

ОСНОВНИ МЕТОДИ ЗА СКРИНИНГ И ДОКАЗВАНЕ НА СЪРПОВИДНО-КЛЕТЪЧНА АНЕМИЯ

Венета Илиева¹, Елена Манова¹, Мариела Методиева¹, Йорданка Михайлова²,
Даниела Герова³

¹студенти, МК-Варна, ²Учебен сектор „Мед. лаборант“, МК-Варна,

³Катедра по Обща медицина и Клинична лаборатория,

МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна

BASIC METHODS FOR INVESTIGATING AND PROVING SICKLE-CELL ANEMIA

Veneta Ilieva¹, Elena Manova¹, Mariela Metodieva¹, Yordanka Mihailova²,
Daniela Gerova³

¹students, Medical College – Varna,

²Education sector “Medical laboratory assistant”, Medical College – Varna

³Department of General Medicine and Clinical Laboratory,

MU „Prof. Dr. Paraskev Stoyanov“ - Varna

РЕЗЮМЕ

Въведение: Сърповидно-клетъчната анемия (СКА) е генетично детерминирано заболяване, представляващо сериозен обществен здравен проблем не само за страните с традиционно висока честота (Африка, Азия, Америка, Средиземноморие), но и за множество от европейските страни, където се наблюдава непрекъснато нарастване на честотата на това заболяване.

Цел: Да представим методи, използвани за скриниране и диагноза на СКА.

Дискусия: Методите, използвани при скриниране и диагностициране на СКА са два основни типа: рутинни и високо специализирани лабораторни методи. Рутинните тестове включват ПКК, биохимични показатели за доказване на хемолиза *in vivo*, изследване на урина, както и скриниращите тестове за доказване наличие на HbS – тестове за разтворимост, тестове, предизвикващи промяна във формата на еритроцитите и др. От изключително значение за потвърждаване на диагноза е използването на високо специализирани техники за разделяне на белтъци като електрофореза и високоефективна течна хроматография (HPLC), определящи абнормните хемоглобинови варианти. За нуждите на пренаталната диагностика се използва и

ABSTRACT

Introduction: The sickle-cell anaemia (SCA) is a genetically determined disease, that is a major public health issue amongst not only the countries where it is traditionally quite common (Africa, Asia, America and the Mediterranean), but also the majority of European countries, where a significant increase of the frequency of the disease is observed.

Aim: To present methods used for screening and diagnose of SCA.

Discussion: The methods used for screening and diagnose of SCA can be classified into two main categories – routine ones and highly specialised laboratory methods. The routine tests include complete blood count, biochemical parameters to prove *in vivo* haemolysis, urine tests and the screening tests for presence of HbS e.g. sickling tests and solubility tests. In order to confirm the diagnosis of SCA the usage of protein separation techniques such as electrophoresis and high-performance liquid chromatography (HPLC) for detection of abnormal hemoglobin variants is of high importance. Concerning prenatal diagnostics DNA analysis is also used for detection of point mutation in the fetus beta gene of globin molecule.

Conclusion: In order to ensure with maximum of effectiveness the diagnostic process of this common

ДНК анализ за доказване на точкова мутация в гена за бета веригата на глобиновата молекула.

Заклучение: Необходимо е да се познават различните видове методи за скриниране и диагноза на СКА, за да е максимално ефективен и бърз диагностичният процес при това разпространено и не рядко тежко протичащо наследствено заболяване.

Ключови думи: сърповидно-клетъчна анемия, HbS, диагностични методи

hereditary disease, a good knowledge of all available screening and diagnostic methods is needed.

Keywords: Sickle cell anaemia, HbS, screening and diagnostic methods

ВЪВЕДЕНИЕ

Сърповидно-клетъчната анемия (СКА) е автосомно кододоминантно наследствено заболяване. Представлява тип хемоглиноза, дължаща се на точкова мутация в гена, кодиращ синтеза на β -глобиновата верига в хромозома 11. Като резултат намиращата се на шеста позиция в β -полипептидната верига глутаминова киселина (хидрофилна по химични свойства) е заменена с хидрофобната аминокиселина валин. Формира се т.нар хемоглобин S (HbS), характеризиращ се с променени физико-химични свойства – по-трудно разтворим, бавна електрофоретична подвижност, нисък афинитет към кислорода (11). В условия на ниско парциално налягане на O_2 HbS има свойството да полимеризира. Полимеризираните хемоглинови нишки прилепват към еритроцитната мембрана, което води до типичната промяна във формата на еритроцитите (5). На кръвна натрилка еритроцитите имат вид на сърп, откъдето и наименованието на заболяването (сър-

повидно-клетъчна анемия – Sickle Cell Anemia или дрепаноцитоза – от гр. Drepanon, означаващо сърп) и наименованието на самия хемоглобин – HbS. Променената форма от своя страна обуславя подчертана нестабилност на еритроцитите и повишена склонност към хронична вътресъдова хемолиза.

HbS полимеризацията води и до клетъчна дехидратация (загуба най-вече на калий и вода), увеличена плътност на еритроцитите, което още повече благоприятства допълнителното полимеризиране на HbS. Плътните и дехидрирани еритроцитите играят централна патофизиологична роля при острите и хронични клинични манифестации на СКА, базирани на венооклузиите и нарушено кръвоснабдяване на тъканите (4).

Сърповидно-клетъчните заболявания обхващат група от хемоглинози, водещи по сходен патофизиологичен механизъм до образуване на сърповидни еритроцити и развитие на изявена клинична симптоматика. На таблица 1 са пред-

Табл. 1. Хемоглинови варианти, обуславящи сърповидно-клетъчна симптоматика

Генотип	Mean Hb (g/L)	MCV	Електрофореза на хемоглобин (%)				
			HbS	HbA	HbF	HbA2	Друг тип Hb
SS	81	N	80-95	–	2-20	N	–
SS - α / $\alpha\alpha$	86	↓	80-90	–	2-20	3-3.8	–
SS - α / α	92	↓	80-90	–	2-20	3-3.8	–
SC	110	↓	40-50	–	1-4		HbC: 40-50
S/ β^o thal	88	↓	75-90	–	2-20	4-6	–
S/ β^+ thal	115	↓	50-85	5-30	2-20	4-6	–
SD Penjab	82	N	40	–	2.5-5	2-3	HbD Penjab: 50
SO Arab	81	N	45	–	4-7		HbO Arab: 45
S Lepore	110	↓	75	–	3.5-40	2	Hb Lepore: 10
SE	130	↓	60	–	4		HbE: 30-35
S/HPFH	137	N/↓	60-70	–	25-35	1.5-2.5	–
AS*	N	N	30-45	50-65	2-5	N	–

ставени основните типове хемоглобинози, водещи до сърповидноклетъчна анемия.

Процесът на образуване на сърповидни еритроцити е комплексен и зависи от множество екстра- и интраеритроцитни фактори като ацидоза, хипоксия, съотношение между различните типове хемоглобини в еритроцита, както и концентрацията на 2,3 бисфосфоглицерат. Важно е да се отбележи, че някои типове хемоглобин благоприятстват полимеризирането с HbS (HbC, HbD Punjab, HbO Arab), докато други го потискат (HbF, HbA2).

СКА е най-широко разпространеното моногенно заболяване, засягащо почти 50 милиона души в света, като всяка година 250-300 хиляди новородени носят абнормния ген (13). Най-висока е честотата сред населението на Централна Африка и Индия (около 40%), както и в страните от Средиземноморския басейн (основно Гърция, Италия) и Близкия Изток. Изследвайки географското разпространение на СКА, още в началото на миналия век е изказана хипотезата, че този генетичен дефект е закрепен еволюционно, тъй като дава предимства на засегнатите индивиди по отношение на разпространената в тези райони малария. Епидемиологични доказателства на тази хипотеза започват да се публикуват в началото на настоящия век (2). Като последица от колонизирането на голяма част от страните, в които СКА е често срещано явление, а в съвременността и от засиления миграционен процес заболяването се среща както в Америка (най-вече САЩ и Бразилия), така и в Западна Европа. Увеличената честота в страните с висок социален статус се дължи и на подобрените медицински грижи и значително увеличение продължителността на живот на засегнатите индивиди. Само за периода 1970-2010 година смъртността на децата с дрепаноцитоза е доведена близо до тази на общата популация, а средната продължителност на живот надвишава 60 години. За сравнение – в миналото, както и в страните с лош социален статус хомозиготите рядко достигат до 5-тата си година. Счита се, че броят на хомозиготните носители на гена за HbS може да достигне 400 000 към 2050-та година (13).

Широкото разпространение на сърповидно-клетъчните заболявания поставя на сериозно изпитание здравеопазните системи в различните страни. Налага се да се предприемат от една страна мащабни скринингови изследвания за доказване наличието им, а от друга да се изработят алгоритми за проследяване и мониториране със-

стоянието на засегнатите индивиди и провеждане на адекватна терапия.

Целта на настоящия обзор е да проучим и представим методите, използвани в нашето съвремие, за скриниране и диагноза на СКА.

ДИСКУСИЯ

Методите, използвани при скриниране и диагностика на СКА са два основни типа: рутинни и високо специализирани лабораторни методи.

Рутинни лабораторни тестове:

1. Периферна кръвна картина (ПКК) – показва различни отклонения в зависимост от типа хемоглобиноза, водещ до сърповидно-клетъчна анемия. Нивата на Hb са нормални в периода на новороденото. Анемията, както и морфологичните промени на еритроцитите (форма на сърп и/или цигара) се появяват на 3-ти-4-ти месец след раждането, когато концентрацията на HbF спада. При HbSS болестта се наблюдават нормоцитни, нормохромни еритроцити с полихромазия, множество сърповидни еритроцити и по-малко таргетни клетки. Средно ретикулоцитите наброяват около 10% (4-20%), наблюдават се и еритробласти. При едновременно съществуване и на таласемия или железен дефицит се откроява анемия от мироцитен тип – преобладават хипохромни, микроцитни еритроцити, а при HbSC болестта се наблюдават най-вече таргетни клетки и относително по-малко сърповидни клетки, както и еритроцитни включвания от типа на Howell-Jolly телцата, израз на намалена функционалност на слезката. Обикновено се наблюдава левкоцитоза ($12-20 \times 10^9/L$) за сметка на увеличения брой зрели неутрофили и тромбоцитоза ($300-500 \times 10^9/L$).
2. СУЕ – в състояние на равновесие е константно забавено, но в периоди на кризи и придружаващи инфекции се ускорява (1).
3. Хемостазни показатели – обикновено се открива активация на коагулационните фактори, дори и в състояние на равновесие (извън периодите на криза).
4. Биохимия – типична лабораторна констелация, потвърждаваща хемолитичния тип анемия: увеличена активност на лактатдехидрогеназата (ЛДХ), увеличени стойности на общия билирубин (за сметка на индиректната му фракция), понижени до липсващи нива на хаптоглобин. Изследват се и показателите от обмяната на желязото – ако СКА не е придружена с железен дефицит и/или възпалител-

ни усложнения, то се установяват увеличени нива на серумното желязо, увеличени нива на феритин, намалени нива на трансферин и понижен желязо-свързващ капацитет.

- Урина – при засягане на бъбреците се установяват микро- или макроскопска хематурия и албуминурия, както и намалена възможност за концентриране на урината.

Тъй като горе описаните показатели са неспецифични и могат да се наблюдават и при други хематологични и нехематологични заболявания се налага при скринирането да се проведат други по-специфични тестове.

Традиционни скриниращи тестове за доказване на HbS и други хемоглобинози, водещи до СКА:

Описани са още в 30-те, 40-те години на миналото столетие и се основават на един общ принцип – създават се условия, водещи до намалено съдържание на O_2 в еритроцитите с основна последица превръщане на оксигемоглобина в редуцирана форма. Това улеснява полимеризирането на абнормния Hb, ако го има, и предизвиква промяна във формата на еритроцитите във вид на сърп.

- Тест с цитратна кръв под парафин – няколко капки кръв се поставят в епруветка с изотоничен разтвор и прибавен натриев цитрат; изолира се от атмосферния кислород с помощта на 1см слой парафин и се изчаква едно денонощие. Изготвят се две кръвни натривки (едната от нативната кръв – контрола) и друга – от инкубираната под парафин кръв. При позитивен тест във втората се наблюдават еритроцити със сърповидна форма, като последица на създадените хипоксични условия.
- Тест с натриев метаби сулфат (силен химически редутор, който редуцира оксигемоглобина) – смесват се 1 капка кръв с 1 капка 2% натриев метаби сулфат върху предметно стъкло; покрива се с покривно стъкло, чиито краища се залепват с восъчна/вазелинова смес или с лак за нокти. Остава се да престои при стайна температура в продължение на 1 до 4 часа, рядко до 24 часа. При позитивни проби се наблюдават променени под формата на сърп еритроцити.
- Тест за разтворимост – ако HbS е в редуцирано състояние е доста неразтворим в концентриран фосфатен буфер. При тези условия HbS образува тактоиди (водни кристали), които пречупват и разсейват светлината и предизвиква мътнина. Еритроцитите се лизират чрез химически средства (например те-

трахлорметан), освободеният Hb се редуцира с помощта на натриев хидросулфит. Така, ако е абнормен и се постави в концентриран фосфатен буфер, ще доведе до помътняване на разтвора.

Тези тестове са относително бързи и евтини и все още се практикуват в т. нар. страни от третия свят. Неудобството им е, че е необходимо да се приготвят нужните за тях разтвори в самите клинични лаборатории, а при първите два от тях е необходимо и да се изчака няколко часа до едно денонощие до отчитане на теста.

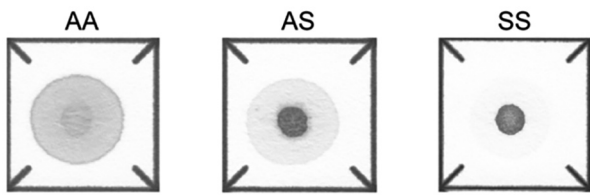
Бързи скриниращи тестове за доказване на HbS и други хемоглобинози, водещи до СКА:

В развитите икономически страни се предлагат бързи търговски китове за скриниране на индивидите в риск от развитие на СКА.

- Тест за разтворимост на HbS: търговски продукти на ASI (Arlington Scientific, Inc), Fisher Scientific (подразделение на Thermo Fisher Scientific) и много др. Базирант се на гореописания принцип, но съдържат удобни и готови за употреба реактиви в различни разфасовки (25, 100 или 500 теста) и скала, с чиято помощ лесно се отчита турбидността. Работи се с улеснена процедура и резултатите се отчитат между 5-та и 30-та минута. Тестът се позитивира при наличие не само на HbS, но и при наличие и на други хемоглобинози, характеризиращи се с намалена разтворимост – HbC (Harlem), HbC (Georgetown), HbH (хемоглобин, формиращ телца на Heinz) и др. Фалшиво позитивни резултати могат да се получат при спленектомирани пациенти, поради наличие в еритроцитите им на множество неразтворими еритроцитни включвания. Фалшиво позитивиране може да има и при силно липемична кръв или такава с високо съдържание на общ белтък. В тези случаи може да се работи с променена процедура и предварително отделени и промити еритроцити. Фалшиво негативни резултати могат да се получат при $Hb < 70g/L$, при $HbS < 20\%$ и при деца под тримесечна възраст (3).
- РОСТ тест, основан на плътността на еритроцитите (тези с висока плътност, $\rho > 1.120g/cm^3$, са характерни за СКА). Предложеният тест разделя еритроцитите според плътността им, поставени в капилярка, предварително запълнена с водоразтворими мултифазни полимери (Aqueous Multiphase Systems (AMPS)), което позволява визуално отчитане на резултатите за по-малко от 12 минути. Недостатък на теста е, че не разграничава хетерозиготите,

които принципно са безсимптомни (HbAS) от индивидите с нормален Hb, но дава бърз, точен и надежден резултат за HbSS и HbSC вариантите, т.е. точно за тези индивиди, които развиват тежка клинична симптоматика и се нуждаят от превантивна и адекватна медицинска помощ (8).

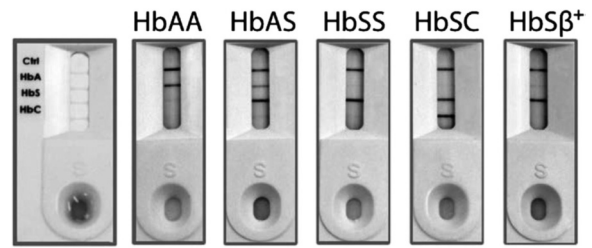
3. Микрофлуиден тест върху хроматографска хартия. Основава се на разтворимостта на различните типове Hb и възможността те да се придвижват с различна скорост върху хартиения носител (фиг.1). Разграничава добре HbAA, HbAS, HbSS. Може да се изпълни за 30 минути и е с цена около 0,07 долара (14).



Фиг. 1. Характерни образи на резултати, получени с микрофлуиден тест върху хроматографска хартия

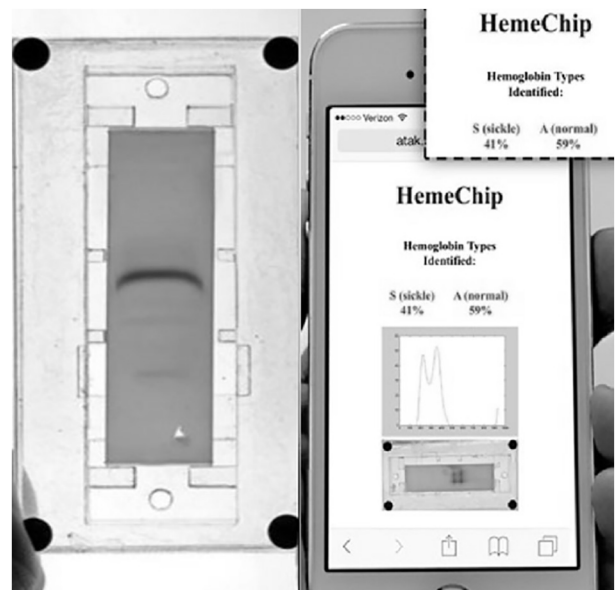
4. Sickle SCAN™ POCT тест. Основава се на неконкурентен (сандвичев) хроматографски имуноанализ за качествено определяне на HbA, HbS и HbC в пълна кръв. Мишо моноклонално тяло срещу C-края на алфа веригата на човешки Hb се използва като детектиращо анти тяло, което е конюгирано за синьо оцветени наночастички. Три поликлонални антитела срещу N-края на HbS, HbC и HbA се използват като захващащи антитела върху тест линиите, а анти-мишо IgG анти тяло се използва като захващащо анти тяло върху контролната линия. Когато капката кръв (нужни са само 5µL) дифундира по абсорбиращата тест лента, оцветените наночастици се свързват с Hb от пробата. Така формираните Ag-Ab комплекси мигрират към тестовите линии, натоварени с антитела срещу различните видове хемоглобин, които специфично ги свързват, ако съществуват в пробата и така се формира синьо оцветена лента. Излишъкът от конюгираните наночастички се захващат от антителата, фиксирани за контролната линия. Това служи за контрол, че достатъчно количество от пробата е използвано и е преминала по цялата тест лента (фиг. 2). Тестът се осъществява в рамките на 5 минути (7).

5. HemeChip – микро-електрофорезен тест (най-нов на пазара POCT тест за скрининг на СКА,



Фиг. 2. Резултати, получени със Sickle SCAN™ теста

фиг.3). Минимално количество кръв се поставя върху целулозна хартия в алкална среда, която веднага се поставя в устройство, съдържащо микрочип за целулозно-ацетатна електрофореза. Захранваща батерия създава електрично поле, създаващо условия да се разделят хемоглобиновите варианти, въз основа на електричния им заряд. Устройството дава не само качествена, но и количествена оценка на типовете Hb, съдържащи се в пробата, използвайки специална апликация на мобилен телефон за разчитане на интензивността на цвета. Резултатите са валидирани както със стандартните електрофорези, така и с HPLC, като се посочва корелация >0.96 за всички типове Hb: HbF, HbS, HbC, HbA, HbD (16).



Фиг. 3. HemeChip – микро-електрофорезен POCT тест за скрининг на СКА

Потвърдителни методи за доказване СКА

Освен бързите тестове, които могат да се осъществят „край леглото на болния“ се провеждат и потвърдителни изследвания за доказване наличие на един или друг вид хемоглобиноза в големите централизираните болнични лаборатории. Те могат да си позволят скъпата апаратура

за протеинов анализ, както и разполагат с квалифициран персонал за работа с тази апаратура.

Традиционните методи, използвани за доказване на хемоглобиновите варианти при СКА са изоелектрично фокусиране (IEF), високо ефективна течна хроматография (HPLC) и електрофореза (капилярна (CE) или върху носител).

1. Изоелектрично фокусиране – използват се агарозни гелове, за да се разделят хемоглобиновите фракции и варианти въз основа на различните им изоелектрични точки. При този метод могат да се разделят добре един от друг HbA, HbF и HbS, както и HbC от HbE и HbO (6).
2. Високо ефективна течна хроматография – пробата, съдържаща Hb, преминава през колона, изпълнена с твърд адсорбентен материал. Използва се принципа на катионния обмен – според заряда и големината си всеки вид молекула ще се адсорбира и свързва по-слабо или по-силно към частиците на твърдия адсорбентен материал и ще се придвижва с различна скорост през колоната. Така различните хемоглобинови варианти (HbF, HbA₂, HbS, HbC, HbBarts и др.) се разделят един от друг и се определят количествено (9,10).
3. Електрофорезата (върху носител или капилярна) традиционно се използва за разделяне и определяне на хемоглобиновите варианти. В зависимост от рН на средата белтъчните молекули (в случая хемоглобиновите варианти – HbF, HbA, HbA₂, HbS, HbC, HbBarts и др.) имат различен заряд. Според този заряд и големината си в електрично поле те се предвижват с различна скорост през носителя (гела) или в капилярката (3).

ПРЕНАТАЛНА ДИАГНОСТИКА

За целите на превантивната медицина изключително значение имат методите на пренатална диагностика. В съвременността се използва ДНК анализ, базиран на PCR (polymerase chain reaction) техники за доказване на точковата мутация (GAG → GTG) в шести кодон на β глобиновия ген от ДНК веригата на фетуса. Използва се при семейства с доказан риск от раждане на дете със СКА (15).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Скринингът, ранната диагностика, профилактика и лечение са от изключителна важност за намаляване на тежките последици както за отделните индивиди със СКА, така и за общест-

вството като цяло (12). Необходимо е да се познават различните диагностични способности и методи за доказване на хемоглобиноза S, за да могат да се прилагат подходящите от тях в зависимост от различните икономически възможности на обществото и на болничните заведения – тези, разполагащи с по-голям ресурс или тези, разполагащи с по-малък.

ЛИТЕРАТУРА

4. Ahmed YF, Abbag FI, Al-Qahtani JM, Ghazali BM, Abolfotouh MA. Erythrocyte sedimentation rate during steady state, painful crisis and infection in children with sickle cell disease. *Saudi Med J*. 2000;21(5):461-463.
1. Bartolucci P. Hémoglobinopathies: un avantage contre le paludisme. *La Revue du Praticien*. 2014;64:1110-1111.
2. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clin Chem*. 2000;46(8 Pt 2):1284-1290
3. De Franceschi L, Corrocher R. Established and experimental treatments for sickle cell disease. 2004;89(3):348-56.
4. Ferrone FA. Polymerization and sickle cell disease: a molecular view. *Microcirculation*. 2004;11(2):115-128.
5. Jenkins MA, Ratnaik S. Capillary isoelectric focusing of haemoglobin variants in the clinical laboratory. *Clin Chim Acta*. 1999;289(1-2):121-132.
6. Kanter J, Telen MJ, Hoppe C, Roberts CL, Kim JS, Yang X. Validation of a novel point of care testing device for sickle cell disease. *BMC Med*. 2015;13:225.
7. Kumar AA, Patton MR, Hennek JW, Lee SY, D'Alesio-Spina G, Yang X et al. Density-based separation in multiphase systems provides a simple method to identify sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(41):14864-14869.
8. Kutlar A, Kutlar F, Wilson JB, Headlee MG, Huisman TH. Quantitation of hemoglobin components by high-performance cation-exchange liquid chromatography: its use in diagnosis and in the assessment of cellular distribution of hemoglobin variants. *Am J Hematol*. 1984;17(1):39-53.

9. Kutlar F, Kutlar A, Huisman TH. Separation of normal and abnormal hemoglobin chains by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1986;357(1):147–153.
10. Marengo-Rowe AJ. Structure-function relations of human hemoglobins. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2006 Jul; 19(3): 239–245
11. Piel FB, Patil AP, Howes RE, et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *Lancet*. 2013;381(9861):142–151.
12. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2017;376(16):1561-1573.
13. Piety NZ, Yang X, Kanter J, Vignes SM, George A, Shevkoplyas SS. Validation of a lowcost paper-based screening test for sickle cell anemia. *PLoS One*. 2016;11(1):e0144901
14. Singh PJ, Shrivastava AC, Shrikhande AV. Prenatal diagnosis of sickle cell disease by the technique of PCR. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2015 Jun;31(2):233-41.
15. Ung R, Alapan Y, Hasan M et al. Point of Care Screening for Sickle Cell Disease by a Mobile Micro-Electrophoresis Platform. *Blood* 2015;126:3379.

*Адрес за кореспонденция:
Елена Станчева Манова
Студент, МК Варна
бул. "Цар Освободител" 84
e-mail: mechito1991@abv.bg*