

АНОНС

Дорогие друзья и коллеги!

Издательство «МЕДИЦИНА» с радостью сообщает вам о создании нового журнала «Архив акушерства и гинекологии им. В. Ф. Снегирева», посвященного различным проблемам женского здоровья.

Главный редактор журнала – доктор медицинских наук, профессор - Соснова Елена Алексеевна.



На страницах журнала мы будем освещать не только актуальные вопросы акушерства, гинекологии, репродуктивной медицины, перинатологии и диагностики, но и будем говорить о женском организме в целом. О влиянии на систему репродукции различных экстрагенитальных заболеваний и лекарственных препаратов, а также о воздействии на различные органы и системы лечебных мероприятий и лекарственных средств, направленных на сохранение репродуктивного потенциала.

Обязательным условием женского здоровья и благополучия, является здоровье потомства. Проблемам влияния на плод различных препаратов, применяемых во время беременности, генетическому консультированию и вопросам фетальной хирургии будет уделено особое внимание.

Мы попытаемся проследить на страницах журнала периоды жизни женщины, начиная с ранних лет.

Приглашаем практических врачей и исследователей, работающих в различных отраслях медицины и фармакологии, которым не безразлично здоровье женщины, принять активное участие в работе над журналом.

Будем благодарны за любую помощь и советы, которые помогут сделать журнал «Архив акушерства и гинекологии им. В. Ф. Снегирева» интереснее, лучше, познавательнее и надеемся что наполнение журнала поможет не только специалистам, но и обычным женщинам быть здоровыми и счастливыми.

Беспрецедентная акция издательства для рекламодателей журнала на весь 2014 год, приуроченная к выходу первого номера журнала «Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева» - скидка в размере 20% при заключении договора на размещение РИМ в двух номерах 2014 года.

Первым 5 рекламодателям, заключившим годовой контракт, дополнительный бонус в виде рекламной статьи (не более 2 полос) **БЕСПЛАТНО!!!**

Только в 2014 году при разовом размещении РИМ в журнале «Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева» скидка в размере 10%.

По всем вопросам, связанным с размещением рекламно-информационных материалов в журнале обращаться в отдел рекламной и выставочной деятельности издательства «Медицина»:

Телефоны: +7 495 678 64 84, моб. тел.: +7 903 724 40 29, e-mail: oao-meditsina@mail.ru

Наше издательство заинтересовано в долгосрочном сотрудничестве и мы внимательны к каждому, кто обратится к нам.

Благодарим вас за доверие к нашим изданиям.

ДЖУРНАЛ КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

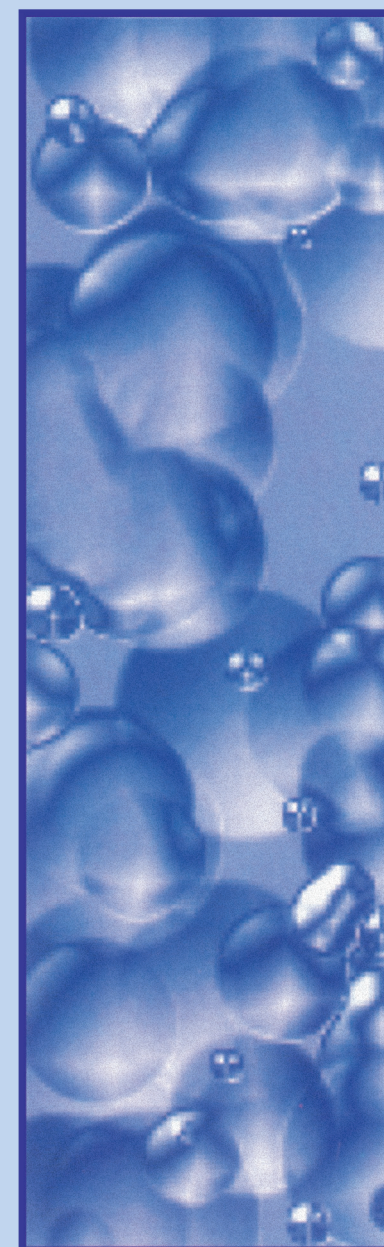
ISSN 0869-2084



7'2014

Том 59

- БИОХИМИЯ
- КОАГУЛОЛОГИЯ
- ГЕМАТОЛОГИЯ
- ЗАОЧНАЯ АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
- ЦИТОЛОГИЯ
- ИММУНОЛОГИЯ
- МИКРОБИОЛОГИЯ



Volume 59 • Issue 7 • 2014
www.medlit.ru

Издательство «МЕДИЦИНА»

НИКОЛАЙ ЕВГЕНЬЕВИЧ КУШЛИНСКИЙ (К 60-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ)



31 августа 2014 г. исполняется 60 лет со дня рождения видного отечественного биохимика, руководителя лаборатории клинической биохимии Российского онкологического научного центра (РОНЦ) им. Н.Н. Блохина РАМН, члена-корреспондента РАМН, профессора, лауреата Государственной премии РФ Николая Евгеньевича Кушлинского.

После окончания в 1977 г. лечебного факультета I ММИ им. И.М. Сеченова Н.Е. Кушлинский поступил в клиническую ординатуру, а затем в аспирантуру в лабораторию клинической биохимии Всесоюзного онкологического научного центра АМН СССР.

В 1982 г. защитил кандидатскую диссертацию "Исследование цитоплазматических рецепторов андрогенов и эстрогенов в злокачественных опухолях и нодулярной гиперплазии предстательной железы", а в 1992 г. — докторскую диссертацию "Гормонально-метаболические нарушения у больных первичными опухолями костей и возможные пути их коррекции". В 1994 г. ему присвоено ученое звание профессора по специальности "онкология".

Н.Е. Кушлинский прошел путь от младшего научного сотрудника до руководителя лаборатории клинической биохимии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, которой руководит с 1993 г. по настоящее время.

Основные научные исследования, проводимые под руководством Н.Е. Кушлинского, посвящены изучению роли опухолевых маркеров и молекулярно-генетических исследований в диагностике злокачественных новообразований, участию гормонов, аутопаракринных факторов роста и их рецепторов, эйкозаноидов, ганглиозидов, протеолитических ферментов, факторов неангиогенеза в механизмах роста, апоптоза, пролиферации и метастазирования опухолей человека. Проведенные исследования позволили разработать и внедрить в клиническую онкологию эффективные методы диагностики и патогенетического лечения предопухолевых процессов слизистой полости рта, эндометрия, а также первичных сарком костей, рака молочной железы. Под руководством Н.Е. Кушлинского разработаны биохимические методы диагностики метастатического поражения костей и оценки чувствительности злокачественных новообразований к гормон- и химиотерапии. Внедрены современные биохимические методы исследования нейроспецифических белков, ферментурии, протеинурии, обеспечивающие раннюю диагностику и своевременное проведение комплексного лечения проявлений нейро-, нефро- и кардиотоксичности проводимой химиотерапии, что существенно улучшает качество жизни онкологических пациентов.

Широкою известность Н.Е. Кушлинскому принесли его многолетние исследования одного из наиболее сложных разделов клинической онкологии — первичных опухолей костей, в частности остеосаркомы. В начале 60-х годов XX столетия 5-лет-

няя выживаемость больных остеосаркомой составила в лучших клиниках мира 7—13%. Использование биохимических показателей, предложенных Н.Е. Кушлинским для оценки биологических характеристик опухоли, а также проведение на их основе соответствующих методов химиотерапии привело к увеличению показателей 5-летней выживаемости больных остеосаркомой до 70%.

Н.Е. Кушлинский — автор более 500 научных работ, опубликованных в отечественной и зарубежной печати, среди них монографии, посвященные опухолевым маркерам, эндогенным регуляторам роста, инвазии и метастазирования раковых клеток, биохимическим методам оценки чувствительности злокачественных новообразований к хими- и гормонотерапии: "Рецепторы стероидных гормонов в опухолях человека" (1987), "Рецепторы половых стероидных гормонов в опухолях костей" (1995), "Клинические и эндокринологические исследования при мастопатии и раке молочной железы" (1998), "Селен в организме человека (метаболизм, антиоксидантные свойства)" (2002), "Рак предстательной железы" (2002), "Рак молочной железы. Тканевые маркеры в оценке метастазирования и прогноза" (2003), "Система активации плазминогена при раке желудка" (2004), "Синдром поликистозных яичников" (2004), "Рак молочной железы" (2005), "Симптомы и синдромы в онкологии" (2005), "Метаболизм и механизм действия андрогенов" (2005), "Гематологические методы исследования" (2013).

Н.Е. Кушлинский обогатил отечественную науку новыми приоритетными биохимическими и молекулярно-биологическими данными в понимании механизмов опухолевой прогрессии, "метастатического потенциала опухоли", разработал оригинальные методы патогенетической терапии злокачественных новообразований. Эти работы принесли ему заслуженный авторитет среди ведущих ученых биохимиков, онкологов, онкоэндокринологов России и Европы. Полученные им данные неоднократно докладывались на международных конгрессах, симпозиумах в странах Европы и США. Высокий методический уровень и широкий спектр биохимических и эндокринологических исследований, проводимых в лаборатории клинической биохимии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН под руководством Н.Е. Кушлинского, позволяет проводить совместные исследования с ведущими научно-исследовательскими институтами и онкологическими центрами нашей страны, СНГ, стран Европы и США, участвовать в разработке международных научных протоколов эффективных методов лечения злокачественных новообразований.

Н.Е. Кушлинский имеет большой опыт в подготовке научных кадров, создал свою школу биохимиков-онкологов. С 2003 г. возглавляет кафедру клинической биохимии и лабораторной диагностики ФПДО Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова Минздрава РФ.

За годы работы в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН им подготовлено 55 кандидатов и 26 докторов наук.

Работы Н.Е. Кушлинского в области биохимии опухолей получили высокую оценку научной общественности и неоднократно удостоивались премий. В 1997 г. Н.Е. Кушлинскому присуждена премия Президиума РАМН в области фундаментальных медицинских исследований за работу "Гормоны и аутопаракринные регуляторы опухолевого роста при остеогенной саркоме". В 1999 г. Н.Е. Кушлинский с коллективом ученых удостоен Государственной премии Российской Федерации в области науки и техники за разработку и внедрение в клиническую практику комбинированных методов лечения остеогенной саркомы.

Профессия медика — это большая ответственность за жизнь и здоровье людей, поэтому требует верности своему делу и высокого профессионализма. Эти качества присущи проф. Н.Е. Кушлинскому.

Редколлегия журнала "Клиническая лабораторная диагностика" искренне поздравляет юбиляра и желает дальнейших творческих свершений, воспитания достойных учеников, личного счастья и крепкого здоровья.



www.medlit.ru

Список журналов, публикуемых в Издательстве «Медицина»

Журнал	Периодичность в полугодие	Индекс
Анестезиология и реаниматология	3	71402 – инд.* 71403 – вед.**
Анналы хирургии	3	72155 72156
Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева	2	70646 70648
Вопросы вирусологии	3	71416
Гематология и трансфузиология	2	71426 72757
Гигиена и санитария	3	71429
Детская хирургия	3	72096 72119
Здравоохранение Российской Федерации	3	73163 73164
Иммунология	3	71492 71493
Клиническая лабораторная диагностика	6	71442 71443
Клиническая медицина	6	71444 71445
Медико-социальная экспертиза и реабилитация	2	47281 47282
Молекулярная генетика, микробиология и вирусология	2	71452 72152
Неврологический журнал	3	72157 72158
Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины	3	73302 72412
Регионарная анестезия и лечение острой боли	2	25100
Российский журнал кожных и венерических болезней	3	48231 48232
Российский медицинский журнал	3	72758 72759
Российский онкологический журнал	3	72159 72160
Российский педиатрический журнал	3	48229 48230
Российская педиатрическая офтальмология	1	36051 36052
Российский стоматологический журнал	3	72301 72302
Социология медицины	1	81769 81770
Физиотерапия, бальнеология и реабилитация	3	81267 81268
Эпидемиология и инфекционные болезни	3	72161 72162

* инд. — индивидуальная подписка (для физических лиц); ** вед. — ведомственная (для юридических лиц).

Подписка через интернет: www.akc.ru, www.pressa-rf.ru

Подписка на электронную версию журналов: www.elibrary.ru



Ä



ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.633.963.42-039.31-076.5-073.175

Наумова Е.В.¹, Плеханова О.С.¹, Луговская С.А.¹, Почтарь М.Е.¹, Бугров И.Ю.¹**ОЦЕНКА И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПНГ-КЛОНА НА РЕТИКУЛОЦИТАХ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ**¹Кафедра клинической лабораторной диагностики ГБОУ ДПО "Российская медицинская академия последипломного образования" Минздрава России, 123995, Москва

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ) — редкое клональное заболевание, при котором происходит соматическая мутация гена *PIG-A* на уровне стволовой гемопоэтической клетки. В результате этого возникает нарушение синтеза гликозилфосфатидилиннзитоливого (GPI) якоря, осуществляющего фиксацию многочисленных молекул на мембране клеток крови, которые защищают клетки крови от воздействия комплемента. Международным обществом клинической цитометрии (2010) предложены методические рекомендации выявления ПНГ-клона среди эритроцитов, гранулоцитов и моноцитов. Нами предложена методика оценки ПНГ-клона в ретикулоцитарной популяции крови с использованием метода проточной цитофлюориметрии. Проанализированы 160 образцов крови пациентов с клиническими признаками ПНГ и анемии. Использовали два способа гейтирования ретикулоцитов — с помощью моноклональных антител к CD71 (рецептор к трансферрину) и реагента BD ReticCount™. Получена высокая корреляция между размером ретикулоцитарного ПНГ-клона, оцененного с помощью CD71, и размером гранулоцитарного и моноцитарного ПНГ-клона. Разработанная панель (CD71/CD235a/CD59) может использоваться для скрининга и мониторинга ПНГ.

Ключевые слова: проточная цитометрия; ПНГ; ретикулоциты; тиазол оранжевый; CD71.

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

THE EVALUATION AND COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF DETECTION OF CLONE OF PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA ON RETICULOCYTES USING THE TECHNIQUE OF FLOW CYTOMETRY

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

The paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is a rare clonal disease characterized by somatic mutation of gene *PIG-A* at the level of stem hematopoietic cell. This process results in disorder of synthesis of glycosyl phosphatidyl innozitol (GPI) anchor fixing numerous molecules on membrane of blood cells which protect blood cells from impact of complement. The international society of clinical cytometry (2010) proposed the guidelines of detection of clone of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria among erythrocytes, granulocytes and monocytes. The original technique is proposed to evaluate the clone of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in reticulocyte population of blood using method of flow cytofluorometry. The sampling of 160 samples of blood of patients with clinical symptoms of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and anemia was analyzed. Two modes of gatedrawing were applied - using monoclonal antibodies to CD71 (receptor to transferrin) and reagent BD ReticCount. The high correlation was established between size of reticulocytic clone of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria evaluated by CD71 and size of granulocytic and monocytic clone of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. The developed panel (CD71/CD235a/CD59) can be applied for screening and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.

Key words: flow cytometry; paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; reticulocyte; thiazole orange; CD71.

Введение. Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ) — редкое приобретенное клональное [1, 2] 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 [2—4]. Данный генетический дефект приводит к нарушению синтеза гликозилфосфатидилиннзитоливого (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 другими редкими симптомами [10, 11]. Патогенез клинических проявлений заболевания связан с гемолизом эритроцитов в результате атаки системой комплемента через образование мембраноатакующего комплекса (МАК), который в норме инактивируется присутствием на эритроцитах GPI-связанного белка CD59 [12]. Молекула CD59 является основным блокатором постоянной активации системы комплемента и защищает клетки от образования на их поверхности МАК.

Первыми методами диагностики ПНГ были сахарозная проба Хартмана—Дженкинса и кислотный метод Хема (1936 г.), когда в слабом растворе сахарозы или при понижении pH сыворотки происходят активация комплемента и видимый глазом гемолиз эритроцитов [9]. Недостатками этих методов являются невозможность количественной оценки результата и слабая чувствительность [13]. С развитием проточной цитометрии разработан протокол по диагностике ПНГ на основе определения дефицита экспрессии CD55 и CD59 на

Для корреспонденции:

Наумова Елена Владимировна, науч. сотр.
Адрес: 123995, Москва, ул. Баррикадная, 2/1
E-mail: e_naum@mail.ru



Ä

эритроцитах [14]. В дальнейшем стало очевидно, что оценка содержания эритроцитов с недостаточным уровнем белков CD55 и CD59 не позволяет судить об истинном размере ПНГ-клона, поскольку эритроциты подвергаются гемолизу, кроме того, после переливания крови изменяется соотношение нормальных и ПНГ-позитивных эритроцитов. Более адекватной является оценка наличия ПНГ-клеток в популяции лейкоцитов [15, 16]. Одновременно показано, что определение экспрессии CD55 не позволяет эффективно выявить эритроциты II и III типов (частично лишенные GPI-якоря и полностью лишенные). После создания реагента FLAER (FLuorescence AERolysin) — бактериального белка, который связывается непосредственно с GPI-якорем, выявление ПНГ-клона среди лейкоцитов стало рутинным тестом [17]. Результаты сравнения различных клонов моноклональных антител разных фирм позволили определить наиболее эффективные и создать протокол, который в настоящее время рекомендован Международным обществом клинической цитометрии как основной протокол диагностики ПНГ [11]. На сегодняшний день проточная цитометрия играет ключевую роль в лабораторной диагностике ПНГ. Достаточно часто у больных ПНГ выявляют большой размер клона среди гранулоцитов и моноцитов и минорный клон или его отсутствие среди эритроцитов, что объясняется хроническим, различной степени выраженности гемолизом, проведением трансфузионной терапии, снижением продолжительности жизни эритроцитов. Оценка ретикулоцитов представляет интерес, поскольку они не подвержены гемолизу и могут отражать истинный размер эритроцитарного ПНГ-клона. Для исследования количества ретикулоцитов могут быть использованы такие маркеры, как тиазол оранжевый, окрашивающий РНК в клетке [18], и CD71 (рецептор к трансферрину). Интенсивность экспрессии CD71 на незрелых ретикулоцитах коррелирует с количеством в них РНК [19].

Целью исследования являются разработка метода оценки ПНГ-клона среди ретикулоцитов и сопоставление его с соответствующим размером ПНГ-клона среди эритроцитов, гранулоцитов и моноцитов у больных ПНГ, апластической анемией (АА), имеющих ПНГ-клон.

Материалы и методы. Материалом для исследования служила периферическая кровь, стабилизированная К₂ЭДТА. Обследовали 160 пациентов, направленных на исследование ПНГ-клона на основании клинической картины, а также лабораторных данных (анемия, высокое содержание ЛДГ, билирубина, отрицательная прямая проба Кумбса). Из них 88 женщин в возрасте от 15 лет до 71 года и 72 мужчины в возрасте от 19 до 59 лет. У 86 (53,7%) пациентов из 160 обнаружили ПНГ-клон.

Исследования проводили на проточных цитометрах FC500 (Beckman Coulter,) и BD (Becton Dickinson, США) с применением гейтирующих антител CD235a (FITC) для эритроцитов, CD71 (APC)/тиазол оранжевый (PE, реагент BD Retic-Count™) для ретикулоцитов, CD15(PE)/CD45(PC-7) для гранулоцитов, CD64(PC-5)/CD45(PC-7) для моноцитов и GPI-связанных белков CD59(PE) для эритроцитов/ретикулоцитов, FLAER(FITC)/CD24(PC-5)-гранулоцитов и FLAER(FITC)/CD14(PE)-моноцитов.

Оценку размера ПНГ-клона на гранулоцитах, моноцитах и эритроцитах проводили согласно международным рекомендациям [11].

Для оценки ПНГ-клона на ретикулоцитах были модифицированы методики, описанные в литературе [19—22]. Размер ПНГ-клона на ретикулоцитах определяли двумя методами.

Гейтирование и анализ ретикулоцитов с помощью моноклональных антител (МКА) к CD71. Для окраски ретикулоцитов периферическую кровь развели в 10 раз. В промаркированную пробирку вносили 10 мкл суспензии эритроцитов и МКА к CD235a, CD71 и CD59 согласно инструкции производителя. После инкубации в течение 20 мин при комнатной температуре проводили отмывание эритроцитов. К образцу добавляли 4 мл PBS (pH 7,3—7,5) в режиме центрифугирования 5 мин с частотой 1500 об/мин. Отмывку повторяли дважды. Готовый образец ресуспендировали, добавляли 750 мкл PBS и анализировали на проточном цитометре.

Для оценки ПНГ-клона среди ретикулоцитов, гейтированных по CD71, применяли трехцветную оценочную панель CD235a (FITC)/CD71 (APC)/CD59(PE).

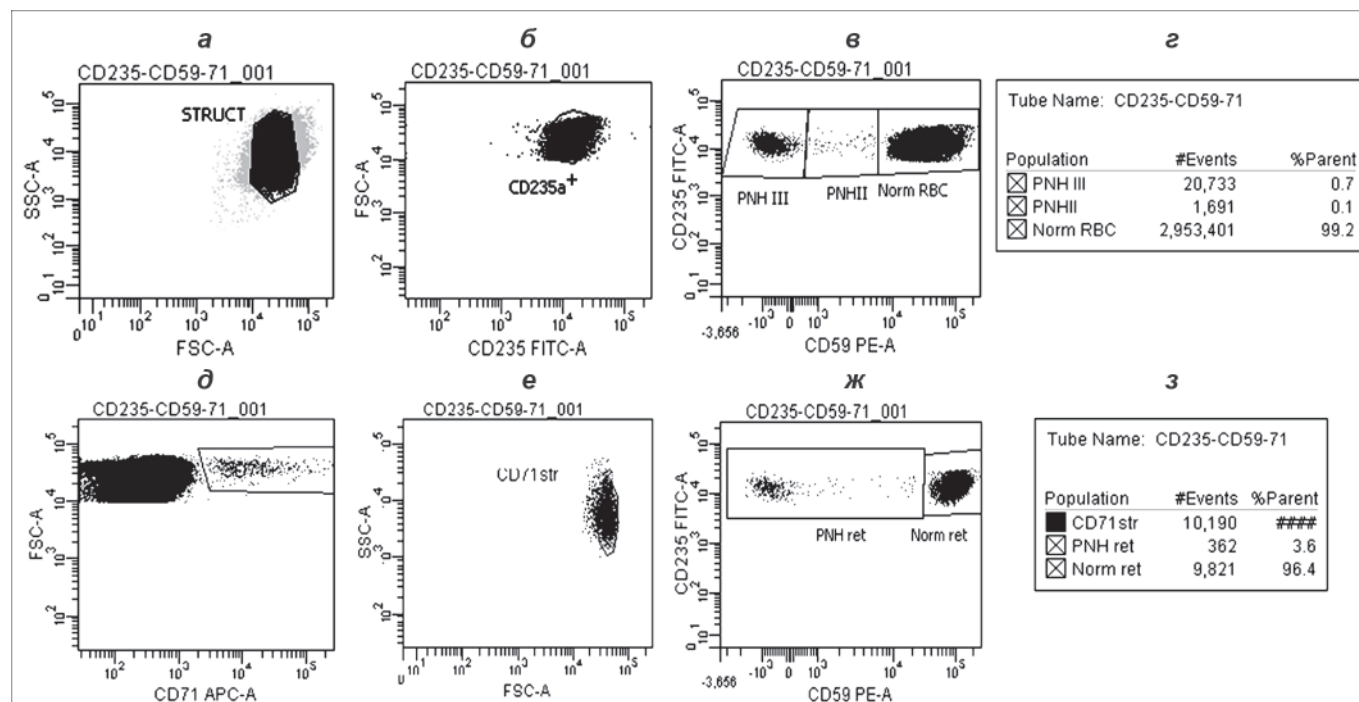


Рис. 1. Стандартный протокол для оценки ПНГ-клона на эритроцитах (а—е) [11]. Схема проведения анализа ПНГ-клона среди ретикулоцитов, выделенных при помощи CD71 (а, б, д—з).

На представленном на графике ПНГ-клон присутствует среди эритроцитов в размере 0,8% (II + III типы) и среди ретикулоцитов в размере 3,6% (II + III типы). PNH ret (ж, з) — гейт, в котором отображен ПНГ-клон на ретикулоцитах.



A

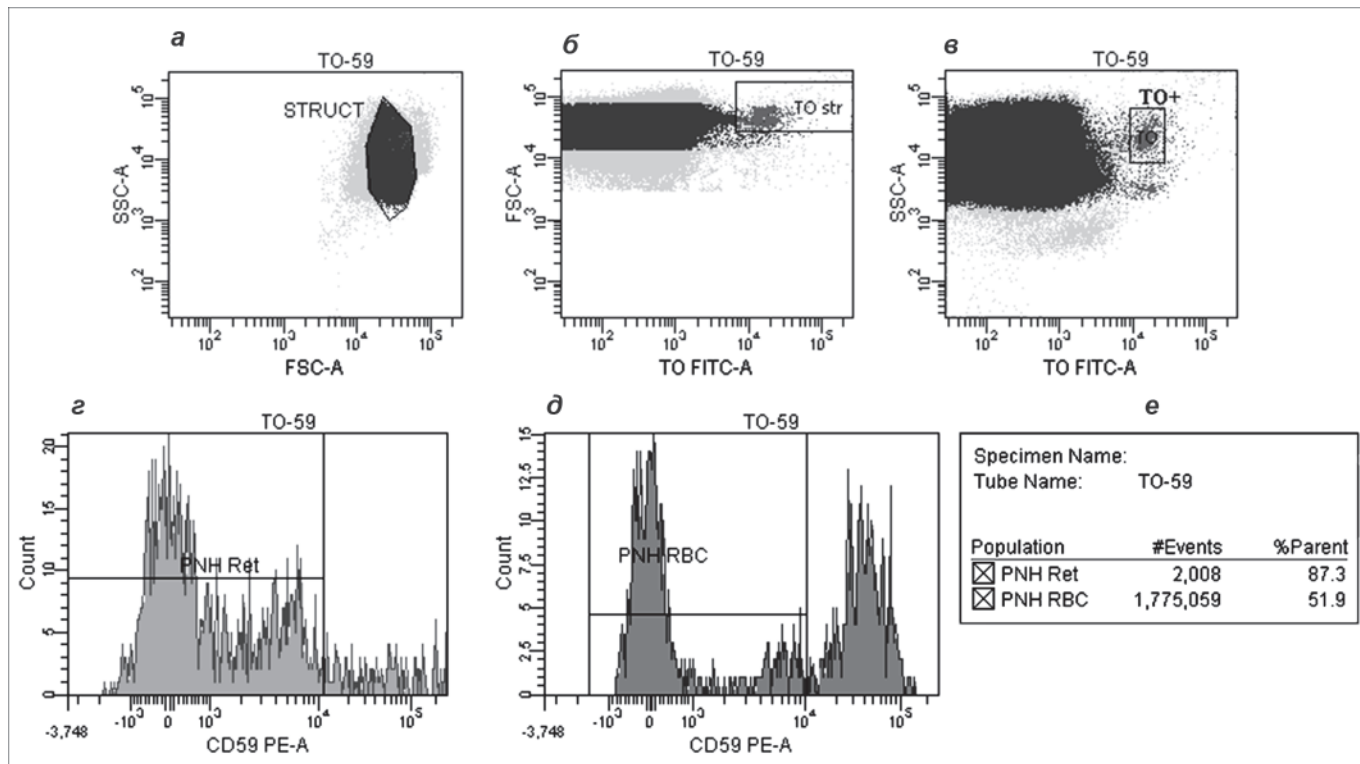


Рис. 2. Проведение анализа ПНГ-клона среди ретикулоцитов, выделенных с помощью тиазол оранжевого (а—с). В данном случае ПНГ-клон присутствует среди эритроцитов в размере 51,9% (II + III типы) (д, е) и среди ретикулоцитов в размере 87,3% (II + III типы) (з, е).

Здесь и на рис. 3: TO — тиазол оранжевый.

Для каждого образца на скатерограмме FS/SS выбирали область, содержащую зрелые и незрелые эритроциты, исключали дебрис, тромбоциты (низкий FS/SS) и дуплеты клеток (рис. 1, а). Область ретикулоцитов на графике FS/SS характеризуется высоким FS. Второй этап гейтирования включал выделение эритроцитов и ретикулоцитов с использованием МКА к CD235a (гликофорин А; рис. 1, б). События, вошедшие в гейт CD235a+/FShigh, анализировали на скатерограмме CD71/FS (рис. 1, д). CD71⁺-ретикулоциты, предварительно очищенные от дебриса по FS/SS (рис. 1, е), в дальнейшем изучали на предмет наличия GPI-связанного белка CD59 (рис. 1, жс). На рис. 1, з и 1, з изображены статистические параметры в виде количества собранных событий в указанных гейтах, а также процент эритроцитов/ретикулоцитов в гейтах относительно общего количества популяции эритроцитов и ретикулоцитов. Стоп-гейт (20 000 событий) выставлен по гейту CD71⁺.

Гейтирование и анализ ретикулоцитов с использованием тиазол оранжевого (ReticCountTM, BD). Для окраски ретикулоцитов периферическую кровь разводили в 10 раз. В промаркированную пробирку вносили 10 мкл суспензии эритроцитов и МКА к CD59 согласно инструкции. После инкубации 20 мин при комнатной температуре к образцу добавляли 500 мкл тиазол-оранжевого (реагент ReticCount). Далее проводили инкубацию с тиазол-оранжевым в течение 60 мин в термостате при температуре 37°C. После инкубации клетки отмывали дважды PBS (4 мл) в режиме центрифугирования 5 мин с частотой 1500 об/мин. Готовый образец ресуспендировали, добавляли 750 мкл PBS и анализировали на цитометре.

На рис. 2 выделенную по FS/SS популяцию (STRUCT, рис. 2, а) далее оценивали на наличие РНК-содержащих клеток, окрашенных тиазол-оранжевым (рис. 2, б) (в основной массе популяция представлена ретикулоцитами, но в гейт могут попасть также и мелкие по размеру лимфоциты, тельца Жолли и кольца Кебота). Популяция в гейте TO str (см. рис. 2, б) дополнительно очищалась по боковому светорассеиванию

(тиазол-оранжевый, SS, рис. 2, в). В выделенной популяции ретикулоцитов определяли экспрессию CD59 и соответственно, наличие или отсутствие ПНГ-клона (рис. 2, з). Параллельно можно оценить ориентировочное значение клона на эритроцитах, выделенных по FS/SS (рис. 2, д).

Результаты и обсуждение. Из 160 пациентов, направленных на исследование ПНГ-клона, у 99 содержание ретикулоцитов изучали на основании определения экспрессии CD71, у 9 использовали метод с Retic-Count (тиазол-оранжевый). У 52 больных проводили параллельное исследование содержания ретикулоцитов обоими методами.

Из 86 пациентов с ПНГ-клоном у 9 исследование уровня ретикулоцитов проводили только при помощи BD Retic-Count; у 51 изучали экспрессию CD71; у 26 провели параллельное исследование содержания ретикулоцитов обоими методами. Во всех случаях среди ретикулоцитов выявили ПНГ-клон, сопоставимый с таковым среди гранулоцитов и

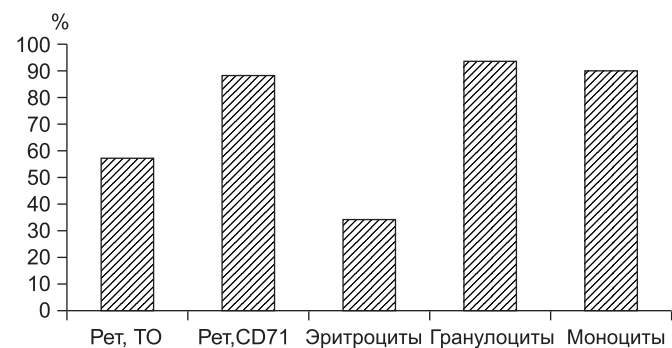


Рис. 3. Медианы значений ПНГ-клона ретикулоцитов при использовании тиазол-оранжевого, CD71, а также медиана ПНГ-клона эритроцитов, гранулоцитов и моноцитов.

Рет — ретикулоциты.



A

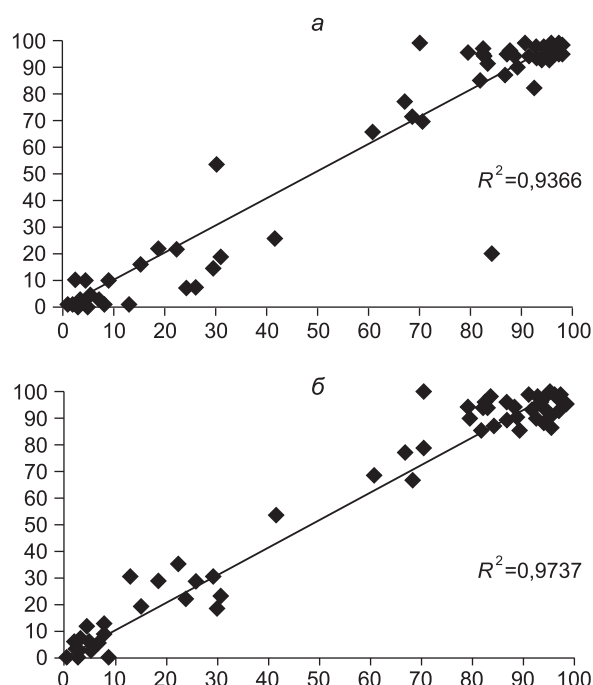


Рис. 4. Корреляционная зависимость между содержанием ретикулоцитов и лейкоцитов.

Ретикулоциты, гейтированные по CD71, показывают высокий коэффициент корреляции по отношению к гранулоцитам (а) и моноцитам (б). По оси абсцисс — размер (в %) ПНГ-клона среди ретикулоцитарной популяции (CD71). Здесь и на рис. 5 по оси ординат: а — размер (в %) ПНГ-клона среди гранулоцитов; б — размер (в %) ПНГ-клона среди моноцитов.

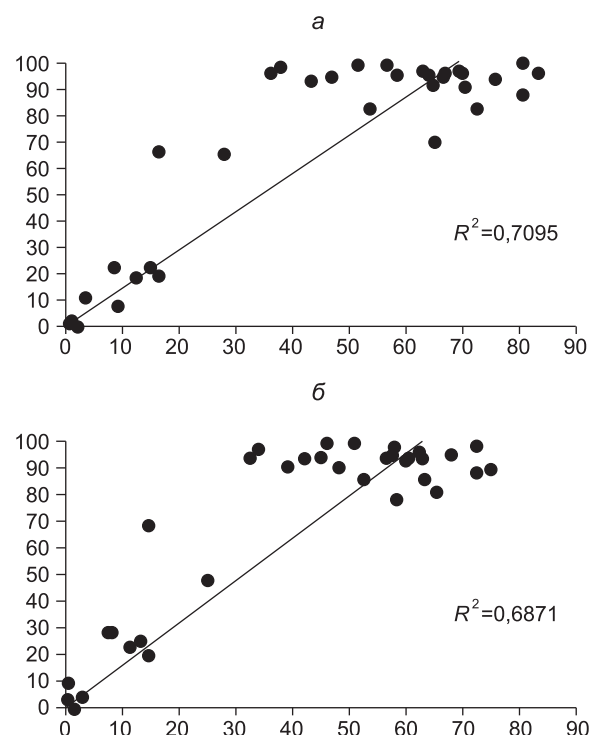


Рис. 5. Корреляционная зависимость между содержанием ретикулоцитов и лейкоцитов.

Ретикулоциты, гейтированные по тиазол оранжевому, показывают невысокий коэффициент корреляции по отношению к гранулоцитам (а) и моноцитам (б). По оси абсцисс — размер (в %) ПНГ-клона среди ретикулоцитарной популяции.

моноцитов. При отсутствии ПНГ-клона среди лейкоцитов сходные результаты получили и в популяции ретикулоцитов.

ПНГ-клон среди эритроцитов обычно разделяется на три подгруппы: I тип (нормальные клетки); II тип (частичный дефицит CD59); III тип (полный дефицит CD59).

При анализе содержания ретикулоцитов (при выделении любым способом) положительный ПНГ-клон чаще всего может быть оценен только в виде суммарной CD59-дефицитной или негативной популяции (II + III типы).

Медианы значений ПНГ-клонов среди гранулоцитах составляли 93,1 (0,1—99,5%); моноцитов 90,3 (0—99,3%); эритроцитов (II + III типы) 35,6 (0,2—91,4%); ретикулоцитов, выделенных по CD71, 87,6 (3,1—98,3%); ретикулоцитов, выделенных при помощи тиазол оранжевого, 57,4 (0,9—83,2%) (рис. 3).

Как показано на рис. 3, самое низкое значение медианы ПНГ-клона выявили в популяции эритроцитов, что объясняется их повышенным разрушением в сосудистом русле за счет комплементзависимого гемолиза. По сравнению с эритроцитами медиана ПНГ-клона ретикулоцитов, выделенных при использовании тиазол оранжевого, значительно выше. Медиана значений ПНГ-клона ретикулоцитов, выделенных с помощью CD71, больше совпадает с медианой ПНГ-клона моноцитов и гранулоцитов.

В работе провели корреляционный анализ соответствия значений ПНГ-клонов на гранулоцитах, моноцитах и ретикулоцитах, оцененных с помощью обоих методов (рис. 4, 5).

Заключение. Согласно международному протоколу диагностики ПНГ [11], оценку патологического ПНГ-клона проводят среди гранулоцитов, моноцитов и эритроцитов. Однако вследствие комплементопосредованного внутрисосудистого гемолиза и соответственно низкой продолжительности жизни, а также в связи с проведением частых гемотрансфузий истинный размер ПНГ-клона оценить не представляется возможным. В связи с этим мы провели исследование уровня

ретикулоцитов как наименее подверженных гемолизу клеток красного ростка. В зарубежной литературе имеются немногочисленные исследования уровня ретикулоцитов [18—24]. Данные по использованию CD71 противоречивы. Так, авторы S. Serke и D. Nuhn констатируют факт несостоятельности рецептора к трансферрину как маркера ретикулоцитов [21]. Однако в других источниках предлагается использовать этот маркер как подходящий для диагностики ПНГ [19, 20].

В работе N.J. Tsagarakis и соавт. [23] проведена оценка ПНГ-клона на ретикулоцитах у 15 больных с ПНГ и АА, выделенных с использованием CD71, и сопоставлена со значениями ПНГ-клона на гранулоцитах, выделенных с помощью CD66b/CD16/CD45 и CD59/CD24/CD45 [22]. Размер ПНГ-клона среди ретикулоцитов и гранулоцитов оказался сопоставим. Полученные нами результаты сопоставимы с данными этих авторов как с использованием CD71, так и Retic-Count [24].

Таким образом, наши данные подтверждают возможность использования ретикулоцитов для оценки ПНГ-клона.

Из двух методов выделения популяции ретикулоцитов наиболее удобным является использование CD71 в качестве гейтирующего маркера. Методика использования реагента BD ReticCount подразумевает длительную инкубацию, а также отмывку проточной системы до и после проведения анализа, что неудобно. Кроме того, помимо РНК, реагент окрашивает и ДНК, поэтому в ретикулоцитарный гейт могут попасть включения эритроцитов, такие как тельца Жолли и кольца Кебота. По прямому и боковому светорассеиванию в гейте также могут оказаться большие по размеру тромбоциты, лимфоциты, что изменяет процент определяемых клеток.

Таким образом, мы предложили исследовать для оценки ПНГ-клона ретикулоцитарную популяцию с использованием трехцветной комбинации МКА (CD71(АPC)/CD235a (FITC)/CD59(PE)). Такой подход позволяет уменьшить трудозатраты, провести скрининг и более точно оценить размер ПНГ-клона по сравнению с эритроцитами.