

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.36-004-07:616.15-074

Барановская И.Б., Зенцова О.А., Сысоева И.П.

ОСОБЕННОСТИ НОВЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГЕМОГРАММЫ ПРИ ЦИРРОЗАХ ПЕЧЕНИ

ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2» Министерства здравоохранения Краснодарского края, 350012, г. Краснодар, Российская Федерация

Проанализирована диагностическая значимость новых показателей гемограммы при циррозах печени, ассоциированных с тромбоцитопениями (n = 64). Установлено, что по сравнению с контрольной группой у пациентов с циррозами статистически значимо увеличено содержание незрелых клеток трех ростков гемопоэза: ретикулоцитов до $1,99 \pm 1,54\%$, гранулоцитов до $0,44 \pm 0,77\%$, незрелых тромбоцитов до $3,23 \pm 1,7\%$. При патологии печени отмечен «левый сдвиг» ретикулоцитарной и лейкоцитарной формулы, достоверно снижено содержание гемоглобина в ретикулоцитах. Увеличение содержания фрагментированных эритроцитов (Frg) до $0,83 \pm 1,21\%$, а также уровня дельта-гемоглобина ($D-He > 4 \text{ ng}$) интерпретировали как дополнительные маркеры гемолиза. При этом отрицательные значения дельта-гемоглобина ($D-He < 0 \text{ ng}$) у 6,3% пациентов сопряжены с сопутствующим воспалением. В результате исследования получены новые данные об особенностях кроветворения при циррозах печени, повышающие качество лабораторного мониторинга пациентов с данной патологией.

Ключевые слова: цирроз печени; незрелые клетки крови; ретикулоциты; тромбоциты.

Для цитирования: Барановская И.Б., Зенцова О.А., Сысоева И.П. Особенности новых показателей гемограммы при циррозах печени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(10):705-710. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-705-710.

Baranovskaya I.B., Zentsova O.A., Sysoieva I.P.

THE CHARACTERISTICS OF THE NEW INDICES OF HEMOGRAM UNDER LIVER CIRRHOSIS

The Kraievaia clinical hospital №2 of Minzdrav of Krasnodarskii kraii, 350012 Krasnodar, Russia

The diagnostic significance of new indices of hemogram under liver cirrhosis associated with thrombocytopenia (n=64) was analyzed. It is established that in comparison with control group the patients with cirrhosis are characterized by statistically valuable increasing of content of immature cells of three germs of hematopoiesis: reticulocytes up to $1.99 \pm 1.54\%$, granulocytes up to $0.44 \pm 0.77\%$, immature thrombocytes up to $3.23 \pm 1.7\%$. Under liver pathology, the following occurrences are detected: "left shift" of reticulocyte and leukocyte formula; reliable decreasing of content of hemoglobin in reticulocytes. The increasing of both of content of fragmentary erythrocytes (Frg) up to $0.83 \pm 1.21\%$ and level of delta-hemoglobin ($D-He > 4 \text{ ng}$) were interpreted as additional markers of hemolysis. At that, negative values of delta-hemoglobin ($D-He < 0 \text{ ng}$) in 6.3% of patients are associated with concomitant inflammation. As a result of study, new data was obtained concerning characteristics of hematopoiesis under liver cirrhosis increasing quality of laboratory monitoring of patients with the given pathology.

Key words: liver cirrhosis; immature blood cells; reticulocyte; thrombocyte.

For citation: Baranovskaya I.B., Zentsova O.A., Sysoieva I.P. The characteristics of the new indices of hemogram under liver cirrhosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (10): 705-710. (in Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-705-710.

For correspondence: Baranovskaya I.B., candidate of biological sciences, biologist of clinical diagnostic laboratory of department of clinical research. e-mail: irina.baranovskaya@yandex.ru

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

Financing. The study had no sponsor support.

Received 18.05.2016
Accepted 30.05.2016

В настоящее время современные автоматизированные системы анализа крови предоставляют комплекс новых показателей гемограммы, которые, по сути, «исследовательские» и нуждаются в клинической интерпретации. Так, например, проточная цитофлуорометрия — технология ряда анализаторов серии Sysmex — значительно расширяет возможности исследования клеток различных ростков гемопоэза. При

Для корреспонденции: Барановская Ирина Борисовна, канд. биол. наук, биолог клинико-диагностической лаборатории подразделения клинических исследований, e-mail: irina.baranovskaya@yandex.ru

помощи оптической детекции анализируются качественные особенности клетки крови, зависящие от размера/объема, внутренней структуры, содержания нуклеиновых кислот (РНК/ДНК, зрелость и метаболическая активность). Диагностическая значимость показателей проточной цитофлуорометрии возрастает при состояниях, сопровождающихся гематологическими нарушениями.

Цирроз печени — достаточно распространенное заболевание, которое в манифестной стадии характеризуется дисфункцией трех ростков гемопоэза: лейкоцитарного, эритроцитарного и тромбоцитарного. В общем анализе крови у пациентов с развившимся циррозом печени или печеночной

недостаточностью можно выявить признаки гемолиза, тромбоцитопению, лейкоцитопению [3].

По поводу показателей крови при циррозах печени сведения специальной литературы фрагментарны и противоречивы. Известно, что аномальные показатели эритроцитов, в частности увеличение ретикулоцитов и снижение концентрации гемоглобина, связаны с повышенным риском смерти при трансплантации печени [11]. Имеются данные как о снижении относительного количества ретикулоцитов до 0,79% при наличии фиброза у детей [6], так и о повышении абсолютного количества ретикулоцитов до $0,064 \cdot 10^{12}/л$ у взрослых с верифицированным циррозом печени [9]. Ряд авторов сообщают о комплексном нарушении системы гемостаза, в том числе тромбоцитопении [5, 8, 10].

Что касается новых показателей лейкоцитарного, ретикулоцитарного и тромбоцитарного анализа, получаемых посредством лазерной детекции, то вопрос об их информативной ценности при циррозах печени остается открытым.

Цель работы — выявить информативную ценность новых показателей гемограммы, получаемых при помощи проточной цитофлуорометрии при циррозах печени.

Материал и методы. Анализировали результаты общего анализа крови лиц основной и контрольной групп.

Основная группа представлена 64 пациентами с верифицированным циррозом печени, ассоциированным с тромбоцитопенией. Структура циррозов была следующей: 38 случаев вирусной этиологии, 24 — алиментарно-токсической, 2 — криптогенного генеза. Выборка представлена 30 мужчинами и 34 женщинами в возрасте $62,1 \pm 39,5$ года.

Контрольная группа сформирована из 70 здоровых добровольцев, проходящих плановое профилактическое обследование. Выборка представлена 35 мужчинами и 35 женщинами $55,3 \pm 28,7$ года.

Образцы крови исследовали на анализаторе Sysmex-XE 2100. Анализировали следующие показатели: 1) лейкоцитарные: количество лейкоцитов (WBC, $10^9/л$); относительное количество незрелых гранулоцитов (IG, %); абсолютное количество незрелых гранулоцитов (IG, $10^9/л$); 2) эритроцитарные и ретикулоцитарные: количество эритроцитов (RBC, $10^{12}/л$); гематокрит (HCT, %); средний объем эритроцита (MCV, фл); среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH, пг); средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах (MCHC, г/дл); коэффициент вариации эритроцитов по объему (RDW, %); относительное количество фрагментированных эритроцитов (Frg, %); относительное количество ретикулоцитов (Ret, %); абсолютное количество ретикулоцитов (Ret, $10^{12}/л$); относительное количество незрелых ретикулоцитов (IRF, %); относительное количество ретикулоцитов с низкой, средней и высокой флуоресценцией (LFR, %, MFR, % и HFR%); среднее содержание гемоглобина в ретикулоцитах (Ret-He, пг); дельта-гемоглобин (D-He, пг); 3) тромбоцитарные: количество тромбоцитов, измеренное в импедансном режиме (PLT, $10^9/л$); количество тромбоцитов, измеренное в оптическом режиме (PLT-O, $10^9/л$); относительное количество незрелых тромбоцитов (IPF, %); коэффициент вариации тромбоцитов по объему (PDW, %); средний объем тромбоцита (MPV, фл); процент больших тромбоцитов больше 12 фл (P-LCR, %); тромбокрит (PCT, %).

Анализируемые показатели разделены на две группы: получаемые при помощи импедансной, или кондуктометрической технологии (традиционные параметры) и проточной цитофлуорометрии (новые параметры).

Статистическую обработку данных производили с помощью программ Statistica 7 и Excell 2003. Использовали следующие статистические параметры: *M* — среднее значение, *Sd* — стандартное отклонение, *Sd. er.* — стандартная ошибка. Межгрупповые различия оценивали на основе критерия Стью-

Таблица 1

Традиционные показатели общего анализа крови у пациентов с циррозом печени, ассоциированным с тромбоцитопенией

Показатели	Основная группа (циррозы)	Контрольная группа
	<i>M ± Sd (St. er.)</i>	
WBC, $10^9/л$	5,06 ± 3,37 (0,42)	7,01 ± 1,81 (0,18)
RBC, $10^{12}/л$	4,02 ± 0,75 (0,09)	4,94 ± 0,53 (0,05)
HGB, г/дл	11,49 ± 2,10 (0,26)	13,95 ± 1,57 (0,16)
HCT, %	36,32 ± 6,02 (0,75)	44,94 ± 3,58 (0,36)
MCV, фл	91,51 ± 11,17 (1,4)*	91,84 ± 3,8 (0,38)*
PLT, $10^9/л$	82,45 ± 30,51 (3,81)	256,03 ± 53,36 (5,31)
RDW, %	16,08 ± 3,05 (0,39)	13,15 ± 0,76 (0,08)
PDW, %	13,31 ± 1,99 (0,29)*	13,17 ± 1,66 (0,17)*
MPV, %	11,19 ± 0,91 (0,13)*	11,08 ± 0,78 (0,08)*
P-LCR, %	34,4 ± 7,27 (1,06)*	33,64 ± 6,82 (0,69)*
PCT, %	0,09 ± 0,03 (0,01)	0,28 ± 0,06 (0,01)

Примечание. Здесь и в табл. 2: * — межгрупповые различия статистически недостоверны ($p > 0,05$).

дента при уровне значимости $p \leq 0,05$. Анализировали статистически значимые ($p \leq 0,05$) коэффициенты корреляции по Пирсону (*r*). Для анализа распределения значений показателей рассчитывали кривые, отображающие плотность вероятности $p(x)$ (отношение вероятности к длине интервала) и представляющие собой теоретический аналог гистограммы.

Результаты. В табл. 1 и 2 представлены результаты анализа гемограмм (традиционные и новые показатели) у пациентов с циррозом печени, ассоциированным с тромбоцитопенией, и лиц контрольной группы.

В соответствии с таблицами у пациентов с циррозами по сравнению с контрольной группой статистически значимо снижено количество лейкоцитов (WBC) до $5,06 \pm 3,37 \cdot 10^9/л$, увеличено содержание незрелых гранулоцитов (IG) до $0,44 \pm 0,77\%$, или $0,04 \pm 0,15 \cdot 10^9/л$. Согласно результатам индивидуального анализа, у 46,8% лиц основной группы зарегистрирована лейкоцитопения ($WBC < 4,0 \cdot 10^9/л$).

Таблица 2

Показатели проточной цитофлуорометрии у пациентов с циррозом печени, ассоциированным с тромбоцитопенией

Показатели	Основная группа (циррозы)	Контрольная группа
	<i>M ± Sd (St. er.)</i>	
IG, %	0,44 ± 0,77 (0,10)	0,19 ± 0,11 (0,01)
IG, $10^9/л$	0,04 ± 0,15 (0,02)	0,01 ± 0,01 (0,00)
PLT-O, $10^9/л$	92,08 ± 32,30 (4,04)	290,81 ± 61,53 (6,28)
IPF, %	3,23 ± 1,7 (0,22)	1,89 ± 1,16 (0,12)
Ret, %	1,99 ± 1,54 (0,19)	1,10 ± 0,33 (0,03)
Ret, $10^{12}/л$	0,07 ± 0,04 (0,00)	0,05 ± 0,02 (0,000)
IRF, %	5,03 ± 4,85 (0,61)	3,35 ± 1,78 (0,18)
LFR, %	94,97 ± 4,84 (0,61)	96,59 ± 1,82 (0,18)
MFR, %	4,56 ± 4,15 (0,52)	3,18 ± 1,67 (0,17)
HFR, %	0,47 ± 0,9 (0,11)	0,18 ± 0,20 (0,02)
Ret-He, пг	29,15 ± 5,52 (0,69)	32,54 ± 1,32 (0,13)
D-He, пг	2,71 ± 1,97 (0,25)*	2,90 ± 0,72 (0,07)*
Frg, %	0,83 ± 1,21 (0,15)	0,10 ± 0,14 (0,01)

По сравнению с контрольной группой значения традиционных эритроцитарных показателей (количество эритроцитов, уровень гематокрита, концентрация гемоглобина) у пациентов с циррозом статистически значимо снижены ($p \leq 0,05$), а коэффициент вариации эритроцитов по объему достоверно увеличен (см. табл. 1). Отмечено отсутствие межгрупповых различий, касающихся среднего объема эритроцитов ($p > 0,05$).

Установлено, что при циррозах печени, ассоциированных с тромбоцитопениями, количество тромбоцитов, подсчитанное импедансным методом (PLT), достоверно снижено до $82,45 \pm 30,51 \cdot 10^9/\text{л}$ (см. табл. 1). Содержание тромбоцитов, измеренное в оптическом режиме анализатора (PLT-O), на 10,5% выше, чем PLT, и составляет $92,08 \pm 32,30 \cdot 10^9/\text{л}$ (см. табл. 2). На фоне тромбоцитопении зарегистрировано статистически значимое увеличение незрелых тромбоцитов (IPF) до $3,23 \pm 1,7\%$. Согласно результатам корреляционного анализа, имела место обратная зависимость между содержанием тромбоцитов, измеренном в оптическом режиме, и количеством их незрелых форм ($r = -0,45$).

На рис. 1 представлены гистограммы распределения значений незрелых тромбоцитов основной и контрольной групп.

В соответствии с рис. 1 наиболее вероятное значение (мода распределения) IPF при циррозах печени, ассоциированных с тромбоцитопениями, составляет 4,5%, в то время как у лиц контрольной группы — 2%. Согласно результатам индивидуального анализа, у 6 пациентов IPF значительно превышает норму и составляет 6—10%.

Межгрупповой сравнительный анализ не выявил достоверных различий, касающихся традиционных показателей тромбоцитарного клеточного ряда (PDW, MPV, P-LCR), $p > 0,05$. Статистически значимое снижение тромбокриты (PCT) у пациентов с циррозами обусловлено наличием тромбоцитопении.

У больных основной группы зарегистрировано статистически значимое увеличение относительного и абсолютного содержания ретикулоцитов до 1,99%, или $0,07 \cdot 10^{12}/\text{л}$ (см. табл. 2). Выявлены достоверные различия, касающиеся и других показателей ретикулоцитарного анализа. В частности, содержание незрелых ретикулоцитов (IRF) при циррозах увеличено до $5,03 \pm 4,85\%$, что на 33,4% выше значения аналогичного показателя лиц контрольной группы. Поскольку фракцию незрелых ретикулоцитов составляют ретикулоциты с низкой и высокой флуоресценцией, возрастание IRF, очевидно, сопряжено с увеличением долевого вклада HFR и MFR в общий ретикулоцитарный пул. В целом при циррозах печени, ассоциированных с тромбоцитопениями, зарегистрирована тенденция к омоложению ретикулоцитарной формулы.

У пациентов основной группы среднее содержание гемоглобина в ретикулоцитах (Ret-He) статистически значимо снижено до $29,15 \pm 5,52$ пг ($p \leq 0,05$). Уменьшение Ret-He сопряжено с анемическим синдромом, который в соответствии с критериями ВОЗ зарегистрирован у 72% больных основной группы. Однако в 67% случаях Ret-He вписывался в референсные нормы, составляющие, по данным литературы, 28—35 пг [4].

Установлено, что количество фрагментированных эритроцитов (Frg) у пациентов с циррозами на 88% выше аналогичного показателя лиц контрольной группы и составляет $0,83 \pm 1,21\%$. Рис. 2 демонстрирует вариационный ряд Frg в анализируемых выборках.

В соответствии с рис. 2 при циррозах печени распределение значений Frg описывается пологой кривой с выраженной правосторонней асимметрией; максимальное значение показателя составляет 6%. Согласно данным индивидуального

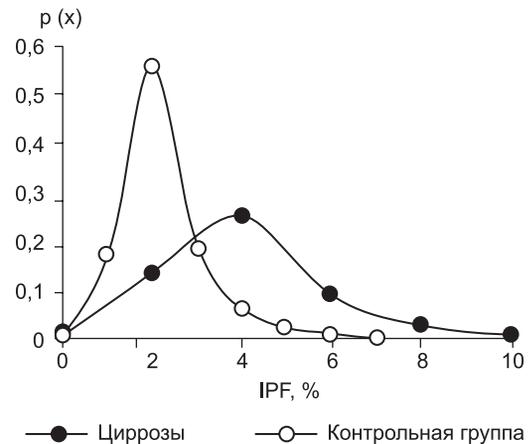


Рис. 1. Гистограммы распределения количества незрелых тромбоцитов.

анализа, у 40% пациентов содержание шизоцитов повышено более чем в 10 раз. Так, у 28,1% больных $\text{Frg} \geq 1\%$, а у 9,4% $\text{Frg} \geq 3\%$. У лиц контрольной группы гистограмма Frg островершинна, наиболее вероятное значение показателя (мода) составляет 0,5%, а максимальное значение показателя — 1,2%.

Согласно полученным данным (см. табл. 2), значение дельта-гемоглобина (D-He) статистически значимо не различалось у лиц основной и контрольной групп, составляя соответственно $2,71 \pm 1,97$ и $2,9 \pm 0,72$ пг. Рис. 3 демонстрирует особенности распределения D-He.

В соответствии с рис. 3 у лиц контрольной группы числовой ряд D-He принимает область положительных значений, распределение близко к «нормальному» гауссовому. Наиболее вероятное значение показателя — 2,5 пг. При циррозах печени, ассоциированных с тромбоцитопениями, диапазон варьирования D-He включает как область отрицательных, так и область положительных значений, варьируя в интервале $[-3,5—7,5]$ пг. Индивидуальный анализ показал, что отрицательные значения D-He < 0 пг зарегистрированы у 6,3% лиц основной группы. Высокие положительные значения показателя (D-He > 4 пг), не встречающиеся в норме, зарегистрированы в 22% случаях цирроза. Корреляционный анализ показал наличие тесных прямых взаимосвязей между

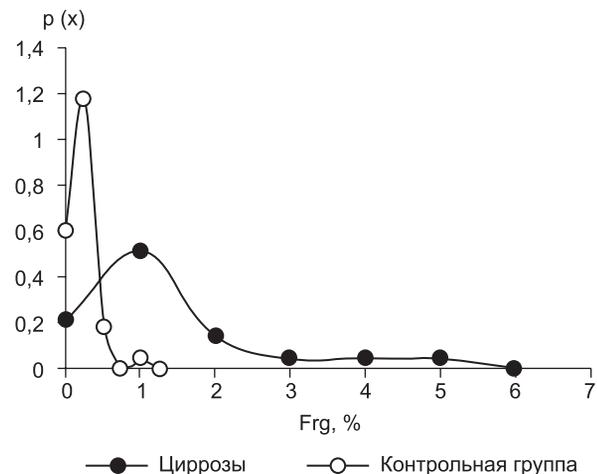


Рис. 2. Гистограммы распределения количества фрагментированных эритроцитов.

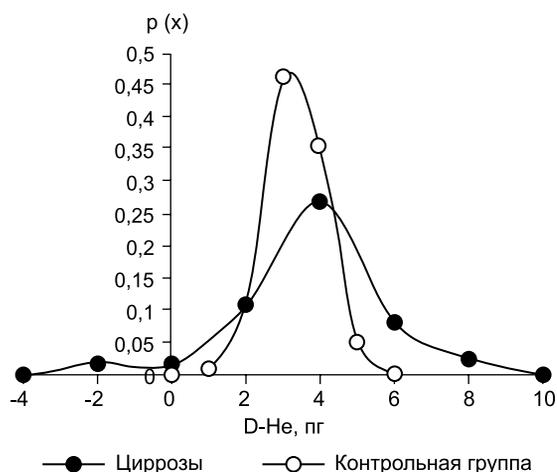


Рис. 3. Гистограммы распределения значений дельта-гемоглобина.

уровнем дельта-гемоглобина и содержанием гемоглобина в ретикулоцитах ($r = 0,57$), а также количеством незрелых гранулоцитов ($r = 0,45$) в условиях нарушения синтетической функции печени.

Обсуждение. Лабораторные показатели при циррозе печени в большинстве случаев не зависят от этиологии заболевания и обусловлены преимущественно уровнем гепатоцеллюлярной недостаточности. При оценке функции печени общепринято ориентироваться на биохимические тесты, в то время как диагностическая значимость показателей проточной цитофлуориметрии, как правило, остается за рамками клинической интерпретации.

Ранее установлено отсутствие значимой математической взаимосвязи новых показателей гемограммы (относительное и абсолютное количество ретикулоцитов, количество незрелых тромбоцитов, уровень дельта-гемоглобина, среднее содержание гемоглобина в ретикулоцитах, количество фрагментированных эритроцитов) с полом и возрастом [1]. Относительная стабильность в норме, низкая биологическая вариабельность, очевидно, повышает клиническую значимость данных параметров в условиях патологии.

Известно, что при циррозах печени, как правило, затронуты все ростки гемопоэза. Выявленная в результате исследования тенденция к лейкоцитопении и омоложению лейкоформулы соответствует общепринятым представлениям о механизмах нарушения гранулоцитопоэза при нарушениях функции печени. На фоне спленомегалии, являющейся частым спутником циррозов, ускоренная деструкция нейтрофилов, сокращенный срок их циркуляции в сосудистом русле [4] обуславливают снижение общего содержания лейкоцитов крови. При этом имеет место задержка созревания части гранулоцитов на стадии промиелоцитов, миелоцитов или метамиелоцитов. Вероятно, здесь по принципу «обратной связи» уменьшение содержания зрелых клеток крови на периферии компенсируется ускоренным выходом из костномозгового депо гранулоцитов, в том числе низкой степени зрелости.

Картина красной крови отражает особенности кинетики и функциональной активности соответствующих клеток гемопоэза при циррозах печени. Изменяется скорость пролиферации и уровень гемоглобинизации, время пребывания клеток в костном мозге, продолжительность циркуляции в периферической крови зрелых клеточных элементов. Согласно полученным данным, у пациентов основной выборки анемия носила умеренный характер, значения эритроцитарных показателей (RBC, HGB, Hct) снижены на 17—20% по сравнению с нормой.

Патогенез гематологических нарушений при циррозах носит мультифакторный характер. Особое значение придает гемолитическим процессам, секвестрирующей роли селезенки, аутоиммунным и токсическим механизмам. Интересно, что, согласно результатам проведенного исследования, в основной выборке зарегистрировано отсутствие статистически значимого увеличения среднего объема эритроцитов (MCV), что было бы естественно для заболевания печени. Наряду с другими возможными факторами генез анемии в данном случае, вероятно, обусловлен преимущественно нарушением процессов гемоглобинизации и созревания эритроидных элементов костного мозга.

Тромбоцитопения при циррозах печени является проявлением гиперспленизма и обусловлена повышенным потреблением за счет увеличенной секвестрации, угнетения активности мегакариоцитов и уменьшением продукции тромбопоэтина [10]. Согласно полученным данным, содержание тромбоцитов, измеренное в оптическом блоке анализатора (PLO-O), достоверно отражало истинное количество клеток за счет правильной идентификации гигантских тромбоцитов (при импедансном методе большие тромбоциты ошибочно подсчитываются как эритроциты).

Вне зависимости от генеза, число тромбоцитов в периферической крови регулируется в соответствии с общебиологическими законами: избыток тормозит тромбоцитопоэз, тромбоцитопения — стимулирует. Действительно, по сравнению с контрольной группой при циррозах зарегистрировано увеличение на 41% долевого вклада незрелых тромбоцитов в общий тромбоцитарный пул. Возрастная IPF свидетельствовало о том, что процессы пролиферации на уровне костного мозга не нарушены, и даже, возможно, имеет место ускоренное тромбоцитотоделение крупных тромбоцитов, а генез тромбоцитопении обусловлен преимущественно ускоренным потреблением клеток на периферии.

Установлено, что значения рутинных показателей тромбоцитарного анализа (PDW, MPV и P-LCR) достоверно не различались в основной и контрольной группе ($p > 0,05$). Отсутствие статистически значимых корреляций с показателями гемограммы дополнительно нивелировало диагностическую значимость тестов. Согласно ранним результатам исследований [2], приводятся данные о низкой информативной ценности P-LCR и MPV в системе дифференциальной диагностики тромбоцитопений беременных.

Результаты исследования продемонстрировали, что из всего спектра тромбоцитарных параметров показатели оптической детекции (IPF, PLT-O) наиболее адекватно отражали особенности тромбоцитопоэза при циррозах печени. Актуальность измерения показателей возрастает в случаях выраженных тромбоцитопений, связанных с необходимостью принятия клинического решения.

Косвенными маркерами функциональной активности клеток костного мозга служат показатели ретикулоцитарного клеточного ряда, чувствительные к эритропоэтину. В норме эритропоэтин не только основной стимулятор пролиферации клеток красной крови, но также индуктор образования мегакариоцитов, увеличения количества и реактивности тромбоцитов [8]. В этой связи логично было бы предположить наличие прямой взаимосвязи между незрелыми клетками эритроцитарного и тромбоцитарного ростков кроветворения. Однако результаты корреляционного анализа свидетельствовали об отсутствии предполагаемой зависимости ($r \approx 0$).

У пациентов с циррозами печени на фоне омоложения ретикулоцитарной формулы отмечено достоверно более высокое по сравнению с нормой количество ретикулоцитов (см. табл. 2). Индивидуальный анализ показал, что в 36% случаев относительное содержание ретикулоцитов превышает 2%, а у 8% больных показатель Ret% выше 5%. Содержание не-

зрелых ретикулоцитов у 12% пациентов превышает 14%, в то время как в контрольной группе IRF $3,35 \pm 1,78\%$. При циррозах печени увеличение общего количества ретикулоцитов, так же как и долевого вклада фракций низкой степени зрелости (IRF, HFR, MFR), обусловлено рядом факторов. Ведущим механизмом здесь, вероятно, служит гемолиз, по принципу обратной связи стимулирующий эритропоэз. О наличии гемолитического компонента при циррозах печени дополнительно свидетельствовало и статистически значимое увеличение фрагментированных эритроцитов: значение Ftg у лиц основной и контрольной групп различалось более чем в 8 раз.

Отдельного внимания заслуживает новый исследовательский показатель дельта-гемоглобин (D-He), представляющий собой математическую разность среднего содержания гемоглобина в ретикулоцитах и среднего содержания гемоглобина в эритроцитах. У здоровых людей значение D-He всегда положительно и колеблется в диапазоне 2—4 пг. Отрицательные значения D-He встречаются нечасто, например при анемиях хронических заболеваний. В случае воспаления гепсидин, синтезируемый печенью, блокирует перенос железа трансферрином, что приводит к дефициту железа, доступно для эритропоэза [12].

Согласно полученным данным, патологически высокие или низкие значения ($2 \text{ пг} > \text{D-He} > 4 \text{ пг}$) зарегистрированы в 46% случаев цирроза печени. У небольшой части пациентов (6,3%) D-He < 0 . Отрицательные значения D-He, очевидно, обусловлены сопутствующим воспалением. В условиях нарушения синтетической функции печени статистически значимое уменьшение содержания гемоглобина в ретикулоцитах (Ret-He) свидетельствовало об ограниченности железа для нужд кроветворения и в целом подтверждало вышеуказанный тренд.

Изменения функциональных характеристик клеток красной крови при патологии печени не ограничиваются ретикулоцитами. Одновременно возникают нарушения на уровне зрелых эритроцитов. При высоких значениях дельта-гемоглобина (D-He $> 4 \text{ пг}$) ретикулоциты насыщены железом. И в генезе нарушения на первое место выступают механизмы гемолиза в периферическом кровяном русле, разрушения в селезенке функционально неполноценных эритроцитов. Последнее обусловлено тем обстоятельством, что при циррозах нарушен синтез метаболитов, необходимых для эритропоэза, в том числе витамина B₁₂. Поэтому отдельные линии эритроцитов представлены гемоглобинизированными мегалоцитами: функционально неполноценными, короткоживущими и осмотически нестойкими.

Таким образом, при циррозах печени отмечают изменения содержания, функциональных характеристик, соотношения зрелых и незрелых клеточных элементов гемопоэза. Анализ показателей проточной цитофлуорометрии позволяет детализировать данные изменения, выявить уровень и размеры нарушений центрального и периферического звеньев эритрона. Получаемая таким образом целостная картина кроветворения способствует выработке адекватной диагностической и клинической стратегии в отношении пациентов с тяжелой печеночной патологией.

Выводы. 1. У пациентов с циррозами, ассоциированными с тромбоцитопениями, содержание тромбоцитов, измеренное в оптическом режиме (PLT-O), на 10,5% выше, чем подсчитанное импедансным методом. В случае критически низких концентраций тромбоцитов представляется целесообразным ориентироваться на показатель PLT-O как наиболее адекватно отражающий истинное число тромбоцитов.

2. Количество незрелых тромбоцитов у пациентов с циррозом печени, ассоциированным с тромбоцитопенией, статистически значимо увеличено до $3,23 \pm 1,7\%$, что сви-

детельствует об активации костномозгового тромбоцитопоэза. Степень «запроса» на незрелые клетки регулируется по принципу обратной связи.

3. Расчетные показатели тромбоцитарного анализа (PDW, MPV и P-LCR) не предоставляют дополнительную информацию, характеризующую особенности тромбоцитопоэза при циррозах печени, ассоциированных с тромбоцитопенией.

4. Установлено, что при циррозах печени имеет место диссоциация между содержанием лейкоцитов и количеством незрелых гранулоцитов: тенденция лейкоцитопении сопровождается «левым сдвигом» лейкоформулы.

5. По сравнению с контрольной группой при циррозах печени, ассоциированных с тромбоцитопениями, статистически значимо увеличено относительное и абсолютное количество ретикулоцитов, снижено среднее содержание гемоглобина в ретикулоцитах, имеет место омоложение ретикулоцитарной формулы ($p \leq 0,5$).

6. Дельта-гемоглобин (D-He) при циррозе печени, ассоциированных с тромбоцитопенией, принимает как положительные, так и отрицательные значения. Отрицательные значения D-He сопряжены с сопутствующим воспалительным компонентом. Выявлена прямая взаимосвязь между D-He и содержанием гемоглобина в ретикулоцитах ($r = 0,57$), D-He и количеством незрелых гранулоцитов ($r = 0,45$).

7. При циррозах печени статистически значимое увеличение по сравнению с нормой среднего содержания фрагментов (0,83 \pm 1,21%) и/или уровня дельта-гемоглобина (D-He $> 4 \text{ пг}$), вероятно, обусловлены сопутствующим гемолитическим компонентом, характерным для патологии печени.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 6—12 см. REFERENCES)

1. Барановская И.Б., Зенцова О.А., Самохина О.Ф., Демидченко Г.А., Тен Ф.П. Новые показатели общего анализа крови в клинической практике. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; (12): 19—23.
2. Барановская И.Б., Зенцова О.А., Самохина О.Ф., Демидченко Г.А., Тен Ф.П. Тромбоцитарные показатели при тромбоцитопениях беременных. *Вестник муниципального здравоохранения*. 2013. Available at: <http://vestnik.kmldo.ru/pdf/13/05/07.pdf> (дата обращения 3 ноября 2013).
3. Ерёмкина Е.Ю. Болезнь Вильсона—Коновалова. *Вестник современной клинической медицины*. 2011; 4(1): 38—46.
4. Луговская С.А. Лабораторная гематология. М.: Триада; 2006.
5. Тугушев А.С., Кремзер А.А., Избитский В.В., Нечепуренко И.Г., Панченко Л.В. Оценка показателей гемостаза при циррозе печени. *Запорожский медицинский журнал*. 2011; 13(3): 74—5.

Поступила 18.05.16

REFERENCES

1. Baranovskaya I.B., Zentsova O.A., Samokhina O.F., Demidenko G.A., Ten F.P. New indicators of complete blood count in clinical practice. *Klinicheskay laboratornaya diagnostika*. 2013; (12): 19—23. (in Russian)
2. Baranovskaya I.B., Zentsova O.A., Samokhina O.F., Demidenko G.A., Ten F.P. Platelet indices with thrombocytopenia in pregnant women. *Vestnik munitsipal'nogo zdravookhraneniya*. 2013. Available at: <http://vestnik.kmldo.ru/pdf/13/05/07.pdf>. (Accessed 3 November 2013) (in Russian)
3. Eremina E.Yu. Wilson's Disease. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny*. 2011; 4(1): 38—46. (in Russian)
4. Lugovskaya S.A. *Laboratory Hematology [Laboratornaya gematologiya]*. Moscow: Triada; 2006. (in Russian)
5. Tugushev A.S., Kremzer A.A., Izbitskiy V.V., Nechipurenko I.G., Panchenko L.V. Assessment of hemostasis in liver cirrhosis. *Zaporo-*

- zhskiy meditsinskiy zhurnal* (Ukrainian). 2011; 13(3): 74—5. (in Russian)
- Akyay A., Olcay L., Kuzu I., Bozdoğan N., Ünal-İnce E., İleri T. et al. A child with myelodysplastic syndrome with hypocellular fibrosis. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2010; 32(8): 617—20.
 - Buttarelo M., Plebani M. Automated blood cell counts: state of the art. *Am. J. Clin. Pathol.* 2008; 130(1): 104—6.
 - Homoncik M., Jilma-Stohlawetz P., Schmid M., Ferlitsch A., Peck-Radosavljevic M. Erythropoietin increases platelet reactivity and platelet counts in patients with alcoholic liver cirrhosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2004; 20(4): 437—43.
 - Kabutomori O., Kanakura Y., Iwatani Y. Marked decreases of total and immature reticulocytes in myelodysplastic syndrome among patients with pancytopenia. *Acta Haematol.* 2003; 109(4): 212—3.
 - Kim H.R., Park B.R., Lee M.K., Park A.J., Ahn J.Y. Comparison of an immature platelet fraction and reticulated platelet in liver cirrhosis. *Korean J. Lab. Med.* 2007; 27(1): 7—12.
 - Parker R., Armstrong M.J., Bruns T. Reticulocyte count and hemoglobin concentration predict survival in candidates for liver transplantation. *Transplantation.* 2014; 97(4): 463—9.
 - Weiman A., Weiman K., Lun A. Hämatologische Veränderungen in der intensivmedizin — Das erweiterte Blutbild. *Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* 2009; 44(3): 164—70. (in German)

Received 18.05.16

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.373:578.2451.03:616.832-004.21.015.4

Назаров В.Д.¹, Лапин С.В.¹, Суркова Е.А.¹, Макшаков Г.С.², Мазинг А.В.¹, Евдошенко Е.П., Тотолян А.А.³

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВЯЗЫВАЮЩИХ И НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ПРЕПАРАТАМ ИНТЕРФЕРОНА-БЕТА

¹ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский ГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург;

²СПбГБУЗ «Городская клиническая больница № 31», 197110, г. Санкт-Петербург; ³Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 197101, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Рекомбинантный человеческий интерферон-бета (ИФН-β) является наиболее часто используемым для лечения ремиттирующей-рецидивирующей формы рассеянного склероза лекарственным средством. У части пациентов отсутствует клинический ответ на проводимую терапию, что может быть обусловлено появлением антител к био-препарату. В зависимости от возможности блокировать связывание ИФН-β со своим рецептором все антитела, образующиеся против ИФН-β, делятся на связывающие и нейтрализующие. Целью данной работы является исследование аналитических и клинико-диагностических параметров тестов, использующихся для определения различных типов антител, синтезирующихся против ИФН-β. В исследовании участвовали 33 пациента с диагнозом рассеянный склероз, ремиттирующая-рецидивирующая форма, получавших терапию ИФН-β-1а, а также 40 доноров и 15 больных рассеянным склерозом, не получавших терапию ИФН-β. Концентрация связывающих антител измерялась с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), а также методом иммуноблоттинга. Титр нейтрализующих антител был определен с помощью чувствительной к ИФН-β клеточной линии HL-116. Связывающие и нейтрализующие антитела у доноров и пациентов, не получавших ИФН-β, выявлены не были. Распространенность связывающих антител к препаратам ИФН-β-1а составила 57,6% при исследовании образцов с помощью метода иммуноблоттинга и 60,6% при использовании коммерческой тест-системы. Статистический анализ результатов показал высокую сходимость и корреляцию значений концентрации связывающих антител, полученных при использовании метода иммуноблоттинга и иммуноферментного теста ($r = 0,9159$, $p < 0,0001$). У 21,21% пациентов обнаружены клинически значимые титры нейтрализующих антител. Все пациенты с клинически значимым титром нейтрализующих антител были положительны в отношении связывающих антител, измеренных методами ИФА и иммуноблоттинга. Показана высокая корреляция значений титров нейтрализующих антител с концентрацией связывающих антител, измеренных методом иммуноблоттинга ($r = 0,7909$, $p = 0,0055$). Использование в клинической практике данных о наличии связывающих и нейтрализующих антител к ИФН-β поможет оптимизировать терапию дорогостоящими биологическими препаратами у пациентов с рассеянным склерозом и другими аутоиммунными заболеваниями.

Ключевые слова: рассеянный склероз; интерферон-бета; иммуногенность; нейтрализующие антитела; связывающие антитела.

Для цитирования: Назаров В.Д., Лапин С.В., Суркова Е.А., Макшаков Г.С., Мазинг А.В., Евдошенко Е.П., Тотолян А.А. Методы определения связывающих и нейтрализующих антител к препаратам интерферона-бета. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61 (10): 710-714. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-710-714.

Nazarov V.D.¹, Lapin S.V.¹, Surkova E.A.¹, Makshakov G.S.², Mazing A.V.¹, Evdoshenko E.P., Totolian A.A.³

THE METHODS OF DETECTION OF BINDING AND NEUTRALIZING ANTIBODIES TO PREPARATIONS OF INTERFERON-BETA

Для корреспонденции: Назаров Владимир Дмитриевич, сотр. научно-исследовательского центра по мол. медицине ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский ГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, e-mail: Nazarov19932@mail.ru