI-связанные белки. Так как FLAER выявляет непосредственно GPI-якорь, он может быть использован для исследования всех типов клеток перифери-

ческой крови кроме эритроцитов, которые не экспрессируют необходимые активирующие протеазы [27].

Преимуществом этого метода является возможность тестирования гранулоцитов и моноцитов в одной пробе, недостатком – невозможность проведения теста при очень низком количестве гранулоцитов, что наблюдается при апластической анемии [28]. В отличие от антител против многих GPI-связанных антигенов его связывание является менее чувствительным к этапам созревания клеток.

После появления FLAER выявление ПНГ-клона стало рутинным тестом во многих лабораториях. Сравнение различных клонов антител разных фирм-производителей позволило определить наиболее эффективные, по итогам чего создан протокол, который в настоящее время рекомендован Международным обществом клинической цитометрии (ICCS) как основной протокол диагностики ПНГ (2010 г.) [11].

Согласно этому подходу исследуется наличие GPI-связанных белков среди гранулоцитов, моноцитов и эритроцитов. Для оценки ПНГ-клона среди эритроцитов предлагается использовать CD235a (FITC) – панэритроцитарный маркер и CD59 (PE) – GPI-связанный белок, экспрессия которого оценивается на гистограмме эритроцитов. Для оценки ПНГ-клона среди гранулоцитов и моноцитов используются комбинации:

1) комбинация МКА для определения ПНГ-клона среди нейтрофилов FLAER (FITC)/CD15 (PE)/CD24 (PerCP)/CD45 (PE-Cy7) GPI-связанные маркеры в данной комбинации – FLAER и CD24, гейтирующие – CD45 и CD15;

2) комбинация МКА для определения ПНГ-клона среди моноцитов FLAER (FITC)/CD14PE/CD64PerCP/CD45PE-Cy7, где GPI-связанные маркеры – FLAER и CD14, гейтирующие маркеры – CD45 и CD64.

В данном случае для стандартного исследования оценивается 5 тыс. гранулоцитов, для исследования ПНГ-клона методом высокочувствительной цитометрии – не менее 500 тыс. клеток.

Отсутствие GPI-связанных маркеров на клетках указывает на принадлежность их к ПНГ-клону. Согласно протоколу ICCS при дефекте GPI-связанных белков необходимо выявить:

- среди нейтрофилов – отсутствие экспрессии FLAER/CD24, анализируя не менее 5 тыс. клеток;
- среди моноцитов – отсутствие экспрессии FLAER/CD14, количество анализируемых клеток варьирует;
- среди эритроцитов – отсутствие экспрессии CD59, при этом анализируя не менее 50 тыс. клеток. Клетки без дефицита CD59 – это нормальные эритроциты (I тип), клетки с частичным дефицитом экспрессии CD59 – ПНГ-клон II типа, клетки, не экспрессирующие CD59, т. е. эритроциты с полным дефицитом CD59 – это ПНГ-клон III типа.

Размер ПНГ-клона оценивается по проценту клеток (гранулоцитов, моноцитов, эритроцитов), среди которых наблюдается отсутствие GPI-связанных якорных белков.

Однако методика, предложенная ICCS, является достаточно дорогостоящей и трудоемкой, а анализ гранулоцитов наиболее информативен в течение 48 ч после взятия материала, так как далее происходит их дегрануляция. Согласно ICCS, проводить ПНГ-диагностику только по анализу экспрессии CD59 среди эритроцитов нельзя, так как они подвергаются комплементзависимому лизису, и истинный размер ПНГ-клона определить невозможно.

В результате последних исследований ряд авторов предлагают использовать для диагностики ПНГ, МКА к CD157 [30]. CD157 – GPI-связанный белок, экспрессируется как на моноцитах, так и на гранулоцитах. Это рецептор, который способствует реорганизации цитоскелета и значительных изменений формы клетки. Точкой приложения сигнала, проходящего в клетку, является изменение концентрации  $Ca^{2+}$  в цитозоле клетки. Показано, что значения размеров ПНГ-

клонов у пациентов разных групп (МДС, АА-ПНГ, ПНГ и т. д.), получившихся при использовании этого маркера с помощью 4- и 5-цветной проточной цитометрии, сопоставимы с таковыми при использовании реагента FLAER. При этом его связывание является достаточно чувствительным к этапам созревания клеток. В подобных работах для упрощения схемы анализа предложено заменить им CD14 и CD24 [31].

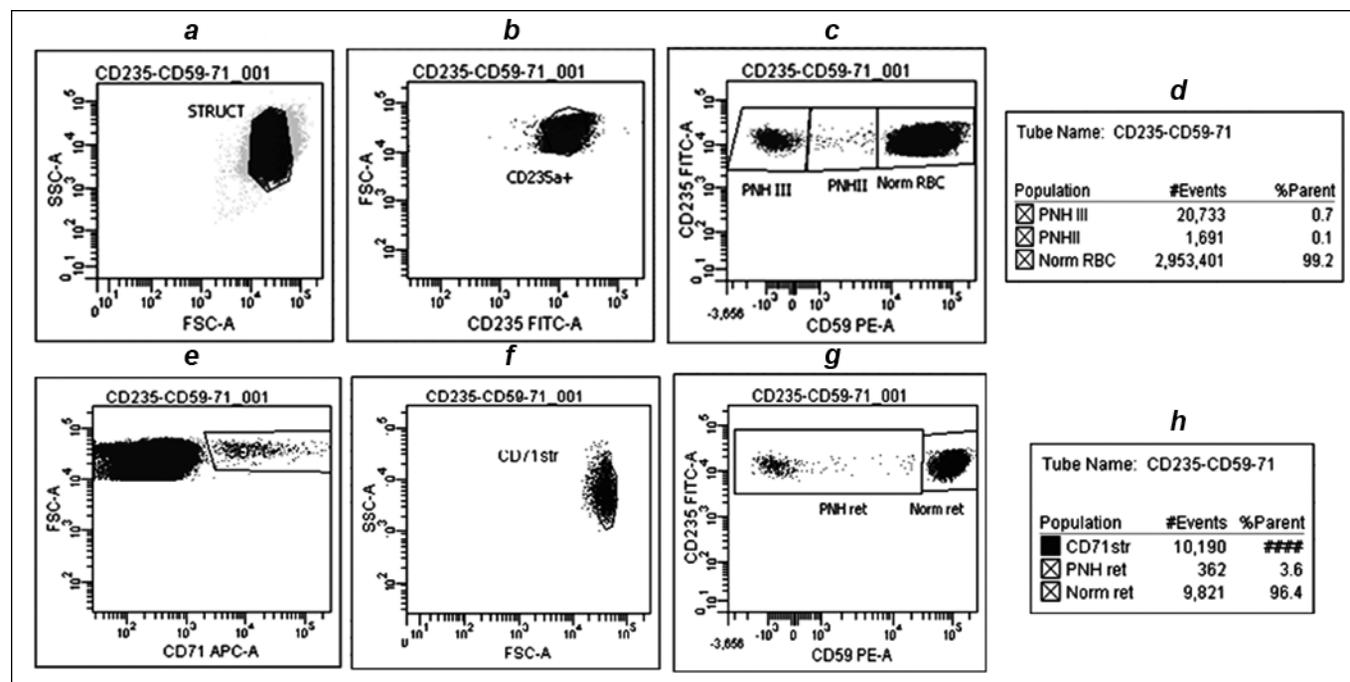
Достаточно часто у больных ПНГ выявляется большой размер клона среди гранулоцитов и моноцитов и минорный клон среди эритроцитов, что объясняется хроническим различной степени выраженности гемолизом, проведением трансфузионной терапии, снижением продолжительности жизни эритроцитов. В связи с тем что определение размера ПНГ-клона среди моноцитов и гранулоцитов представляется довольно трудоемким и дорогостоящим, было выдвинуто предположение о возможности выявления ПНГ-клона среди незрелых эритроцитов, которые не успели подвергнуться гемолизу ретикулоцитах.

В литературе описаны методы определения ПНГ-клона среди ретикулоцитов. В поисках флуоресцентного красителя для ретикулоцитов был предложен тиазол оранжевый [32]. Ретикулоциты можно отличить от зрелых эритроцитов по наличию в них остатков РНК, но ядродержащие клетки при этом ошибочно будут тоже дифференцированы как ретикулоциты. Также в литературе описан метод выявления ретикулоцитов с помощью CD71 [33]. CD71 – трансмембранный гликопротеин, состоящий из двух идентичных мономеров (молекулярная масса 90–95 кДа), соединенных дисульфидной связью, рецептор к трансферрину.

В работе N.J. Tsagarakis и соавт. [33] у 15 больных с ПНГ и АА проведена оценка ПНГ-клона на ретикулоцитах, выделенных с использованием CD71 и CD59, и сопоставлена со значениями ПНГ-клона среди гранулоцитов, выделенных с помощью CD66b/CD16/CD45 и CD59/CD24/CD45. Оценка ре-

зультатов проводится на однопараметрических гистограммах. Согласно данному методу минимальный размер определяемого ПНГ-клона среди гранулоцитов составляет 1%, а среди ретикулоцитов – 5%. Предложенный метод протестирован на небольшом количестве пациентов с ПНГ ( $n = 8$ ) и пациентов с ПНГ-клоном менее 1% ( $n = 7$ ) (при его оценке на гранулоцитах и менее 5% при определении на ретикулоцитах). При этом среди образцов крови пациентов с подозрением на ПНГ не было таковых с размером клона от 1 до 24%, что не дает полной картины о корреляции значений в этом диапазоне. Предложенный авторами подход затрудняет гейтирование ретикулоцитов из-за отсутствия в панели панэритроцитарного маркера (CD235a), что особенно необходимо для выделения чистой популяции и отсеки дедбриса и дуплетов. Кроме того, для объективной оценки ПНГ-клона необходимо оценивать десятки тысяч клеток. В протоколе данного анализа использовались 6 видов моноклональных антител (МКА), причем некоторые из них используются дважды, что в результате отражается на увеличении стоимости используемой панели МКА. Этот способ не решает задачи достоверного выявления минорных ПНГ-клонов и не является доказательным в плане высокой чувствительности метода.

В связи с тем что ПНГ относится к редким заболеваниям, большая часть пациентов, направленных для ее диагностики, как правило, не будут являться ПНГ-позитивными. Следовательно, встала актуальная задача разработки скринингового теста для выявления ПНГ-клона с использованием минимальной панели МКА, который обладает высокой достоверностью, точностью и чувствительностью, сопоставимой с международной стандартизированной методикой. Этот метод должен определять наличие ПНГ-клона как значительного размера у пациентов с истинной ПНГ, так и минорных клонов – (до 1%), у пациентов с АА и МДС.



Предлагаемый протокол для оценки ПНГ-клона среди эритроцитов (a–d) [11]; схема проведения анализа ПНГ-клона среди ретикулоцитов, выделенных по CD71 (a, b, e–h). На представленном графике ПНГ-клон присутствует среди эритроцитов в размере 0,8% (II + III тип) и среди ретикулоцитов в размере 3,6% (II + III тип). PNHret (g, h)-гейт, в котором отображен ПНГ-клон на ретикулоцитах.

Продолжение см. на 167 стр.

Нами проведена диагностика ПНГ методом проточной цитометрии у 1925 пациентов, из них 1125 женщин, 800 мужчин, в возрасте от 1 года до 88 лет. Всем пациентам диагностика проводилась согласно международному стандартизованному протоколу [11] и предлагаемому нами подходу. В качестве объекта исследования выбраны ретикулоциты, выделенные с помощью CD235a и CD71.

Для окрашивания образца применяли трехцветную комбинацию МКА – CD235a (FITC, клон 11E4B-7-6, VC)/CD59 (PE, клон MEM-43, Invitrogen)/CD71 (APC, клон ОКТ9, eBioscience). Измерения проводились на проточном цитометре BD FACSCanto™ II Becton-Dickinson (США).

Для оценки ПНГ-клона среди эритроцитов и ретикулоцитов использовали точечный график – FSC (log) vs SSC (log), с помощью логического ограничения выделяли область эритроцитов, исключая дебрис и дуплеты (см. рисунок, а). Затем на графике FSC (log) vs CD235a (см. рисунок, б) выделяется гейт по CD235a+ клеткам, тем самым исключая дебрис и клетки, не относящиеся к популяции CD235a+. События, вошедшие в гейт CD235a+, анализируются на графике CD71 vs FSC (log) (см. рисунок, в), на котором выделяется популяция позитивная по CD71. Для объективной оценки ПНГ-клона среди ретикулоцитов в гейте CD71+ собирается не менее 20 тыс. событий. В зависимости от гейта CD71+ строится график FSC (log) vs SSC (log) (см. рисунок, г), на котором при помощи дополнительного гейта CD71str выделяются ретикулоциты, и, таким образом, методом последовательного гейтирования популяция ретикулоцитов окончательно очищается от дебриса и дуплетов.

Далее строится график CD235a vs CD59 (см. рисунок, г) в зависимости от гейта CD71str (выделенные ретикулоциты). На этом графике выделяются две области – Norm Ret и PNH Ret (см. рисунок, г), это границы нормальных и ПНГ-позитивных ретикулоцитов соответственно. Статистические данные отражаются в количестве собранных событий и процентах от гейта (см. рисунок, д и е).

Гейт CD235a+ на первом этапе сбора данных является стоп-гейтом, т. е. в нем собирается 1 млн событий. Гейт CD235a+ применяется к графику CD235a vs CD59 (см. рисунок, в). Если в регионах PNH Type II и PNH Type III на графике CD235a vs CD59 суммарно оказывается не более 10 событий, сбор данных прекращается и делается вывод об отсутствии ПНГ-клона. При большем количестве событий суммарно в этих регионах исследование продолжается. На втором этапе исследования CD71 является стоп-гейтом, в котором должно быть собрано 20 тыс. событий.

Данный способ является простым в выполнении и не требует больших материальных затрат по сравнению с международной стандартизованной методикой. В протоколе используется всего три комбинации МКА при скрининге ПНГ (CD235a, CD71, CD59). Исследование выполняется в одной пробирке, использование меньшего количества антител без применения лизирующих растворов делает анализ дешевле примерно на 75% за один раз. При этом сохраняется высокая чувствительность и точность диагностики. ПНГ-клон среди ретикулоцитов отражает истинное значение ПНГ-клона. Нами проведено сравнение полученных значений ПНГ-клона среди ретикулоцитов со значениями, полученными при помощи стандартизованного международного подхода к диагностике ПНГ на гранулоцитах и моноцитах. Процент ПНГ-позитивных эритроцитов согласно предлагаемой методике, измеряется с более высокой чувствительностью, по сравнению с международным стандартизованным подходом, так как с помощью предлагаемого метода исследуются не менее 1 млн эритроцитов, а согласно ICCS – 5 млн.

Среди 1925 обследованных пациентов ПНГ-клон обнаружен у 547 (30,9%). Размер ПНГ-клона среди ретикулоцитов

варьировали от 0,1 до 99,7% (медиана 70,4%). Минимальные определяемые значения среди популяции гранулоцитов при параллельном определении ПНГ-клона согласно стандартизованному подходу составляли 0,01%, моноцитов – 0,03%, эритроцитов – 0,02%. Корреляция между значением ПНГ-клона среди ретикулоцитов и гранулоцитов составила 0,93%, среди ретикулоцитов и моноцитов 0,95% соответственно. Чувствительность метода составила 99,3%, специфичность – 99,6%.

Таким образом, предложенный нами подход исследования ПНГ-клона среди ретикулоцитов для скрининга ПНГ-клона с использованием проточной цитометрии является надежным, быстрым, экономичным методом, доступным для лабораторий медицинских учреждений разного профиля.

**Финансирование:** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3–12, 14–17, 20–33 см. REFERENCES)

- Кулагин А.Д., Лисуков В.А., Козлов В.А. *Апластическая Анемия*. Новосибирск: Наука; 2008.
- Кулагин А.Д., Лисуков И.А., Птушкин В.В., Шилова Е.Р., Цветаева Н.В., Михайлова Е.А. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению пароксизмальной ночной гемоглобинурии. *Онкогематология*. 2014; 9 (2): 20–8.
- Абдулкадыров К.М. *Клиническая гематология: Справочник*. СПб.: Питер; 2006.
- Идельсон Л.И., Бенисович В.И., Савина Л.С., Радживиловская Е.Г. Оценка сахарозного теста для диагностики пароксизмальной ночной гемоглобинурии. *Проблемы гематологии и переливания крови*. 1972; 17 (8): 55–7.

Поступила 30.11.15

#### REFERENCES

- Josten K.M., Tooze J.A., Borthwick-Clarke C., Gordon-Smith E.C., Rutherford T.R. Acquired aplastic anemia and paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: studies on clonality. *Blood*. 1991; 12: 3162–7.
- Kulagin A.D., Lisukov V.A., Kozlov V.A. *Aplastic Anemia. [Aplasticheskaya Anemiya]*. Novosibirsk: Nauka; 2008. (in Russian)
- Bessler M., Mason P.J., Hillmen P., Miyata T., Yamada N., Takeda J. et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. *EMBO J*. 1994; 13 (1): 110–7.
- Takeda J., Miyata T., Kawagoe K., Iida Y., Endo Y., Fujita T. et al. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell*. 1993; 73 (4): 703–11.
- Ware R.E., Rosse W.F., Hall S.E. Immunophenotypic Analysis of Reticulocytes in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Blood*. 1995; 86 (4): 1586–9.
- Parker C.J. Bone marrow failure syndromes: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematol. Oncol. Clin. North America*. 2009; 23 (2): 333–46.
- Jandl J.H., ed. *Blood. Textbook of Hematology. Physiology of red cells*. 1-st ed. Boston, Mass: Little Brown and Company; 1987.
- Lee G.R., Bithell T.C., Foerster J., Athens J.W., Lukens J.N. Granulocytes-neutrophils. In: *Wintrobe's Clinical Hematology*. 1993; 9: 223.
- Latour R.P., Mary J.Y., Salanoubat C., Terriou L., Étienne G., Mohty M. et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Natural history of disease subcategories. *Blood*. 2008; 112 (8): 3099–106.
- Parker C., Omine M., Richards S., Nishimura J., Bessler M., Ware R. Diagnosis and management of PNH. *Blood*. 2005; 106 (12): 3699–709.
- Borowitz J.M., Craig F.E., DiGiuseppe G.A., Illingworth A.J., Rosse W., Sutherland D.R. et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2010; 78B (4): 211–30.
- Peter Hillmen. The Role of Complement Inhibition in PNH. *ASH Education Book*. 2008; 1: 116–23.
- Kulagin A.D., Lisukov I.A., Ptuшкин В.В., Шилова Е.Р., Тсветаева Н.В., Михайлова Е.А. National recommendations in PNH diagnostics and treatment. *Онкогематология*. 2014; 9 (2): 20–8. (in Russian)
- Saso R., Marsh J., Cevreska L., Szer J., Gale R.P., Rowlings P.A. et al. Bone marrow transplants for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br. J. Haematol*. 1999; 104 (2): 392–6.

15. De Latour R.P., Schrezenmeier H., Mary J.Y. et al. Stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: an ongoing joint study of the AAWP EBMT Group and the French Society of Haematology. In: *35-th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation*. Goteborg, Sweden; 2009: abstract 316.
16. Schrezenmeier H., Shubert J., Luzzatto L. et al. Effects of eculizumab therapy in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) receiving concurrent immunosuppressive therapy for bone marrow insufficiency. *Blood*. 2009; 114: 3012.
17. Soliris Summary of Product Characteristics. Alexion Europe SAS. 2007.
18. Abdulkadyrov K.M. *Clinical Hematology: Guidebook. [Klinicheskaya gematologiya: Spravochnik]*. St. Petersburg: Piter; 2006. (in Russian)
19. Idel'son L.I., Benisovich V.I., Savina L.S., Radzhivilovskaya E.G. Sucrose test for PNH diagnostics. *Problemy gematologii i perelivaniya krovi*. 1972; 17 (8): 55–7. (in Russian)
20. Rosse W.F. Dr Ham's test revisited. *Blood*. 1991; 78 (3): 547–50.
21. Rosse W.F. Variations in the red cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Br. J. Haematol.* 1973; 24 (3): 327–42.
22. Oelschlaegel U., Besson I., Arnoulet C., Sainty D., Nowak R., Naumann R. et al. A standardized flow cytometric method for screening paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) measuring CD55 and CD59 expression on erythrocytes and granulocytes. *Clin. Lab. Haematol.* 2001; 23 (2): 81–90.
23. Sutherland D.R., Kuek N., Azcona-Olivera J., Anderson T. Acton E., Barth D. et al. Use of a FLAER-based WBC assay in the primary screening of PNH clones. *Am. J. Clin. Pathol.* 2009; 132: 564–72.
24. Diep D.B., Nelson K.L., Raja S.M., Pleshak E.N., Buckley J.T. Glycosylphosphatidylinositol anchors of membrane glycoproteins are binding determinants for the channel-forming toxin aerolysin. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 2355–60.
25. Hall S.E., Rosse W.F. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1996; 87: 5332–40.
26. Diep D.B., Nelson K.L., Raja S.M., Pleshak E.N., Buckley J.T. Glycosylphosphatidylinositol anchors of membrane glycoproteins are binding determinants for the channel-forming toxin aerolysin. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 2355–60.
27. Sutherland D.R., Kuek N., Davidson J., Barth D., Chang H., Yeo E. et al. Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 2007; 72B (3): 167–77.
28. Brodsky R.A., Mukhina G.L., Li S. Nelson K.L., Chiurazzi P.L., Buckley J.T. et al. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000; 114: 459–66.
29. Madkaikar M., Gupta M., Jijina F., Ghosh K. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: diagnostic tests, advantages, & limitations. *Eur. J. Haematol.* 2009; 83 (6): 503–11.
30. Marinov I., Kohoutová M., Tkáčová V., Pešek A., Čermák J., Cetkovský P. Clinical relevance of CD157 for rapid and cost-effective simultaneous evaluation of PNH granulocytes and monocytes by flow cytometry. *Int. J. Lab. Hematol.* 2015; 37 (2): 231–7.
31. Sutherland D.R., Acton E., Keeney M., Davis B.H., Illingworth A. Use of CD157 in FLAER-based assays for high-sensitivity PNH granulocyte and PNH monocyte detection. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 2014; 86 (1): 44–55.
32. Ware R.E., Rosse W.F., Hall S.E. Immunophenotypic analysis of reticulocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1995; 86 (4): 1586–9.
33. Tsagarakis N.J., Paterakis G. A simple flow cytometric assay for routine paroxysmal nocturnal hemoglobinuria testing based on immature reticulocytes and granulocytes. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 2012; 82 (4): 259–63.

Received 30.11.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155.1-055.5/7-076.5

Кузьмина Ж.А.<sup>1</sup>, Плясунова С.А.<sup>1</sup>, Жогов В.В.<sup>1</sup>, Сметанина Н.С.<sup>1,2</sup>

## ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД СВЯЗЫВАНИЯ ЭОЗИН-5-МАЛЕИМИДА В ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННОГО СФЕРОЦИТОЗА

<sup>1</sup>Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, 117997, г. Москва, Российская Федерация; <sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, г. Москва, Российская Федерация

*Лабораторная диагностика наследственного сфероцитоза (НС) основывается на обнаружении в периферической крови сфероцитов, снижении индекса сферичности (ИС), снижении осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ). Основываясь на молекулярном дефекте, разработан новый тест диагностики НС на основе связывания внеклеточных фрагментов белка полосы 3 с эозин-5-малеимидом (ЭМА-тест). Целью нашей работы было провести сравнительный анализ чувствительности и специфичности методов, используемых для диагностики НС. Было проанализировано 94 пациента с различными формами анемий. Всем пациентам проведено комплексное клинико-лабораторное обследование, включавшее в том числе исследование ОРЭ, эритроцитометрию и ЭМА-тест как специфические методы диагностики НС. Снижение значения ЭМА-теста было выявлено у 51 (54%) из 94 больных, из них 47 с подтвержденным диагнозом НС. Нормальные значения ЭМА-теста обнаружены в 43 (46%) случаях, из них в 12 – с установленным диагнозом НС. Таким образом, чувствительность ЭМА-теста составила 79%, специфичность – 80%. Наиболее чувствительными методами диагностики остаются ОРЭ (91%) и ИС (до 96%). Но самая высокая специфичность у ЭМА-теста (80%). В настоящее время ни один из используемых методов диагностики НС не может быть использован как универсальный. Для корректной диагностики заболевания необходимо проведение комплексного обследования.*

**Ключевые слова:** наследственный сфероцитоз; ЭМА-тест; лабораторная диагностика; чувствительность; специфичность.

**Для цитирования:** Кузьмина Ж.А., Плясунова С.А., Жогов В.В., Сметанина Н.С. Цитометрический метод связывания эозин-5-малеимида в диагностике наследственного сфероцитоза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (3): 168–172.

DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-3-168-172.

Для корреспонденции: Кузьмина Жанна Андреевна, науч. сотр. отд. оптимизации лечения гематологических заболеваний ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, E-mail: zhanna.kuzminova@fccho-moscow.ru