

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
ТРАНСФУЗИОЛОГИИ И МЕДИЦИНСКИХ БИОТЕХНОЛОГИЙ»

Объект авторского права

УДК 616.155.194.113–056.7–053.2–092–071(043.3)

МИЦУРА
Екатерина Федоровна

**НАСЛЕДСТВЕННЫЙ СФЕРОЦИТОЗ У ДЕТЕЙ:
МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ЭРИТРОЦИТОВ И НОВЫЕ АСПЕКТЫ
ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

по специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови

Минск, 2024

Научная работа выполнена в Государственном учреждении образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Научный руководитель: **Волкова Людмила Ивановна**
кандидат медицинских наук, доцент
доцент кафедры детской онкологии, гематологии и иммунологии ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Официальные оппоненты: **Слобожанина Екатерина Ивановна,**
член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник государственного научного учреждения «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»;
Потапова Вера Евгеньевна, кандидат медицинских наук, доцент; доцент кафедры педиатрии №2 Учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».

Оппонирующая организация: Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

Защита состоится 17 апреля 2024 года в 14.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.11.01 при государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» по адресу: 220053, г. Минск, Долгиновский тракт, 160. E-mail: erasiuk@blood.by. Телефон +375 17 271-35-02.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий».

Автореферат разослан «13» марта 2024 года.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций Д 03.11.01,
кандидат биологических наук



Е.Д. Расюк

ВВЕДЕНИЕ

Гемолитические анемии (ГА) у детей являются важной медицинской проблемой, так как по своей распространенности данная патология занимает второе место в структуре всех анемий среди детского населения [Климкович Н.Н. и др., 2012; Blanc L., с 2021]. Однако, до настоящего времени эпидемиологические исследования по изучению заболеваемости, распространенности и структуре ГА у детей в Республике Беларусь не проводились.

ГА гетерогенны по этиологии и патогенезу [Gallagher P.G., 2021; Noronha S.A., 2016]. Чаще выявляются мембранопатии, прежде всего, наследственный сфероцитоз (НС), клиническая картина которого характеризуется значительным полиморфизмом [Coetzer, T. L., 2021]. Для диагностики НС определены и широко используются показатели гематологических параметров [Christensen R., 2013; Weiss N.M., 2020]. Однако, традиционная диагностика не всегда информативна, длительна и диктует необходимость внедрения дополнительных ранних и специфических предикторов при НС [Silva R., 2022].

В патогенезе НС играет роль генетически обусловленные дефекты структуры белков мембраны эритроцитов и их цитоскелета [Vercellati C., 2022]. Однако, имеются лишь единичные сведения о морфофункциональном состоянии эритроцитов и антиоксидантной системе крови при НС [Ghoti H., 2011; Rocha S., 2020]. Изучение морфологических параметров, механических свойств мембран и показателей про- и антиоксидантной системы позволят спрогнозировать тяжесть клинического течения НС [Huisjes R., 2020].

Для диагностики НС традиционно используется тест осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ). Классический тест ОРЭ недостаточно объективен, не всегда выявляет легкие и бессимптомные формы, не информативен у детей первых нескольких месяцев жизни и может быть ложно-отрицательным при механической желтухе [Roper D., Layton M., 2016]. В связи с этим для диагностики НС предложены новые подходы и методы, обладающие высокой чувствительностью, таких как оценка ОРЭ с помощью проточной цитометрии [Shahal-Zimra Y., 2021] и тест с красителем эозин-5-малеимидом (ЕМА) [King M.J., 2015]. На сегодняшний день, данные методики требуют стандартизации и разработки четких диагностических критериев НС [Glenthøj A., 2020].

Таким образом, уточнение морфофункциональных характеристик эритроцитов и внедрение новых диагностических тестов позволит повысить качество диагностики и оказания медицинской помощи пациентам с НС.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами, темами

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям научных исследований в области медицины и фармации на 2016–2020 гг., утвержденным постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12.03.2015 г. № 190 «О приоритетных направлениях научных исследований Республики Беларусь на 2016–2020 гг.»: Технологии профилактики, диагностики и лечения заболеваний; охрана здоровья матери и ребенка, а также пункту 2 «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства» из перечня «Приоритетные направления научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 годы», утвержденного Указом Президента Республики Беларусь от 07.05.2020 № 156 – «здоровье матери и ребенка».

Диссертация выполнена в рамках проекта ГПНИ «Фундаментальные и прикладные науки – медицине», подпрограмма 3 «Новые технологии купирования заболеваний»; тема «Разработать биоинженерные технологии для повышения репаративных процессов в органах и тканях» № ГР 20160569 (сроки выполнения 2016–2020 гг.).

Цель исследования: повысить качество диагностики наследственного сфероцитоза на всех уровнях оказания медицинской помощи детям на основе изучения клинико-лабораторных параметров.

Задачи:

1. Изучить заболеваемость гемолитическими анемиями за период 2005–2020 гг., оценить структуру гемолитических анемий и распространенность наследственного сфероцитоза у детей в Республике Беларусь.

2. Определить значимость клинико-лабораторного спектра показателей в диагностике наследственного сфероцитоза у детей.

3. Оценить морфологические параметры и механические свойства мембран эритроцитов, показатели про- и антиоксидантной системы, и установить их связь с тяжестью течения наследственного сфероцитоза.

4. Адаптировать методы диагностики наследственного сфероцитоза у детей на основе проточной цитометрии.

Объект исследования – дети с гемолитической анемией (наследственной или приобретенной) от рождения до 18 лет.

Предмет исследования – заболеваемость и структура ГА в Республике Беларусь, клинико-гематологические параметры,

морфологические показатели эритроцитов, состояние про- и антиоксидантной системы плазмы крови и эритроцитов у пациентов детского возраста с НС.

Научная новизна

Впервые проведен анализ заболеваемости и структуры ГА у детей в Республике Беларусь, установлена распространенность НС в педиатрической популяции.

Установлены дополнительные гематологические показатели для диагностики НС у детей, их пороговые значения у детей разных возрастных групп.

Впервые у пациентов детского возраста с НС с помощью атомно-силовой микроскопии выявлена неоднородность структуры мембранного цитоскелета эритроцитов для дискоцитов и изменение ее степени, связанное с процессом трансформации дискоцитов в сфероциты.

Впервые установлена высокая диагностическая значимость оценки на проточном цитометре осмотической резистентности эритроцитов.

Положения, выносимые на защиту

1. Средняя заболеваемость гемолитическими анемиями в Республике Беларусь в период с 2005 по 2020 гг. составила 1,79 на 100 тыс. детского населения без значимого изменения динамики роста. Впервые выявленные случаи гемолитических анемий регистрируются преимущественно у детей первого года жизни (69,6%). Наследственный сфероцитоз составляет 50,4% в структуре впервые выявленных гемолитических анемий, его распространенность в Беларуси – 8,18 на 100 тыс. детского населения.

2. Индексы $MCHC/Ht$, $Hb/MCHC$, Hb/RDW , $MCHC/MCV$ и $MCHC/RDW$ являются ранними и высокоспецифичными предикторами наследственного сфероцитоза. Их диагностически значимые уровни зависят от возраста: у детей первого года жизни $MCHC/Ht > 1,06$, $Hb/MCHC \leq 3,11$, $Hb/RDW \leq 7,26$, $MCHC/MCV > 0,45$; $MCHC/RDW \leq 2,04$; у детей старше 1 года – $Hb/RDW \leq 9,69$; $MCHC/RDW \leq 2,49$; $Hb/MCHC \leq 3,65$; $MCHC/Ht > 0,96$; $MCHC/MCV > 0,44$.

3. При наследственном сфероцитозе мембранный скелет эритроцитов обладает неоднородностью пространственной организации, степень которой значительно снижается при переходе от дискоцитов к сфероцитам, что сопровождается увеличением фрактальной размерности (D_F) и снижением лакуарности (λ) для карт латеральных сил участков поверхности клеток при атомно-силовой микроскопии. У пациентов с наследственным сфероцитозом снижена способность плазмы крови к подавлению люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ)

радикалообразующей смеси (36% vs 52% у здоровых лиц, $p < 0,0001$), характеризующей оксидативный стресс, прямо связанный со степенью тяжести заболевания.

4. Определение осмотической резистентности эритроцитов (нативных и после 24-часовой инкубации) с оценкой доли сохранных клеток в различных концентрациях солевого буфера с помощью проточной цитометрии имеет диагностическую чувствительность 93,9% и специфичность 83,3% и является эффективным методом диагностики наследственного сфероцитоза. Определение отношения средней интенсивности флюоресценции (СИФ) исследуемой пробы в тесте связывания ЕМА к среднему значению СИФ контрольных образцов при значении $\leq 0,79$ соответствует чувствительности теста 100% и специфичности – 98,6%.

Личный вклад соискателя ученой степени

Постановка проблемы, формулировка целей и задач исследования, положений, выносимых на защиту, внедрение в практику результатов исследования проведены совместно с научным руководителем. Автором единолично выполнен патентно-информационный поиск, осуществлялось клиническое наблюдение пациентов, изучена медицинская документация. Лабораторные исследования выполнены сотрудниками ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» (ГУ «РНПЦ РМиЭЧ»). Исследования параметров про- и антиоксидантной системы плазмы крови и эритроцитов у пациентов с ГА, атомно-силовая микроскопия (АСМ) проводились совместно с сотрудниками УО «Гомельский государственный медицинский университет». Автором создана компьютерная база данных, проведена статистическая обработка, проведены анализ и интерпретация полученных результатов, изложение результатов исследования в виде диссертационного материала. Личный вклад соискателя составил 90%.

В совместных публикациях вклад соискателя составил: [1] – 100%, [2–4; 6; 8; 12; 13; 16–18; 23–28] – 95%, [14; 15; 22; 29; 31] – 90%, [9; 10; 30] – 80%, [5; 7; 11; 19–21] – 60%. В инструкции по применению [32] – 80%.

Апробация результатов диссертации

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: IX Съезде педиатров Республики Беларусь (Минск, 17–18 ноября 2011 г.); Республиканской науч.-практ. конференции «Актуальные проблемы медицины», посв. 20-летию ГомГМУ (Гомель, 24 февраля 2011 г.); Республиканской науч.-практ. конференции с междунар. участием «Междисциплинарный подход в современной детской гематологии»

(Минск, БелМАПО, 19 октября 2017 г.); VIII Съезде гематологов и трансфузиологов Республики Беларусь (Минск, 26–27 октября 2017 г.); Республиканской науч.-практ. конференции с междунар. участием «Актуальные проблемы медицины» и 27-й итоговой сессии ГомГМУ (Гомель, 2–3 ноября 2017 г.); Международной науч.-практ. конференции «Современные проблемы радиационной медицины: от науки к практике» (Гомель, ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 26–27 апреля 2018 г.); Республиканской науч.-практ. конференции с междунар. участием «Мультидисциплинарный подход к диагностике и лечению коморбидной патологии» (Гомель, ГомГМУ, 29–30 ноября 2018 г.); Международной науч.-практ. конференции «Современные проблемы радиационной медицины: от науки к практике» (Гомель, ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 23–24 мая 2019 г.); Международной науч.-практ. конференции «Современные проблемы радиационной медицины: от науки к практике» (Гомель, ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 19 июня 2020 г.); Республиканской науч.-практ. видеоконференции «Анемии матери и ребенка» (Гомель, ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 27 ноября 2020 г.); Международной науч.-практ. конференции «Современные проблемы радиационной медицины: от науки к практике» (г.Гомель, ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 29 апреля 2021 г.); Республиканской науч.-практ. конференции «Актуальные вопросы гематологии. Анемии матери и ребенка» (Гомель, ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 15 декабря 2022 г.).

Опубликованность результатов диссертации

По тематике исследования опубликована 31 научная работа, из них 11 статей в рецензируемых журналах ВАК Республики Беларусь, 1 статья в рецензируемом журнале ВАК Российской Федерации, 1 статья в зарубежном журнале (IF 2,576), 10 статей и 8 тезисов в сборниках материалов конференций. Утверждена 1 инструкция по применению. В моноавторстве опубликована 1 статья. Общее количество опубликованных материалов составляет 10,0 авторских листов.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 122 страницах печатного текста и состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы (глава 1), характеристики материала и методов исследования (глава 2), результатов собственных исследований (главы 3–5), заключения, библиографического списка (172 работы, из них 30 – на русском языке, 142 – на английском языке), собственных публикаций соискателя – 32. Диссертационная работа содержит 20 рисунков, 21 таблицу, 3 приложения.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материал и методы исследования

Изучены показатели заболеваемости, структура ГА (в период с 2005 по 2020 гг.) и распространенность ГА у детей от 0 до 18 лет. Данные о впервые выявленных случаях ГА предоставлены Республиканским научно-практическим центром медицинских технологий, информации, управления и экономики здравоохранения Республики Беларусь. Структура ГА изучена по данным статистической отчетности ГУ «РНПЦ РМиЭЧ» и ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии». Клиническая часть исследования выполнена на базе ГУ «РНПЦ РМиЭЧ». Применялись методы исследования: гематологические, биохимические, оптическая и атомно-силовая микроскопия, проточная цитометрия для определения осмотической резистентности эритроцитов и теста ЕМА, люминолзависимая хемилюминесценция (ЛЗХЛ) для оценки состояния про/антиоксидантного баланса плазмы крови.

Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием программ Microsoft Excel 2010 и Statistica V.6.1 для Windows (StatSoft, Inc., США). Расчет доверительных интервалов (95% ДИ) проводился с помощью откорректированного метода Вальда. Анализ наступления событий проводился с помощью метода Каплан – Мейера. ROC-анализ выполнен с использованием программы MedCalc 11.3 (MariaKerke, Бельгия). Статистически значимым считался уровень значимости $p < 0,05$.

Эпидемиологическая характеристика и структура гемолитических анемий у детей в Республике Беларусь

Проведен анализ заболеваемости ГА детей и подростков в возрасте от 0 до 18 лет по Республике Беларусь в целом и по различным ее регионам за 16-летний период (2005–2020 годы). За изучаемый период в Республике Беларусь выявлено 522 случая ГА у детей. Максимальное абсолютное количество случаев ГА выявлено в Минской области (95), минимальное – в Могилёвской области (52). Средний многолетний показатель заболеваемости ГА в целом по Республике Беларусь составил 1,79 случаев на 100 тыс. детского населения в год.

При этом средний многолетний показатель заболеваемости ГА по регионам достоверно не отличался от показателя по Республике Беларусь в целом ($p > 0,05$) и составил по Брестской области – 1,57, по Витебской области – 2,19, по Гомельской области – 1,62, по Гродненской области – 2,40, по городу Минску – 1,34, по Минской области – 2,11, по

Могилевской области – 1,59 случаев на 100 тыс. детского населения. Сравнительный попарный анализ средних многолетних показателей между регионами выявил, что показатель заболеваемости в Гродненской области был выше, чем в городе Минске ($p=0,036$).

Для оценки динамики заболеваемости проанализированы «грубые» интенсивные показатели заболеваемости на 100 тыс. детского населения Республики Беларусь за 2005–2020 годы (рисунок 1). С помощью линейного регрессионного анализа построен тренд заболеваемости ГА детей.

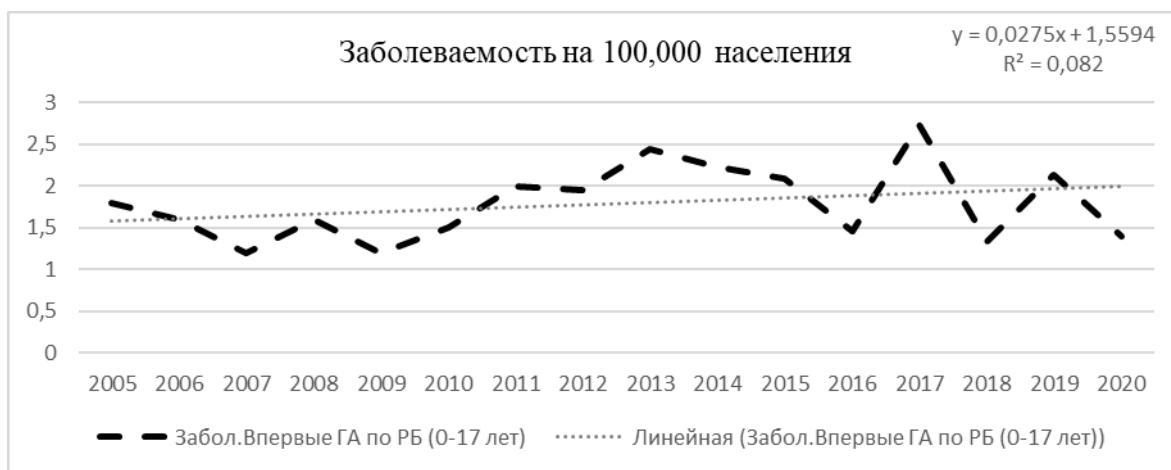


Рисунок 1 – Заболеваемость ГА на 100 тыс. населения у детей в Республике Беларусь за 2005–2020 годы

Анализ динамики заболеваемости с помощью метода построения регрессионных моделей показал, что динамика количества впервые выявленных случаев ГА была стабильна, темп прироста составил ($b=0,5\pm0,95$ случаев в год; $p>0,05$). Среднегодовой темп прироста заболеваемости ГА за оцениваемый период составил $b=0,03\pm0,05$ случаев в год или 1,3% (-1,5–4,2) % в год; $p>0,05$.

Анализ заболеваемости ГА в различных возрастных группах показал, что за исследуемый 16-летний период максимальное количество случаев ГА регистрировалось у детей первого года жизни – 185 (заболеваемость в этой возрастной группе 11,0 на 100 тыс. детского населения данной возрастной группы). В возрасте от 1 до 4 лет – 173 случая (2,5 на 100 тыс.), от 5 до 9 лет – 75 случаев (1,0 на 100 тыс.), от 10 до 14 лет – 57 случаев (0,7 на 100 тыс.), от 15 до 17 лет – 32 (0,6 на 100 тыс.). Таким образом, заболеваемость ГА с возрастом убывает, в ее структуре 69,6% приходится на детей первого года жизни, 15,9% - на возрастную группу 1–4 лет, 6,0% – на возрастную группу 5–9 лет, 4,7% – на группу 1–14 лет и 4,0% – на группу 15–17 лет.

Для анализа структуры ГА у детей и подростков были изучены статистические данные о впервые установленном диагнозе ГА в РНПЦ

РМиЭЧ и РНПЦ ДОГИ за период с 2005 по 2020 годы, в которых суммарно было выявлено 387 случаев ГА, что составило 74,1% (70,2–77,7) от республиканского показателя за аналогичный период (522 случая). Структура ГА по нозологическим формам согласно Международной классификации болезней 10 пересмотра (МКБ-10) представлена в таблице 1.

Таблица 1. – Структура впервые выявленных ГА у детей и подростков по данным РНПЦ РМиЭЧ и РНПЦ ДОГИИ за период 2005 по 2020 годы

Форма ГА (коды МКБ-10)	Абс.	%; 95% ДИ
Наследственные формы ГА , в том числе	281	72,6; 68,0–76,8
Анемия вследствие ферментных нарушений (D55)	13	3,4; 1,9–5,7
Талассемия (D56)	31	8,0; 5,7–11,2
Наследственный сфероцитоз (D58.0)	195	50,4; 45,4–55,3
Другие наследственные ГА уточненные (D58.1, D58.2, D58.8)	4	1,0; 0,3–2,7
Наследственная неуточненная ГА (D58.9)	38	9,8; 7,2–13,2
Приобретенные формы ГА , в том числе	106	27,4; 23,2–32,0
Аутоиммунная ГА (D59.1)	64	16,5; 13,2–20,6
Другие уточненные приобретенные ГА (D59.0, D59.4, D59.5, D59.8)	31	8,0; 5,7–11,2
Неуточненные приобретенные ГА (D59.9)	11	2,8; 1,5–5,1
Всего	387	100,0

Как видно из представленных данных, в структуре впервые выявленных ГА чаще встречались наследственные формы – у 72,6% детей, реже приобретенные формы – у 27,4%. В структуре ГА у детей преобладал НС, который составил 50,4% (45,4–55,3) из общего числа ГА у детей, и 69,4% (63,8–74,5) – из числа наследственных форм ГА.

Исходя из общего числа состоящих на диспансерном учете по поводу ГА в Республике Беларусь на конец 2020 года – 16,1 на 100 000 детского населения, можно рассчитать примерную распространенность НС, как наиболее часто встречающейся формы ГА. Она составит 8,18 (6,82–9,52) на 100 000 детского населения, или 1 случай на 12,2 тыс. детского населения (в диапазоне от 1/14,7 до 1/10,5 тыс. детского населения), что гораздо меньше, чем в европейской популяции (не менее одного случая на 2,5–5 тыс. населения) [Blank L., Wolfe L.C., 2021].

Анализ клинического течения и осложнений НС

Возраст пациентов с НС на момент постановки диагноза составил от 0 месяцев до 17 лет, медиана возраста составила 1 год и 3 месяца

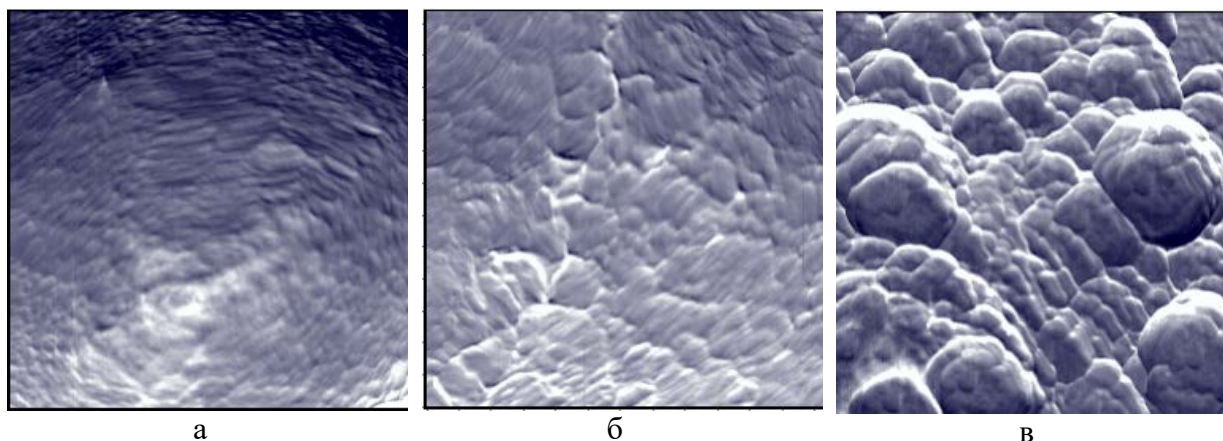
(2 месяца – 7 лет). Согласно анализу по методу Каплан – Мейера, половина пациентов была диагностирована в течение 1 года 2 месяцев от рождения. При анализе родословной 48 пациентов выявлено, что у 36 (75%; 61–85%) ближайшие родственники (мать, отец, брат или сестра) страдают НС. Оценивалась степень тяжести НС. Легкие формы выявлены у 24 пациентов (42,9%), среднетяжелые – у 21 пациента (37,5%), тяжелые – у 11 пациентов (19,6%). Пациентов с минимальной (бессимптомной) формой выявлено не было. Различий в возрасте установления диагноза НС в зависимости от степени тяжести не выявлено (тест Краскела-Уолиса, $H=0,33$; $p=0,85$).

За время наблюдения по клиническим показаниям у 15 пациентов (31%) была выполнена спленэктомия в возрасте от 4 до 26 лет, медиана – 15 лет (10–18), «медиана выживаемости» – 19 лет. Ни у одного пациента не было постспленэктомического сепсиса. Желчнокаменная болезнь (ЖКБ) была выявлена у 10 пациентов (21%) за время наблюдения, в возрасте от 6 до 20 лет (медиана 15,5; 10–17). Согласно анализу методом Каплана-Мейера, у 50% пациентов с НС ЖКБ развивается до возраста 18 лет. Холецистэктомия была выполнена 4 пациентам (в возрасте 19, 22, 23, 25 лет), в одном случае она выполнена вместе со спленэктомией.

Морфологическая характеристика, нано- и микроархитектоника и механические свойства поверхности эритроцитов детей с НС

На поверхности некоторых клеток с помощью АСМ выявлены гранулоподобные структуры. Размер гранул равен 258 ± 32 нм ($n=42$). На картах механических свойств (картах латеральных сил) поверхности гранул проявляется рисунок, характерный для поверхности эритроцитов, и который обусловлен структурой и свойствами мембранного скелета эритроцитов – актин-спектриновой сети. Предположительно гранулами являются микровезикулы, образованные при отшнуровании от клетки части плазматической мембраны с подлежащим под ней цитоскелетом. В пользу этого предположения свидетельствует и тот факт, что диаметр сфероцитов с гранулами на поверхности ($D=6,39 \pm 0,20$ мкм, $n=58$), т. е. в процессе везикуляции, существенно больше диаметра сфероцитов без гранул ($D=5,88 \pm 0,16$ мкм, $n=19$, $p<0,05$), когда возможности для везикуляции исчерпаны.

Качественный анализ карт механических свойств микромасштабных участков поверхности различных форм клеток показывает, что актин-спектриновая сеть эритроцитов пациентов с НС может быть как мелкозернистой, так и крупнозернистой (рисунок 2). Пространственная структура цитоскелета сфероцитов и эхиноцитов в большинстве случаев характеризуется меньшей степенью упорядоченности в сравнении со структурой дискоцитов (рисунок 2, а).



а – дискоцит, б – эхиноцит, в – сфероцит с гранулами.

Размер области сканирования – 2 мкм× 2 мкм, разрешение – 256×256 пикселей.

Рисунок 2 – Разнообразие структур карт латеральных сил участков поверхности эритроцитов пациентов с НС

Визуально неразличимые по структуре на световых микрофотографиях формы клеток отличаются по данным АСМ пространственной структурой карт механических свойств микромасштабных участков поверхности, при этом выявляется не только различие в размерах структурных элементов, но и их пространственная неоднородность (структура подмембранного скелета – актин-спектриновой сети).

Был проведен количественный сравнительный анализ структуры и механических свойств поверхностного слоя эритроцитов двух морфологических форм (дискоцитов и сфероцитов), которые преобладают в крови пациентов с НС. Для этого был проведен спектральный анализ. Полученные периодограммы для карт латеральных сил были аппроксимированы двумя или тремя функциями Гаусса, что соответствует наличию в структуре карт структурных элементов двух или трех классов. Выявлено, что карты распределения значений механических свойств поверхностного слоя сфероцитов, характеризующие структуру мембранного скелета эритроцитов (актин-спектриновая сеть), более однородны в сравнении с картами для дискоцитов. Для интегральной характеристики сложности структуры поверхности двух форм эритроцитов при НС использовали фрактальную размерность (D_F) и параметр лакуарности (λ) для карт латеральных сил участков поверхности клеток. Сфероциты характеризуются большим значением фрактальной размерности ($D_F=2,247\pm0,015$, 95%ДИ) и меньшим значением лакуарности ($\lambda=1,03\pm0,17$, 95% ДИ) в сравнении с соответствующими параметрами для дискоцитов ($D_F=2,224\pm0,017$, $\lambda=2,13\pm0,43$, 95% ДИ, $p<0,05$) пациентов с НС. Увеличение фрактальной размерности указывает

на большую заполненность пространства поверхностью, а уменьшение лакуарности свидетельствует об уменьшении «пробелов» (пропусков, дыр) в структуре сети.

Наблюдаемые изменения структуры поверхностного слоя эритроцитов при НС, связанные с трансформацией «дискоцит-сфероцит», оказывают влияние на интегральные параметры механических свойств участков поверхности этих клеток. При трансформации «дискоцит-сфероцит» увеличивается модуль Юнга, медианные силы трения скольжения и уменьшается шероховатость карт сил трения скольжения. Изменения интегральных параметров структуры участков поверхности клеток соответствуют изменениям структуры карт их механических свойств на наноуровне. Удаление пробелов в сети мембранного цитоскелета и уменьшение степени неоднородности его структуры при трансформации эритроцитов («дискоцит-сфероцит») у пациентов с НС способствует усилению упругих и фрикционных свойств поверхности эритроцитов. Можно заключить, что актин-спектриновая сеть сфероцита находится в более «натянutom» состоянии в сравнении с цитоскелетом дискоцита. Эти изменения структуры поверхностного слоя соответствуют представлению о трансформации патологических дискоцитов в сфероциты через везикуляцию.

Оценка факторов про- и антиоксидантной системы крови у детей с НС

Проведено сравнение параметров про/антиоксидантной системы плазмы крови у пациентов с НС и у здоровых лиц, с помощью метода люминол-зависимой хемилюминисценции. Степень угнетения максимальной интенсивности свечения ($I_{\max}$, %) в присутствии плазмы пациентов с НС была менее выражена, чем в группе сравнения ($p < 0,0001$); относительные значения медианы светосуммы хемилюминисценции (S , %) были также ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,0001$), что отражает снижение активности антиоксидантной системы на фоне повышенного накопления веществ с прооксидантной активностью. Значения показателя $I_{\max}$ (Ме (25%–75%)) составило 52,0% (42,4 – 64,0) у здоровых лиц и 36,0% (26,6–45,0) – у пациентов с НС ($p < 0,0001$). Значения S – 70,2% (59,9 – 77,9) у здоровых лиц и 32,3% (17,6–39,5) у пациентов с НС ($p < 0,0001$). В целом указанные изменения свидетельствуют о наличии умеренно выраженного оксидативного стресса.

Уровень супероксиддисмутазы в эритроцитах был выше у пациентов с НС (Ме = 31,3 Ед; 23,4–39,2) по сравнению с группой контроля (Ме=18,0 Ед; 16–23; $p = 0,0001$). Уровни каталазы эритроцитов также различались: у

пациентов с НС (326,1; 290,6–374,3 мккат/л) были выше, чем в контрольной группе (210,8; 198–234; $p < 0,0001$). Выявленные изменения могут быть обусловлены компенсаторно-приспособительными реакциями эритроцитов на происходящие в организме изменения, либо особенностями архитектоники мембраны эритроцитов у пациентов с НС.

Сравнительный анализ параметров про/антиоксидантной системы плазмы крови пациентов проведен в двух подгруппах: 1) с легкой формой НС ($n=24$), 2) со средней и тяжелой формой НС ($n=36$). Явления оксидативного стресса по результатам исследования плазмы крови пациентов наблюдались в обеих подгруппах, но степень нарушений оказалась более выраженной у пациентов со средним и тяжелым течением заболевания ($p < 0,05$).

Дополнительные гематологические показатели при НС у детей

Методом «случай-контроль» ретроспективно проанализированы показатели общего анализа крови (эритроциты, гемоглобин, гематокрит, MCV, MCH, MCHC, MCHC/MCV), взятых в разные возрастные периоды у детей с НС ($n = 55$) и у детей группы контроля ($n = 55$). Установлено, что все показатели значимо различались ($p < 0,0001$), кроме показателя MCH. С помощью ROC анализа определена прогностическая ценность показателей гемограммы (MCV, MCHC, RDW) и пяти индексов (MCHC/MCV, Hb/MCHC, Hb/RDW, MCHC/RDW, MCHC/Ht) в диагностике НС у детей старше 1 года (таблица 2). Показатели расположены в порядке убывания площадей под кривой (AUC), оценивалась чувствительность (Se) и специфичность (Sp) при использовании найденной точки разделения, рассчитан индекс Юдена (J).

Таблица 2. – Прогностическое значение дополнительных показателей гемограммы и индексов для диагностики НС у детей старше 1 года

Показатель	AUC; 95% ДИ	точка разделения	Se, %	Sp, %	J
Hb/RDW	0,99; 0,96–1,00	$\leq 9,69$	98,2	100	0,98
RDW	0,99; 0,95–1,00	$> 12,9$	96,4	96,0	0,92
MCHC/RDW	0,98; 0,94–1,00	$\leq 2,49$	88,2	100	0,88
Hb/MCHC	0,94; 0,88–0,97	$\leq 3,65$	90,0	88,0	0,78
MCHC/Ht	0,91; 0,84–0,95	$> 0,96$	83,5	92,0	0,75
MCHC/MCV	0,77; 0,69–0,84	$> 0,44$	71,8	88,0	0,60
MCV	0,76; 0,68–0,83	≤ 79 фл	60,9	96,0	0,57
MCHC	0,70; 0,62–0,78	$> 35,7$ г/дл	61,8	88,0	0,50

Так как повышение RDW и снижение MCV характерны для железодефицитной анемии и других состояний, предпочтительнее в

амбулаторной практике для диагностики НС использовать соотношения показателей гемограммы (Hb/RDW, MCHC/RDW, Hb/MCHC, MCHC/Ht, MCHC/MCV).

Значение гематологических показателей при НС у детей первого года жизни

Ретроспективно проанализированы показатели общего анализа крови, взятых в возрасте от 1 до 12 месяцев включительно у 17 детей с верифицированным диагнозом НС, всего изучено 35 анализов крови пациентов с НС. В качестве группы контроля использован 31 анализ крови здоровых детей того же возраста. Исследования были проведены на автоматическом гематологическом анализаторе третьего поколения CELL-DYN Ruby (Abbott, США).

Кроме основных показателей гемограммы, были рассчитаны значения индексов MCHC/MCV, Hb/MCHC, Hb/RDW, MCHC/RDW, MCHC/Ht. Значения всех выбранных определяемых и расчетных показателей статистически значимо отличались у детей с НС от контрольной группы (для MCH $p=0,017$, для остальных показателей $p<0,0001$).

Для определения диагностической значимости параметров гемограммы нами выбраны девять показателей: MCV, MCH, MCHC, RDW, отношения MCHC/MCV, Hb/MCHC, Hb/RDW, MCHC/RDW, MCHC/Ht. Для сравнительной количественной оценки использованы значения площади под кривой (AUC) (таблица 3).

Таблица 3. – Прогностическое значение дополнительных показателей гемограммы для диагностики НС у детей первого года жизни

Показатель	AUC; 95% ДИ	точка разделения	Se, %	Sp, %	J
MCHC/Ht	1,00; 0,94–1,00	>1,06	97,1	100	0,97
Hb/MCHC	0,99; 0,93–1,00	$\leq 3,11$	97,1	100	0,97
Hb/RDW	0,99; 0,93–1,00	$\leq 7,26$	97,1	93,6	0,91
MCHC/MCV	0,92; 0,83–0,98	> 0,45	79,4	100	0,79
MCHC	0,89; 0,78–0,95	> 34,5 г/дл	88,2	83,9	0,72
RDW	0,89; 0,79–0,96	> 15,6%	74,3	96,8	0,71
MCV	0,87; 0,77–0,94	≤ 79 фл	80,0	83,9	0,64
MCHC/RDW	0,80; 0,68–0,89	$\leq 2,04$	58,8	96,8	0,56
MCH	0,67; 0,55–0,78	$\leq 28,6$ пг	80,0	51,6	0,32

Как видно из таблицы 3, выбранные показатели прогностически значимы и могут быть использованы для диагностики НС, но наиболее значимыми и специфичными следует признать: MCHC/Ht, Hb/MCHC, Hb/RDW, MCHC/MCV, MCHC и MCHC/RDW.

Оценка осмотической стойкости эритроцитов методом проточной цитометрии

Для более объективной диагностики НС нами апробирована и модифицирована методика определения осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ) с помощью проточной цитометрии. Проанализированы доля сохранных клеток в свежей крови и после инкубации у 33 пациентов с НС и 30 лиц контрольной группы. У здоровых людей в свежей крови значительный гемолиз с лизисом 50% и более эритроцитов начинается при концентрации ФСБ 40%, а в группе НС – при концентрации 50–45%. При этом статистически значимых различий в числе сохранных эритроцитов в крови в группах контроля и НС при начальной концентрации ФСБ (100%) не было выявлено ($p=0,086$). После 24-часовой инкубации лизис 50% и более эритроцитов начинается при концентрации ФСБ 45–40%, а в группе НС – при концентрации 60–55%. Имеются статистически значимые различия в уровне гемолиза при всех концентрациях ФСБ, кроме 30% ($p=0,084$) и 20% ($p=0,43$), где гемолиз был значительным в обеих группах.

Для определения референтных интервалов нами использованы показатели здоровых лиц, находящиеся в интервале от 5 до 95 персентилей, для наглядности оценены доли пациентов с НС, чьи значения находятся ниже 5 персентиль здоровых лиц («патологические значения»), правильно классифицированы 93,9% лиц с НС. Для сравнения, классический метод определения ОРЭ выявляет только 84,8% пациентов с НС. Диагностическая чувствительность предлагаемого варианта теста – 93,9% (95% ДИ 79,8–99,3), специфичность – 83,3% (95% ДИ 65,3–94,4), PPV – 86,1%, NPV – 92,6%.

Применение теста связывания с эозин-5 малеимидом (ЕМА) в диагностике НС

С целью определения диагностической значимости теста связывания ЕМА методом проточной цитометрии проведено исследование препаратов крови 24 детей с верифицированным диагнозом НС и 72 образцов крови практически здоровых лиц. Определены значения средней интенсивности флуоресценции (СИФ) окрашенных эритроцитов у пациентов с НС и рассчитывалось отношение СИФ исследуемой пробы к среднему значению СИФ трех здоровых контролей. Различия СИФ крови детей с НС и контрольных образцов статистически значимы ($p=0,001$), они составили в среднем 34,9% (21,2–56,8%). Оценивалась прогностическая значимость «сырых» показателей флуоресценции с помощью ROC-анализа: AUC 0,723; 0,622–0,809; $p=0,0001$. При значениях ≤ 409 усл.ед.

чувствительность теста 95,8% (78,9–99,9), а специфичность – лишь 43,1% (31,4–55,3). Далее выполнен ROC-анализ отношений СИФ пациентов с НС к среднему арифметическому трех образцов от здоровых лиц: AUC 0,999; 0,960–1,000; $p < 0,0001$. При значениях $\leq 0,79$ достигнуты оптимальные значения чувствительности (100%; 85,8–100) и специфичности (98,6%; 92,5–100). То есть, диагностировать НС можно в случае, если значения СИФ исследуемого образца более, чем на 21% отличаются от среднего значения контролей.

Алгоритм диагностики гемолитических анемий у детей

На основе полученных нами данных о диагностической значимости уровней гематологических показателей и индексов, предложенных методик оценки осмотической резистентности эритроцитов и теста ЕМА с помощью проточной цитометрии, с учетом данных литературы, а также требований протоколов обследования и лечения детей с гематологическими заболеваниями (D55–D59 по МКБ-10), нами предложен алгоритм диагностики гемолитических анемий у детей, состоящий из 3 этапов в зависимости от уровня оказания медицинской помощи (рисунок 3).

Этап 1 (амбулаторный этап, районный уровень). У пациента с признаками ГА (анемия, повышение ретикулоцитов, общего и несвязанного билирубина, ЛДГ, снижение гаптоглобина) уточняется семейный анамнез (наличие НС у близких родственников пациента). В случае наличия НС в семейном анамнезе учитываются значения гематологических показателей и индексов. У детей первого года жизни при значениях $MCHC/Ht > 1,06$, $Hb/MCHC \leq 3,11$, $Hb/RDW \leq 7,26$, $MCHC/MCV > 0,45$; а у детей старше 1 года – $Hb/RDW \leq 9,69$; $MCHC/RDW \leq 2,49$; $Hb/MCHC \leq 3,65$; $MCHC/Ht > 0,96$; $MCHC/MCV > 0,44$ может быть установлен диагноз НС. При этом подходе не требуется направлять пациентов на следующие этапы оказания медицинской помощи и применять дорогостоящие методы лабораторной диагностики. При иных значениях указанных индексов – переход на этапы 2 и 3.

Этап 2 (стационарный этап, районный и областной уровень). У пациентов с отсутствием семейного анамнеза также проводится оценка значений гематологических показателей и индексов. У детей первого года жизни при вышеуказанных значениях индексов проводится тест ОРЭ методом проточной цитометрии, при снижении ОРЭ также может быть выставлен диагноз НС. При иных значениях индексов следует исключить приобретенные ГА, иммунные и неиммунные. При невозможности установить причину ГА – переход к этапу 3.

Этап 3 (стационарный этап, областной и республиканский уровень). При других наследственных формах ГА выполняется электрофорез гемоглобина для подтверждения группы гемоглинопатий, поиск ферментопатий, других мембранопатий. Для диагностики НС может использоваться тест ЕМА. При отсутствии установленного диагноза после проведенных исследований проводятся другие тесты (по показаниям).

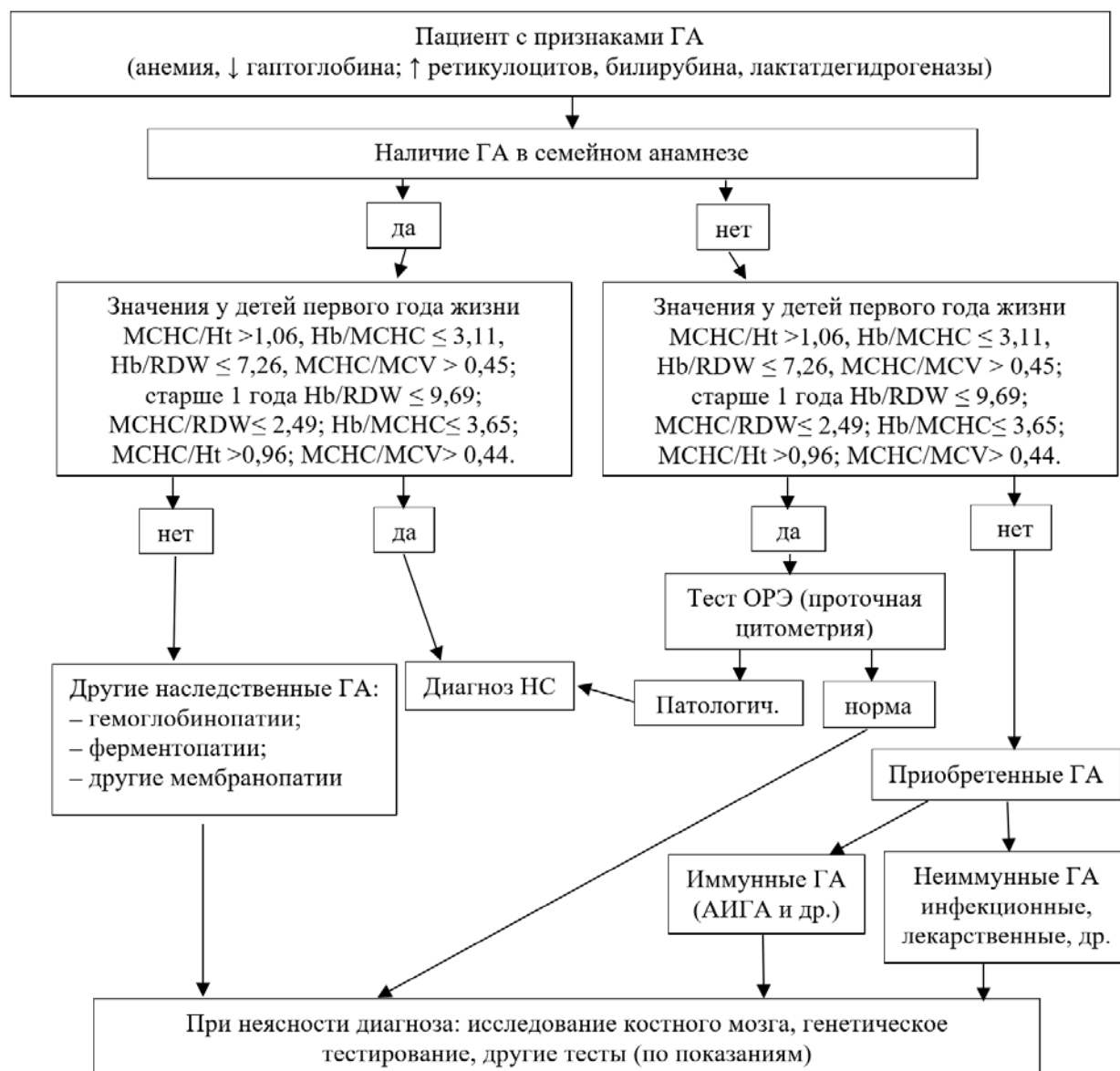


Рисунок 3 – Алгоритм диагностики гемолитических анемий у детей

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Средняя заболеваемость ГА в Республике Беларусь за период с 2005 по 2020 гг. составила 1,79 на 100 тыс. детского населения, причем более высокая заболеваемость ГА отмечена в Гродненской (2,4), Витебской (2,19) и Минской (2,11) областях, более низкая – в городе Минске (1,34), Брестской (1,57) и Могилевской (1,59) областях. Среднегодовой темп прироста заболеваемости ГА за оцениваемый период составил $0,03 \pm 0,05$ случаев в год или 1,3% (от -1,5 до 4,2%) в год; $p = 0,22$. Впервые выявленные случаи ГА регистрируются преимущественно у детей раннего возраста: на первом году жизни (69,6%; заболеваемость 11,0 на 100 тыс. населения в данной возрастной группе) и в возрасте 1–4 лет (15,9%; заболеваемость 2,5 на 100 тыс. населения). В структуре впервые выявленных ГА у детей преобладает НС (50,4%; 45,4–55,3). Распространенность НС в Беларуси составляет 8,18 на 100 тыс. детского населения, или 1 случай на 12,2 тыс. детского населения [3; 6; 12; 14; 15; 23; 25; 26].

2. Доказана высокая диагностическая значимость и установлены граничные значения соотношений концентрации гемоглобина, гематокрита и эритроцитарных индексов, соответствующие НС: для детей до 1 года $MCHC/Ht > 1,06$, $Hb/MCHC \leq 3,11$, $Hb/RDW \leq 7,26$, $MCHC/MCV > 0,45$ ($p < 0,0001$); для детей старше 1 года – $Hb/RDW \leq 9,69$; $MCHC/RDW \leq 2,49$; $Hb/MCHC \leq 3,65$; $MCHC/Ht > 0,96$; $MCHC/MCV > 0,44$ ($p < 0,001$). Диагноз НС у 50% пациентов устанавливается в течение 15 месяцев жизни, причем у 75% (61–85%) НС имеется в семейном анамнезе [4; 6; 8; 13; 15; 17; 18; 24; 27].

3. При НС по данным атомно-силовой микроскопии оценены параметры фрактальной размерности (D_F) и лакуарности (λ) для карт латеральных сил участков поверхности эритроцитов. Сфероциты характеризуются большим значением фрактальной размерности ($D_F = 2,247 \pm 0,015$) и меньшим значением лакуарности ($\lambda = 1,03 \pm 0,17$) в сравнении с соответствующими параметрами ($D_F = 2,224 \pm 0,017$, $\lambda = 2,13 \pm 0,43$, $p < 0,05$) для дискоцитов пациентов с НС. Выявлены наномасштабные изменения структуры распределения значений механических свойств поверхностного слоя эритроцитов и соответствующие им изменения интегральных механических параметров поверхности эритроцитов, связанные с характерной для НС трансформацией форм эритроцитов «дискоцит-сфероцит». У пациентов с

НС снижена способность плазмы крови к подавлению ЛЗХЛ радикалообразующей смеси (36% vs 52% у здоровых лиц, $p < 0,0001$), что свидетельствует о наличии оксидативного стресса; при этом степень угнетения свечения зависит от тяжести заболевания [5; 7; 11; 19–21].

4. Доля сохранных эритроцитов до и после 24-часовой инкубации, определяемая с помощью проточной цитометрии, у пациентов с НС значительно отличается от показателей здоровых лиц ($p < 0,05$) при концентрациях фосфатно-солевого буфера (ФСБ) от 80 до 35%. В качестве референтных интервалов значений доли сохранных клеток при различных концентрациях ФСБ рассчитаны показатели от 5 до 95 перцентилей здоровых лиц. Диагностическая чувствительность теста составила 93,9% (95% ДИ 79,8–99,3), специфичность – 83,3% (95% ДИ 65,3–94,4), диагностическая точность 88,9% (95% ДИ 78,4–95,4). При использовании теста связывания красителя ЕМА значения СИФ исследуемых образцов крови пациентов с НС были значимо ниже, чем в контрольной группе, в среднем на 34,9% ($p = 0,001$). Установлена высокая значимость теста ЕМА для диагностики НС (AUC 0,999; 95% ДИ 0,960–1,000) в случае использования отношения СИФ исследуемой пробы к среднему значению СИФ трех контрольных образцов здоровых лиц. Значения $\leq 0,79$ позволяют с высокой точностью ($p < 0,0001$) диагностировать НС у детей (чувствительность теста 100%, специфичность – 98,6%) [9; 10; 29; 30; 32].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Использование дополнительных параметров гемограммы и их соотношений позволяет осуществлять раннюю диагностику НС в практике педиатра. О высокой вероятности НС у детей первого года жизни свидетельствуют значения $MCHC/Ht > 1,06$, $Hb/MCHC \leq 3,11$, $Hb/RDW \leq 7,26$, $MCHC/MCV > 0,45$; для детей старше 1 года – $Hb/RDW \leq 9,69$; $MCHC/RDW \leq 2,49$; $Hb/MCHC \leq 3,65$; $MCHC/Ht > 0,96$; $MCHC/MCV > 0,44$ [4, 8, 13, 17, 18, 24, 27, 28].

2. Оценка способности плазмы пациентов с НС к подавлению ЛЗХЛ может использоваться в качестве дополнительного маркера тяжести заболевания, что является патогенетическим обоснованием включения антиоксидантов в схему лечения НС, особенно при тяжелой степени тяжести заболевания [11, 20].

3. Разработанная инструкция по применению «Метод определения осмотической резистентности эритроцитов с использованием проточной цитометрии» предназначена для врачей-гематологов, врачей лабораторной диагностики и других врачей-специалистов. Метод выполняем в

специализированных лабораториях, оборудованных проточным цитометром. Он позволяет быстрее и объективнее оценить осмотическую резистентность эритроцитов по сравнению с классическим методом [9; 29; 32].

4. Разработанный алгоритм диагностики гемолитических анемий у детей может использоваться на всех уровнях оказания медицинской помощи в Республике Беларусь и позволяет с минимальными затратами определять основные виды ГА у детей [22; 31].

Результаты исследования внедрены в работу ГУ «РНПЦ ДОГиИ», ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», в учебный процесс на кафедре клинической лабораторной диагностики, аллергологии и иммунологии УО «Гомельский государственный медицинский университет», в учебный процесс на кафедре детской онкологии, гематологии и иммунологии ГУО «БелМАПО» (в настоящее время – ИПКиПКЗ БГМУ).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в научных журналах

1. Мицура, Е.Ф. Наследственный сфероцитоз у детей: современные представления (обзор литературы) / Е. Ф. Мицура // Проблемы здоровья и экологии. – 2011. - № 2. – С. 39-44.

2. Мицура, Е.Ф. Наследственные гемолитические анемии у детей: принципы диагностики и лечения (лекция) / Е.Ф. Мицура, Л.И. Волкова // Проблемы здоровья и экологии. – 2013. - № 2. – С. 25-29.

3. Мицура, Е.Ф. Распространенность и структура гемолитических анемий у детей в Республике Беларусь / Е.Ф. Мицура, Л.И. Волкова // Проблемы здоровья и экологии. – 2018. – №1. – С.70–75.

4. Мицура, Е.Ф. Дополнительные гематологические показатели в диагностике наследственного сфероцитоза у детей / Е.Ф. Мицура, Л.И. Волкова // Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа. – 2018. – Т.4, №1. – С. 42–46.

5. Структурное разнообразие эритроцитов пациентов с наследственным сфероцитозом / М.Н. Стародубцева, Е.Ф. Мицура, И.А. Челнокова, А.Н. Кондрачук, Н.И. Егоренков // Проблемы здоровья и экологии. – 2018. – №2. – С.109–114.

6. Мицура, Е.Ф. Наследственный сфероцитоз в структуре гемолитических анемий у детей и его клиническое течение в Республике Беларусь / Е.Ф. Мицура, Л.И. Волкова // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. – 2018. – №2. – С.23–28.

7. Nano- and microscale mechanical properties of erythrocytes in hereditary spherocytosis /M.N. Starodubtseva, E.F. Mitsura, I.E. Starodubtsev, I.A. Chelnokova, N.I. Yegorenkov, L.I. Volkova, Yu.S. Kharin // Journal of Biomechanics – 2019. – Vol.83. – P. 1–8.

8. Мицура, Е.Ф. Значение гематологических показателей в диагностике наследственного сфероцитоза у детей первого года жизни / Е.Ф. Мицура, Л.И. Волкова // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. – 2019. – №1. – С. 68–72.

9. Мицура, Е.Ф. Определение осмотической резистентности эритроцитов методом проточной цитометрии у пациентов с наследственным сфероцитозом / Е.Ф. Мицура, Ж.Н. Пугачева, Л.И. Волкова // Сибирский научный медицинский журнал. – 2020. – Т. 40. – №3. – С. 81–87. – doi: 10.15372/SSMJ20200312.

10. Мицура, Е.Ф. Тест диагностики наследственного сфероцитоза у детей по оценке связывания с эритроцитами красителя эозин-5-малеимида /

Е.Ф. Мицура, Ж.Н. Пугачева, Л.И. Волкова // Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа. – 2020. – Т.6, №4. – С.504–510.

11. Оценка состояния про/антиоксидантной системы у детей с наследственным сфероцитозом / Е.Ф. Мицура, И.А. Новикова, Т.С. Петренко, К.С. Макеева, Л.И. Волкова // Проблемы Здоровья и Экологии. – 2021. – Т.67, №1. – С. 55-61

12.Мицура, Е.Ф. Распространенность и годовая динамика гемолитических анемий у детей в Республике Беларусь за 2005–2020 годы / Е.Ф. Мицура, Л.И. Волкова // Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа. – 2021. – Т.7, №4 – С. 488–494.

13.Мицура, Е. Ф. Гематологические показатели для диагностики наследственного сфероцитоза в практике педиатра / Е. Ф. Мицура, Л. И. Волкова // Гематология. Трансфузиология. Вост. Европа. – 2022. – Т. 8, № 3. – С. 324–330.

Статьи в сборниках научных работ и материалах конференций

14.Структура гемолитических анемий у детей и подростков, проживающих в Гомельской области Республики Беларусь / Е. Ф. Мицура, Л. И. Волкова, С. А. Ходулева, И. П. Ромашевская // Актуальные проблемы медицины : сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф., посвященной 20-летию Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 24–25 фев. 2011 г. в 4 Т. – Т. 3. – Гомель : ГомГМУ, 2011. – С. 84–87.

15.Эпидемиологические и клинико-лабораторные аспекты наследственного сфероцитоза у детей / Е. Ф. Мицура, Л. И. Волкова, С. А. Ходулева, И. П. Ромашевская // «Чернобыльские чтения-2012»: материалы Междун. науч.-практ. конф., Гомель, 19-20 апр. / Под общ. ред. А. В. Рожко. – Гомель : ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2012. – С. 202–204.

16.Мицура, Е. Ф. Использование гематологических показателей в дифференциальной диагностике наследственного сфероцитоза и железодефицитной анемии у детей / Е. Ф. Мицура, Л. И. Волкова // Гематология. Трансфузиология. Вост. Европа. – 2017. – Т. 3, № 4. – С. 888–890.

17.Мицура, Е. Ф. Возможности использования гематологических показателей в диагностике наследственного сфероцитоза у детей / Е. Ф. Мицура, Л. И. Волкова // Новые исследования молодых ученых – 2017 : сб. рец. науч. работ / под ред. А. В. Сикорского, О. К. Дорониной. – Минск : БГМУ, 2017. – С. 10–13.

18.Мицура, Е. Ф. Ранняя и первичная диагностика наследственного сфероцитоза у детей при помощи гематологических параметров /

Е. Ф. Мицура, Л. И. Волкова // Актуальные проблемы медицины : сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. и 27-й итоговой науч. сессии Гомел. гос. мед. ун-та , Гомель, 2–3 нояб. 2017 г. / А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель : ГомГМУ, 2018. – С. 539–541.

19. Исследование структурно-механических свойств поверхности эритроцитов детей при гемолитических анемиях с помощью атомно-силовой микроскопии / М. Н. Стародубцева, Е. Ф. Мицура, И. Е. Стародубцев, И. А. Челнокова, А. Н. Кондрачук, Н. И. Егоренков // Актуальные проблемы медицины : сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. и 27-й итоговой науч. сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 2–3 нояб. 2017 г. / А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель : ГомГМУ, 2018. – С. 740–743.

20. Мицура, Е. Ф. Состояние про/антиоксидантной системы у пациентов с наследственным сфероцитозом / Е. Ф. Мицура, Т. С. Петренко, И. А. Новикова // Мультидисциплинарный подход к диагностике и лечению коморбидной патологии : сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием , Гомель, 29–30 ноября 2018 г. / А. Н. Лызиков [и др.]. – Элект. текст. данные (объем 9,1 Mb). – Гомель : ГомГМУ, 2018. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – С. 326–328.

21. Изменение структуры и механических свойств поверхностного слоя дискоцитов при их трансформации в сфероциты для эритроцитов пациентов с наследственным сфероцитозом / М. Н. Стародубцева, Е. Ф. Мицура, И. Е. Стародубцев, И. А. Челнокова, Н. И. Егоренков // Мультидисциплинарный подход к диагностике и лечению коморбидной патологии : сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Гомель, 29–30 ноября 2018 г. / А. Н. Лызиков [и др.]. – Элект. текст. данные (объем 9,1 Mb). – Гомель : ГомГМУ, 2018. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – С. 441–444.

22. Этапы диагностики гемолитических анемий у детей / Е. Ф. Мицура, Л. И. Волкова, И. П. Ромашевская, А. Н. Демиденко, О. В. Жук, С. А. Ходулева // Актуальные вопросы педиатрии : сб. материалов Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвященной 30-летию кафедры педиатрии Гомел. гос. мед. ун-та , Гомель, 24 сент. 2021 г. / И. О. Стома [и др.]. – Элект. текст. данные (объем 2,06 Mb). – Гомель : ГомГМУ, 2021. – С. 76–79.

23. Мицура, Е. Ф. Структура гемолитических анемий у детей в Республике Беларусь за 2017–2020 гг. и распространенность наследственного сфероцитоза / Е. Ф. Мицура, Л. И. Волкова // Актуальные проблемы медицины : сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. с междунар.

участием, Гомель, 11 ноября 2021 г. : в 3 Т. / И. О. Стома [и др.]. – Гомель : ГомГМУ, 2021. – Т. 1. – С. 173–175.

Тезисы научных докладов

24.Мицура, Е. Ф. Гематологические показатели красной крови в диагностике наследственного сфероцитоза у детей / Е. Ф. Мицура, Л. И. Волкова // Гематология. Трансфузиология. Вост. Европа. – 2017. – Т. 3, № 3. – С. 456–457.

25.Мицура, Е. Ф. Структура гемолитических анемий у детей и подростков в Гомельской области Республики Беларусь / Е. Ф. Мицура, Л. И. Волкова // Гематология. Трансфузиология. Вост. Европа. – 2017. – Т. 3, № 3. – С. 458–459.

26.Мицура, Е. Ф. Впервые выявленные гемолитические анемии у детей в Республике Беларусь / Е. Ф. Мицура, Л. И. Волкова // «Современные проблемы радиационной медицины: от науки к практике» : материалы Междунар. науч.-практ. конф., Гомель, 26–27 апр. 2018 г. / Под общ. ред. А. В. Рожко. – Гомель : ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2018. – С. 169–170.

27.Мицура, Е. Ф. Значение гематологических показателей в диагностике наследственного сфероцитоза у детей / Е. Ф. Мицура, Л. И. Волкова // «Многопрофильная клиника XXI века. Инновации в медицине – 2018» : материалы Междунар. науч. конгресса, С.-Петербург, 5–7 апр. 2018 г. / под ред. С. С. Алексанина – СПб. : Астерион, 2018. – С. 146–148.

28.Мицура, Е. Ф. Гематологические показатели наследственного сфероцитоза у детей первого года жизни / Е. Ф. Мицура, Л. И. Волкова // «Современные проблемы радиационной медицины: от науки к практике»: Материалы Междунар. науч.-практ. конф., Гомель, 23–24 мая 2019 г. / Под общ. ред. А. В. Рожко. – Гомель : ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2019. – С. 142–143.

29.Современные подходы к диагностике наследственного сфероцитоза / Е. Ф. Мицура, Ж. Н. Пугачева, Л. И. Волкова, Ю. И. Ярец, И. П. Ромашевская // «Современные проблемы радиационной медицины : от науки к практике» : материалы Междунар. науч.-практ. конф. , Гомель, 19 июня 2020 г. / Под общ. ред. А. В. Рожко. – Гомель : ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2020. – С. 142–143.

30.Диагностика наследственного сфероцитоза у детей с помощью теста связывания эозин-5 малеимида / Е. Ф. Мицура, Ж. Н. Пугачева, Л. И. Волкова // Тезисы докладов юбилейной международной научно-практической конференции «ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна

ФМБА России: 75 лет на страже здоровья людей». – М. : ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, 2021. – с. 173–174.

31.Мицура, Е. Ф. Алгоритм диагностики гемолитических анемий у детей / Е. Ф. Мицура, Л. И. Волкова // «Многопрофильная клиника XXI века. Инновации и передовой опыт» : материалы XII Междунар. науч. конф., С.-Петербург, 20–21 апр. 2023 г. / под ред. С. С. Алексанина – СПб. : ООО «СатисЪ», 2023. – С. 153–154.

Инструкция по применению

32.Метод определения осмотической резистентности эритроцитов с использованием проточной цитометрии: инструкция по применению № 054-0620, утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 16.12.2020 / Е. Ф. Мицура, А. В. Рожко, Л. И. Волкова, Ж. Н. Пугачева, Ю. И. Ярец, И. П. Ромашевская. – Гомель, 2020. – 7 с.

РЭЗЮМЭ

Міцура Кацярына Фёдараўна

Спадчынны сферацытоз ў дзяцей: морфафункцыянальныя характарыстыкі эрытрацытаў і новыя аспекты лабараторнай дыягностыкі

Ключавыя словы: спадчынны сферацытоз, дзеці, дыягностыка.

Мэта даследавання: павысіць якасць дыягностыкі спадчыннага сферацытозу на ўсіх узроўнях аказання медыцынскай дапамогі дзецям на аснове вывучэння клініка-лабараторных параметраў.

Метады даследавання: клінічныя, гематалагічныя, біяхімічныя, праточная цытаметрыя, статыстычныя.

Атрыманыя вынікі і іх навуковая навізна. Праведзены паглыблены аналіз захваральнасці і структуры гемалітычных анемій у Рэспубліцы Беларусь за 2005-2020 гады, вызначана распаўсюджанасць спадчыннага сферацытозу ў дзяцей і падлеткаў. Атрыманы новыя даныя аб натуральнай плыні спадчыннага сферацытозу, тэрмінах устанаўлення дыягназу, устаноўлены гранічныя значэнні дадатковых гематалагічных паказчыкаў у мэтах дыягностыкі спадчыннага сферацытозу, у тым ліку ў дзяцей першага года жыцця. Упершыню ў пацыентаў са спадчынным сферацытозам з дапамогай атамна-сілавой мікраскапіі ў нанамаштабе выяўлена неаднароднасць структуры мембраннага цыташкілета эрытрацытаў з фарміраваннем мікравезікул, утварэнне якіх суправаджае трансфармацыю дыскацытаў у сферацыты. Устаноўлена высокая дыягнастычная значнасць метаду вызначэння асматычнай рэзістэнтнасці эрытрацытаў з ацэнкай долі захоўных клетак у розных канцэнтрацыях солевага буфера на праточным цытаметры, з вызначэннем рэферэнтных значэнняў. Устаноўлена высокая значнасць тэсту звязвання з эзін-5 малеімідам для дыягностыкі спадчыннага сферацытозу ў дзяцей.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: метады вызначэння асматычнай рэзістэнтнасці эрытрацытаў з выкарыстаннем праточнай цытаметрыі лёгка выкананы, не патрабуе дадатковых матэрыяльных выдаткаў, дазваляе хутчэй і аб'ектыўней ацаніць асматычную рэзістэнтнасць эрытрацытаў у параўнанні з класічным метадам і можа быць рэкамендаваная ў шырокую клінічную практыку. На аснове атрыманых дадзеных прапанаваны алгарытм дыягностыкі гемалітычных анемій.

Вобласць ужывання: гематалогія, лабараторная дыягностыка.

РЕЗЮМЕ

Мицура Екатерина Фёдоровна

Наследственный сфероцитоз у детей: морфофункциональные характеристики эритроцитов и новые аспекты лабораторной диагностики

Ключевые слова: наследственный сфероцитоз, дети, диагностика.

Цель исследования: повысить качество диагностики наследственного сфероцитоза на всех уровнях оказания медицинской помощи детям на основе изучения клинико-лабораторных параметров.

Методы исследования: клинические, гематологические, биохимические, проточная цитометрия, статистические.

Полученные результаты и их научная новизна. Проведен углубленный анализ заболеваемости и структуры гемолитических анемий в Республике Беларусь за 2005–2020 годы, определена распространенность наследственного сфероцитоза у детей и подростков. Получены новые данные о естественном течении наследственного сфероцитоза, сроках установления диагноза, установлены граничные значения дополнительных гематологических показателей в целях диагностики наследственного сфероцитоза, в том числе у детей первого года жизни. Впервые у пациентов с наследственным сфероцитозом с помощью атомно-силовой микроскопии в наномасштабе выявлена неоднородность структуры мембранного цитоскелета эритроцитов с формированием микровезикул, образование которых сопровождает трансформацию дискоцитов в сфероциты. Установлена высокая диагностическая значимость метода определения осмотической резистентности эритроцитов с оценкой доли сохранных клеток в различных концентрациях солевого буфера на проточном цитометре, с определением референтных значений. Установлена высокая значимость теста связывания с эозин-5 малеимидом для диагностики наследственного сфероцитоза у детей.

Рекомендации по использованию: метод определения осмотической резистентности эритроцитов с использованием проточной цитометрии легко выполним, не требует дополнительных материальных затрат, позволяет быстрее и объективнее оценить осмотическую резистентность эритроцитов по сравнению с классическим методом и может быть рекомендован в широкую клиническую практику. На основе полученных данных предложен алгоритм диагностики гемолитических анемий.

Область применения: гематология, лабораторная диагностика.

SUMMARY

Mitsura Katsiaryna Fedorovna

Hereditary spherocytosis in children: morphofunctional characteristics of erythrocytes and new aspects of laboratory diagnosis

Key words: hereditary spherocytosis, children, diagnostics.

Aim of the study: to improve the quality of hereditary spherocytosis diagnosis at all levels of medical care for children based on the study of clinical and laboratory parameters.

Research methods: clinical, hematological, biochemical, flow cytometry, statistical.

The results and their scientific novelty. An in-depth analysis of the incidence and structure of hemolytic anemia in the Republic of Belarus for 2005–2020 was carried out, the prevalence of hereditary spherocytosis in children and adolescents was determined. New data have been obtained on the natural course of hereditary spherocytosis, the timing of the diagnosis, and the boundary values of additional hematological parameters have been established in order to diagnose hereditary spherocytosis, including in children of the first year of life. For the first time in patients with hereditary spherocytosis, using nanoscale atomic force microscopy, heterogeneity of the structure of the membrane cytoskeleton of erythrocytes was revealed with the formation of microvesicles, which accompany the transformation of discocytes into spherocytes. The high diagnostic significance of the method for determining the osmotic resistance of erythrocytes with the assessment of the proportion of intact cells in various concentrations of saline buffer on a flow cytometer, with the determining of reference values, was established. The high significance of the eosin-5 maleimide binding test for the diagnosis of hereditary spherocytosis in children has been proven.

Recommendations for the practical use: the method for determining the osmotic resistance of erythrocytes using flow cytometry is easily performed, does not require additional material costs, allows faster and more objectively to assess the osmotic resistance of erythrocytes compared to the classical method and can be recommended for wide clinical practice. Based on the data obtained, an algorithm for diagnosing hemolytic anemia is proposed.

Application area: hematology, laboratory diagnostics.



Научное издание

МИЦУРА Екатерина Федоровна

**НАСЛЕДСТВЕННЫЙ СФЕРОЦИТОЗ У ДЕТЕЙ:
МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ЭРИТРОЦИТОВ И НОВЫЕ АСПЕКТЫ
ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ**

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

по специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови

Подписано в печать 11.03.2024.

Формат 60×84/16. Бумага офсетная 80 г/м². Гарнитура Times New Roman.
Усл. печ. л. 1,63. Уч.-изд. л. 1,45. Тираж 65 экз. Заказ № 173.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий № 1/46 от 03.10.2013.
ул. Ланге, 5, 246000, Гомель.