

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
( Н И У « Б е л Г У » )

ИНСТИТУТ ФАРМАЦИИ, ХИМИИ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА БИОЛОГИИ

**ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ И  
БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ ПРИ НАРУШЕНИИ  
ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ**

Магистерская диссертация  
обучающегося по направлению подготовки 06.04.01 Биология  
очной формы обучения, группы 11001741  
Махди Али Абед Махди

Научный руководитель  
к.б.н., доцент кафедры биологии  
Зубарева Е. В.

Рецензент  
Зав. кафедрой естественно-  
математического и  
технологического образования  
ОГАОУ ДПО «БелИРО», к.б.н.  
Трапезникова И.В.

БЕЛГОРОД 2019

## Оглавление

Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	6
1.1 Функциональные и морфологические особенности крови.....	6
1.1.1 Плазма крови .....	6
1.1.2. Форменные элементы крови .....	7
1.1.2.1. Эритроциты.....	7
1.1.2.2. Гемопоз.....	9
1.1.2.3. Лейкоциты.....	9
1.1.2.4. Образование и продолжительность жизни лейкоцитов.....	13
1.1.2.5. Тромбоциты .....	14
1.2 Особенности функционирования иммунной системы .....	15
1.3. Парадоксальная роль иммунной системы в ходе развития онкологических заболеваний .....	18
1.3.1 Иммунные клетки и тканевый гомеостаз .....	19
1.3.2. Хроническое воспаление и развитие рака .....	21
1.3.3. Адаптивный иммунитет, воспаление и рак.....	25
1.4. Нарушение функционирования иммунной системы при лимфоме.....	27
Глава 2. Материалы и методы исследования .....	31
2.1. Общий анализ крови .....	34
2.2. Биохимический анализ крови .....	35
Глава 3. Полученные результаты и их обсуждение.....	38
3.1. Показатели общего анализа крови .....	39
3.1.1. Показатели общего анализа крови мужчин, больных злокачественными опухолями иммунной системы .....	39
3.1.2. Показатели общего анализа крови женщин, больных злокачественными опухолями иммунной системы .....	43
3.2. Показатели биохимического анализа крови.....	47

3.2.1. Показатели биохимического анализа крови мужчин, больных злокачественными опухолями иммунной системы .....	47
3.2.2. Показатели биохимического анализа крови женщин, больных злокачественными опухолями иммунной системы .....	50
3.3. Показатели, характеризующие свертывающую систему крови.....	53
3.3.1. Показатели гемостаза мужчин .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.3.2. Показатели гемостаза женщин .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
Выводы .....	55
Список использованных источников .....	56

## Введение

Проблемы онкологии остаются в центре внимания из-за постоянного роста заболеваемости злокачественными опухолями и смертности от них. Актуальность изучения особенностей системы крови у людей с системными злокачественными опухолями иммунной системы обусловлена тем, что исследование периферической крови продолжает оставаться надежным критерием оценки состояния здоровья человека.

Референсные значения (или нормальные значения) гематологических и биохимических параметров используются, чтобы помочь врачам интерпретировать результаты клинических анализов. Они также могут быть использованы в клинических испытаниях в качестве руководства для установления критериев включения / исключения, а также в качестве основы мониторинга безопасности для участников испытаний [Koram et al., 2007; Nduka et al., 1988; Horn, Pesce, 2002].

Ряд факторов влияет на гематологические показатели у практически здоровых людей. В том числе методика и время забора крови, транспортировка и хранение образцов, положение человека при взятии крови, предшествующая физическая активность. Вариация используемых аналитических методов может также повлиять на измерения. Это все может быть стандартизировано. Более значимое влияние оказывают характеристики самого организма, такие как пол, возраст, телосложение, генетический фон, адаптация к диете и окружающей среде [International Committee ..., 1981; Dykaer, Solwra, 1987].

Целью диссертационного исследования явилось изучение содержания форменных элементов крови и биохимических показателей крови при нарушении функционирования иммунной системы в результате развития онкологических заболеваний.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- 1) Изучить показатели биохимического анализа крови людей с системными злокачественными опухолями иммунной системы;
- 2) Исследовать изменение показателей гематологического анализа крови в условиях развития злокачественных опухолей иммунной системы;
- 3) Выявить особенности изменений показателей системы крови под влиянием лечения.

Объект диссертационного исследования – люди, у которых диагностированы заболевания кроветворной и лимфатической ткани.

Предмет диссертационного исследования – показатели периферической крови.

Научная новизна исследования заключается в получении данных, характеризующих гематологические показатели людей с системными злокачественными опухолями иммунной системы до и после химиотерапии.

Практическая значимость работы заключается в том, что полученные результаты могут быть использованы для определения референсных значений показателей, регистрирующихся при измененном состоянии организма. Также могут быть использованы с диагностическими целями.

Магистерская диссертация изложена на 80 страницах. Она состоит из оглавления (содержания), введения, трех основных разделов, заключения. Список использованных источников насчитывает 52 наименования. В работе используются 7 таблиц, 12 рисунков и приложения.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 Функциональные и морфологические особенности крови

#### 1.1.1 Плазма крови

Плазма крови представляет собой жидкость соломенного цвета. Основную часть плазмы составляет вода (около 90%), в плазме содержится более 100 различных растворенных веществ, в том числе, питательные вещества, газы, гормоны, продукты жизнедеятельности клеток, ионы и белки.

Плазменные белки являются наиболее многочисленными компонентами плазмы крови, на которые приходится около 8% по массе объема плазмы. За исключением гормонов и гамма-глобулинов, большинство белков плазмы вырабатываются печенью. Белки плазмы крови выполняют множество функций, но они не поглощаются клетками для использования в качестве питательных веществ, как большинство других растворов плазмы, таких как глюкоза, жирные кислоты и аминокислоты [Marieb, Hoehn, 2012].

Альбумин составляет около 60% белка плазмы. Он выполняет функцию переносчика определенных молекул в крови, является важным буфером крови [Marieb, Hoehn, 2012].

Состав плазмы постоянно меняется по мере того, как клетки удаляют или добавляют вещества в кровь. Тем не менее, при функционировании организма в условиях физиологической нормы, состав плазмы поддерживается относительно постоянным благодаря работе нескольких гомеостатических механизмов. Например, когда уровень белка в крови снижается, это опосредует стимуляцию процессов синтеза белка в печени. Когда повышается содержание ионов водорода в крови и значение pH сдвигается в кислую сторону (ацидоз), системы дыхания и выделения восстанавливают pH плазмы до уровня физиологической нормы. Органы, ткани претерпевают множество изменений в течение суток, чтобы поддерживать гомеостатические константы плазмы крови в границах нормы [Marieb, Hoehn, 2012].

## 1.1.2. Форменные элементы крови

Форменные элементы крови представлены эритроцитами, лейкоцитами и тромбоцитами, имеют некоторые особенности. Эритроциты не имеют ядер, и тромбоциты являются клеточными фрагментами. Только лейкоциты являются истинными клетками. Большинство образовавшихся элементов выживают в кровотоке всего несколько дней. Большинство клеток крови не делятся. Вместо этого они постоянно обновляются путем деления клеток в красном костном мозге, откуда где происходит их образование [Marieb, Hoehn, 2012].

### 1.1.2.1. Эритроциты

Эритроциты – представляют собой небольшие клетки, около 7,5 мкм в диаметре. Имеют форму двояковогнутых дисков. В эритроцитах содержится гемоглобин (Hb), который выполняет функцию транспорта газа. Также присутствуют другие белки, такие как антиоксидантные ферменты, которые избавляют организм от повреждающих активных форм кислорода.

Эритроциты являются основным фактором, определяющим на вязкость крови. У женщин, как правило, уровень эритроцитов ниже, чем у мужчин – 4,3–5,2 млн клеток в микролитре (1 мкл = 1 мм<sup>3</sup>) крови и 5,1–5,8 млн клеток в микролитре соответственно. Когда число эритроцитов превышает пределы нормы, вязкость крови повышается, и кровь течет медленнее. И наоборот, когда число эритроцитов падает ниже нормального значения, кровь течет быстрее [Marieb, Hoehn, 2012].

Эритроциты полностью посвящены своей работе по транспортировке дыхательных газов (кислорода и углекислого газа). Гемоглобин, белок, который делает красные кровяные клетки красными, легко и обратимо связывается с кислородом, и большая часть кислорода, переносимого кровью, связывается с гемоглобином. Нормальные значения для гемоглобина 14–20

грамм на 100 мл крови (г / 100 мл) у детей 13–18 г / 100 мл у взрослых мужчин и 12–16 г / 100 мл у взрослых женщин.

Гемоглобин состоит из белка глобина, связанного с красным пигментом гемом. Глобин состоит из четырех полипептидных цепей – две альфа и две бета, каждая связывает кольцевую гемовую группу. Каждая гемовая группа несет атом железа в центре. Молекула гемоглобина может транспортировать четыре молекулы кислорода, потому что каждый атом железа может обратимо соединиться с одной молекулой кислорода [Marieb, Hoehn, 2012].

Тот факт, что гемоглобин содержится в эритроцитах, предотвращает его от выхода из кровотока в ткани через пористые капиллярные мембраны.

Насыщение гемоглобина кислородом происходит в легких, откуда кислород транспортируется к клеткам тканей. Когда кислород связывается с железом, гемоглобин, теперь называемый оксигемоглобином, принимает новую трехмерную форму и становится рубиново-красным. В тканях происходит обратный процесс. Кислород отделяется от железа, гемоглобина, в результате образуется дезоксигемоглобин, который характеризуется темно-красным цветом. Высвобожденный кислород диффундирует из крови в тканевую жидкость, а затем в клетки тканей [Marieb, Hoehn, 2012].

Около 20% углекислого газа транспортируется кровью в соединении с гемоглобином, но он связывается с аминокислотными группами глобина, а не с гемом. Это соединение называется карбаминогемоглобин, образование его происходит легче, когда гемоглобин находится в восстановленном состоянии (диссоциирован от кислорода). Нагрузка углекислого газа происходит в тканях, и направление транспорта - из тканей в легкие, где углекислый газ выводится из организма [Marieb, Hoehn, 2012].

Концентрация гемоглобина отражает комплексные эффекты механизмов, которые контролируют как объем эритроцитарной массы, так и объем плазмы. Эритроцитарная масса у здоровых людей поддерживается стимуляцией производства эритроцитов гуморальным фактором – эритропоэтином. Механизм чувствительности в почке, который в зависимости

от концентрации кислорода в тканях контролирует высвобождение эритропоэтина из перитубулярные клетки почек [Hoffman, 2000].

### **1.1.2.2. Гемопоз**

Образование кровяных клеток называется гемопозом. Этот процесс происходит в красном костном мозге, который состоит, в основном, из мягкой сети ретикулярной соединительной ткани, граничащей с широкими кровеносными капиллярами, называемыми синусоидами [Marieb, Hoehn, 2012].

В этой сети располагаются незрелые клетки крови, макрофаги, жировые клетки и ретикулярные клетки (которые секретируют компоненты внеклеточного матрикса). У взрослых красный костный мозг находится главным образом в костях осевого скелета, пояса конечностей, и в проксимальных эпифизах плечевой кости и бедренной кости.

Каждый тип клеток крови образуется в разном количестве в ответ на меняющиеся потребности организма и различные регулирующие факторы. Когда клетки крови созревают, они мигрируют через тонкие стенки синусоидных капилляров, чтобы войти в кровоток. В среднем костный мозг вырабатывает порцию новой крови, содержащей около 100 миллиардов новых клеток каждый день [Marieb, Hoehn, 2012].

### **1.1.2.3. Лейкоциты**

Лейкоциты (WBC) представляют собой белые клетки крови. В среднем насчитывается 4800–10 800 лейкоцитов в микролитре крови.

Лейкоциты имеют решающее значение для защиты от организма от повреждений, бактерий, вирусов, паразитов, токсинов и опухолевых клеток. Белые клетки крови способны покидать кровеносные сосуды – процесс, называемый диапедез, и перемещаться в ткани (в основном свободные соединительные ткани или лимфоидные ткани), где они необходимы для усиления воспалительных или иммунных реакций [Marieb, Hoehn, 2012].

Покинув кровоток, лейкоциты перемещаются через тканевые пространства с помощью амeboидного движения по направлению к химическим веществам, выделяемым поврежденными клетками или другими лейкоцитами, явление, называемое положительным хемотаксисом, они могут точно определять области повреждения тканей и инфекции и собираются там в большом количестве для того, чтобы уничтожать посторонние вещества или мертвые клетки [Marieb, Hoehn, 2012].

Всякий раз, когда белые кровяные клетки мобилизуются для действия, ускоряется процесс их образования в организме. Процесс повышения содержания белых клеток крови более 11000 клеток в микролитре носит название лейкоцитоза. Это является нормальным гомеостатическим ответом организма на инфекцию.

В зависимости от структурных и химических характеристик лейкоциты делят на две основные группы: гранулоциты содержат очевидные мембраносвязанные цитоплазматические гранулы, и у агранулоцитов отсутствуют явные гранулы [Marieb, Hoehn, 2012].

Гранулоциты, которые включают нейтрофилы, базофилы и эозинофилы, имеют сферическую форму. Они крупнее, в большинстве случаев, чем эритроциты. Они имеют лопастные ядра (округлые ядерные массы, связанные более тонкими нитями ядерного материала), и их мембраносвязанные цитоплазматические гранулы специфически окрашиваются. Функционально все гранулоциты способны к фагоцитозу в большей или меньшей степени.

Нейтрофилы являются самым многочисленным пулом лейкоцитов. Нейтрофильная цитоплазма окрашивается в бледно-лиловый и содержит очень мелкие гранулы (двух видов). Они называются нейтрофилами, в связи с тем, что их гранулы окрашиваются двумя красителями: основным (синим) и кислотным (красным). Некоторые из этих гранул содержат гидролитические ферменты и рассматриваются как лизосомы. Другие, особенно более мелкие гранулы, содержат комплекс антимикробных белков, называемых дефензинами [Marieb, Hoehn, 2012].

Ядра нейтрофилов состоят из трех-шести долей. Из-за ядерной изменчивости их часто называют полиморфноядерными лейкоцитами (ПМН).

Нейтрофилы уничтожают бактерии в организме, и их количество значительно увеличивается во время острых бактериальных инфекций, таких как менингит и аппендицит. Нейтрофилы химически притягиваются к участкам воспаления и являются активными фагоцитами. Уничтожение микроорганизмов происходит за счет развития процесса, называемого дыхательным взрывом. Во время дыхательного взрыва, кислород активно метаболизируется с образованием окисляющих субстанций, происходит окисление микроорганизмов, лизис клеток, опосредованный дефенсином [Marieb, Hoehn, 2012].

Эозинофилы составляют 2–4% от общего числа лейкоцитов. Их ядро обычно имеет две доли, соединенные широкой полосой ядерного материала.

Крупные гранулы, которые окрашиваются от кирпично-красного до малинового цвета кислотными (эозиновыми) красителями располагаются в цитоплазме. Эти гранулы содержат лизосомоподобные ферменты. Однако, в отличие от типичных лизосом, им не хватает ферментов, которые специально переваривают бактерии.

Наиболее важной ролью эозинофилов является контратака против паразитических червей, таких как плоские черви (ленточные черви) и круглые черви (острицы и анкилостомы), которые слишком велики для фагоцитирования. Эти черви попадают в пищу (особенно сырую рыбу) или вторгаются в тело через кожу, а затем, как правило, зарываются в слизистую оболочку кишечника или дыхательных путей. Эозинофилы находятся в свободном виде в соединительных тканях на тех же участках тела, и когда они встречают паразитического червя, они собираются вокруг и начинают освобождать ферменты из своих цитоплазматических гранул на поверхность паразита, переваривая его. Эозинофилы играют сложные роли в развитии множества других заболеваний, включая аллергию и астму. Хотя они способствуют повреждению тканей, происходит во многих иммунных

процессах, тем не менее они выступают в качестве важных модуляторов иммунного ответа [Marieb, Hoehn, 2012].

Базофилы – самая малочисленная группа лейкоцитов, составляют в среднем только 0,5–1% популяции лейкоцитов. Их цитоплазма содержит крупные, содержащие гистамин, гранулы, которые имеют сродство к основным красителям и окрашиваются в пурпурно-черный. Гистамин является воспалительным химическим веществом, которое действует как сосудорасширяющее средство (расширяет кровеносные сосуды) и привлекает другие лейкоциты в воспаленный участок.

Гранулированные клетки, похожие на базофилы, называемые тучными клетками, встречается в соединительной ткани. Хотя ядра тучных клеток, как правило, более овальные, чем лопастные, клетки похожи микроскопически, и оба типа клеток связываются с определенным антителом (иммуноглобулин E) что заставляет клетки выделять гистамин. Однако они возникают из разных клеточных линий [Marieb, Hoehn, 2012].

Агранулоциты включают лимфоциты и моноциты, это пул лейкоцитов в цитоплазме которых отсутствуют видимые цитоплазматические гранулы. Хотя они похожи структурно, они выполняют различные функции. Их ядра обычно имеют сферическую или бобовидную форму.

Лимфоциты, на которые приходится 25% или более популяции белых клеток крови, являются вторым по численности пулом лейкоцитов в крови. При окрашивании типичный лимфоцит имеет большое темно-фиолетовое ядро, занимающее большую часть объема клетки.

Ядро, как правило, сферическое, но может быть слегка изогнутым, и окружено тонким ободком бледно-синей цитоплазмы. Диаметр лимфоцитов колеблется от 5 до 17 мкм, но они часто классифицируются по размеру как маленькие (5–8 мкм), средние (10–12 мкм) и большие (14–17 мкм).

Большое число лимфоцитов существует в организме, но только небольшая их часть (в основном мелкие лимфоциты) найдены в кровотоке. На самом деле, лимфоциты так называется потому, что большинство из них тесно

связаны с лимфоидными тканями (лимфатические узлы, селезенка и т. д.), где они играют решающую роль в иммунитете. Т-лимфоциты (Т-клетки) формируют иммунный ответ, действуя непосредственно против инфицированных вирусом клеток и опухолевых клеток. В-лимфоциты (В-клетки) образуют плазматические клетки, которые синтезируют антитела (иммуноглобулины), выделяющиеся в кровь [Marieb, Hoehn, 2012].

Моноциты составляют 3–8% от общего числа лейкоцитов. Они имеют средний диаметр около 18 мкм и являются самыми большими лейкоцитами. У них обильная бледно-голубая цитоплазма и темно окрашенное фиолетовое ядро, которое имеет бобовидную форму.

Когда циркулирующие моноциты покидают кровотока и поступают в ткани, они дифференцируются в очень подвижные макрофаги. Макрофаги активно фагоцитируют, и они играют решающую роль в защите организма от вирусов, а также некоторых внутриклеточных бактериальных паразитов и хронических инфекций, таких как туберкулез. Макрофаги также важны для активации лимфоцитов для запуска иммунной реакции [Marieb, Hoehn, 2012].

#### **1.1.2.4. Образование и продолжительность жизни лейкоцитов**

Лейкопоэз, или образование белых клеток крови, стимулируется химическими мессенджерами. Эти факторы могут действовать как паракринно, так и дистантно, выполняя функцию гормонов. Данные биологически активные вещества по химической природе являются гликопротеинами, которые подразделяются на два семейства гемопоэтических факторов: интерлейкины и колониестимулирующие факторы, или CSFs.

Интерлейкины имеют порядковый номер (например, IL-3, IL-5), большинство CSFs названы в честь популяции лейкоцитов, формирование которых они стимулируют. Например, G-CSF стимулирует выработку гранулоцитов. Гематопоэтические факторы, выделяемые клетками стромы красного костного мозга и зрелыми лейкоцитами, не только побуждают

предшественников лейкоцитов делиться и созревать, но также усиливают защитную активность зрелых лейкоцитов.

Многие из гематопоэтических гормонов (эритропоэтин и несколько колониестимулирующих факторов) используются клинически для стимуляции костного мозга онкологических больных, которые получают химиотерапию (которая подавляет костный мозг) [Marieb, Hoehn, 2012].

#### **1.1.2.5. Тромбоциты**

Тромбоциты не являются клетками в строгом смысле. Это цитоплазматические фрагменты необычайно крупных клеток (до 60 мкм в диаметре), называемых мегакариоцитами. В мазках крови каждый тромбоцит имеет окрашенную в синий цвет внешнюю область и внутреннюю область, содержащую гранулы, окрашивающиеся в пурпурный цвет. Гранулы содержат значительный набор химических веществ, которые действуют в процессе свертывания крови, в том числе серотонин, ионы кальция, различные ферменты, аденозиндифосфат и полученный из тромбоцитов фактор роста (PDGF) [Marieb, Hoehn, 2012].

Тромбоциты необходимы для процесса свертывания, который происходит в плазме при разрыве кровеносных сосудов или повреждении их слизистой оболочки. Прилипая к поврежденному участку, тромбоциты образуют временную пробку, которая помогает закрыть разрыв. Тромбоциты быстро стареют, потому что они безъядерные, и дегенирируют примерно через 10 дней, если они не участвуют в свертывании. В то же время они циркулируют свободно, сохраняя подвижность, но инактивируются молекулами (оксид азота, простациклин), выделяемыми эндотелиальными клетками, выстилающие кровеносные сосуды [Marieb, Hoehn, 2012].

Образование тромбоцитов регулируется гормоном тромбопоэтином. Их непосредственные предковые клетки, мегакариоциты, потомство гемоцитобласта и миелоидной стволовой клетки, но их формирование довольно необычно. В этой линии происходят повторные митозы

мегакариобластов, но цитокинез не происходит. Конечным результатом является формирование мегакариоцита, клетки с огромным, многослойным ядром и большой цитоплазматической массой [Marieb, Hoehn, 2012].

## **1.2 Особенности функционирования иммунной системы**

Иммунная система человека строит свою защиту в несколько уровней. При этом каждый уровень защиты иммунной системы человека более специфичен чем предыдущий. Иммунная система человека на первом уровне - это обычные физические барьеры. Если возбудитель проникает через эти барьеры то в дело вступает врожденная иммунная система человека. Если врожденная иммунная система человека оказывается бессильной против вторжения инородца, то иммунная система человека для этого имеет третий уровень - приобретенная иммунная защита. Эта часть иммунной системы человека формируется в течении какого-либо инфекционного процесса в виде иммунной памяти. Эта память позволяет, чтобы иммунная система человека быстрее и сильнее реагировала затем на появление такой же инфекции.

Кстати, Трансфер фактор - уникальный и универсальный способ формирования данного уровня иммунной защиты. Иммунная система человека имеет множество способов обнаружения и уничтожения чужеродных тел и этот процесс называется иммунным ответом.

Главными же защитниками являются лимфоциты. Именно эти клетки отвечают за уничтожение больных элементов (опухолевых, инфицированных, патологически опасных) или чужеродных микроорганизмов. Самыми важными считаются Т- и В-лимфоциты. Их работа осуществляется в комплексе с прочими иммунными клетками. Все они предотвращают вторжение инородных субстанций в организм. На начальном этапе происходит в некотором роде "обучение" Т-лимфоцитов отличать нормальные (собственные) белки от чужеродных. Этот процесс происходит в тимусе в детском возрасте, поскольку именно в этот период вилочковая железа наиболее активна.

Следует сказать, что иммунная система формировалась в течение продолжительного эволюционного процесса. У современных людей эта структура действует как отлаженный механизм. Он помогает человеку справляться с негативным влиянием окружающих условий. В задачи структуры входит не только распознавание, но и выведение проникших в организм чужеродных агентов, а также продуктов распада, патологически изменившихся элементов. Иммунная система обладает способностью определять большое количество инородных веществ и микроорганизмов. Основной целью структуры является сохранение целостности внутренней среды и ее биологической индивидуальности.

Процесс распознавания Как иммунная система определяет "врагов"? Этот процесс происходит на генном уровне. Здесь следует сказать, что у каждой клетки есть своя, характерная только для данного лица генетическая информация. Ее анализирует защитная структура в процессе обнаружения проникновения в организм или изменений в нем. Если генетическая информация попавшего агента совпадает с собственной, значит, это не враг. Если нет, то, соответственно, это чужеродный агент. В иммунологии "врагов" принято называть антигенами. После обнаружения вредоносных элементов защитная структура включает свои механизмы, начинается "борьба". Для каждого определенного антигена иммунная система продуцирует специфические клетки – антитела. Они связываются с антигенами и нейтрализуют их. Аллергическая реакция Она является одним из механизмов защиты. Это состояние характеризуется усилением реагирования на аллергены. К этим "врагам" относят предметы либо соединения, которые негативно воздействуют на организм. Аллергены бывают внешними и внутренними. К первым следует отнести, например, продукты, принимаемые в пищу, лекарства, различные химические вещества (дезодоранты, духи и прочее). Внутренние аллергены – это ткани самого организма, как правило, с измененными свойствами. К примеру, при ожогах защитная система воспринимает мертвые структуры как чужеродные. В связи с этим она

начинает вырабатывать против них антитела. Аналогичными можно считать реакции на укусы шмелей, пчел, ос и прочих насекомых. Развитие аллергической реакции может происходить последовательно либо бурно. Иммунная система ребенка Ее формирование начинается уже в самые первые недели вынашивания. Иммунная система ребенка продолжает развиваться после его рождения. Закладка основных защитных элементов осуществляется в тимусе и костном мозге плода. Пока малыш находится в материнском утробе, его организм встречается с небольшим числом микроорганизмов. В связи с этим его защитные механизмы неактивны. До рождения ребенок защищен от инфекций иммуноглобулинами матери. Если на нее будут неблагоприятно воздействовать какие-либо факторы, то правильное формирование и развитие защиты малыша может нарушиться. После рождения в этом случае ребенок может болеть чаще, чем другие дети. Но все может произойти по-другому. К примеру, в период беременности мама ребенка может перенести инфекционное заболевание. А у плода может сформироваться стойкий иммунитет к данной патологии. После рождения на организм нападает огромное количество микробов. Иммунная система должна им сопротивляться. В течение первых лет жизни защитные структуры организма проходят своеобразное "обучение" по распознаванию и уничтожению антигенов. Вместе с этим происходит запоминание контактов с микроорганизмами. В итоге формируется "иммунологическая память". Она необходима для более быстрого проявления реакции на уже известные антигены. Надо полагать, что иммунитет у новорожденного слабый, он не всегда способен справиться с опасностью. В этом случае на помощь приходят антитела, полученные внутриутробно от матери. Они присутствуют в организме в течение приблизительно первых четырех месяцев жизни. В течение последующих двух месяцев белки, полученные от матери, постепенно разрушаются. В период с четырех до шести месяцев малыш наиболее подвержен болезням. Интенсивное формирование иммунной системы ребенка происходит до семи лет.

### **1.3. Парадоксальная роль иммунной системы в ходе развития онкологических заболеваний**

Рак – коварное заболевание, причиной которого является появление мутантных последовательностей ДНК, которые перенаправляют важные пути регулирования гомеостаза ткани, выживаемости клеток и / или гибель клеток. В последние десятилетия многое стало известно благодаря исследованию гомогенных популяций опухолевых клеток, которые таят в себе активирующие или инактивирующие генетические мутации; тем не менее, рак представляет собой не просто автономную массу мутантных клеток. В процессе онкологической трансформации изменения затрагивают несколько типов клеток, таких как фибробласты и эпителиальные клетки, врожденные и адаптивные иммунные клетки и клетки, которые образуют кровеносную и лимфатическую сосудистую сеть, а также специализированные мезенхимные типы клеток, уникальные для каждого микроокружения тканей. Принимая во внимание, что гомеостаз ткани поддерживается совместными взаимодействиями между этими разными типами клеток, развитие рака усиливается, когда клетки-мутанты используют эти совместные возможности для того, чтобы способствовать их собственному выживанию [De Visser et al., 2006].

Как выживающие мутантные клетки нейтрализуют гомеостатические ограничения роста и превращаются в массы раковых клеток, которые не только вызывают дисфункцию первичного органа, но и перемещаются в организме и часто вызывают летальные осложнения? Последние механистические исследования, в сочетании с огромным количеством данных клинических исследований, поддерживают утверждение, что развитие рака в значительной степени зависит от способности мутантных клеток изменить и использовать нормальные физиологические процессы хозяина. Известно, что каждый этап развития онкологического заболевания чрезвычайно чувствителен к регулированию иммунными клетками. Тогда как полная

активация адаптивных иммунных клеток в ответ на опухоль может привести к уничтожению злокачественных клеток, хронической активации различных типов врожденных иммунных клеток в или вокруг предзлокачественной ткани, что может фактически способствовать развитию опухоли [De Visser et al., 2006].

### **1.3.1 Иммунные клетки и тканевый гомеостаз**

Иммунная система млекопитающих состоит из множества типов клеток и медиаторов, которые взаимодействуют с неиммунными клетками и друг с другом в сложных и динамических сетях, обеспечивая защиту от чужеродных патогенов, одновременно поддерживая толерантность к собственным антигенам.

Основываясь на специфичности антигена и времени активации, иммунная система состоит из двух отделов – адаптивного и врожденного. В то время как клеточный состав и антигенная специфичность различны, у каждого из них сложились сложные сети взаимодействий, которые позволяют быстро реагировать на повреждение тканей.

Врожденные иммунные клетки, такие как дендритные клетки (ДК), естественные клетки-киллеры (NK), макрофаги, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы и тучные клетки, являются первой линией защиты против чужеродных патогенов. ДК, макрофаги и тучные клетки служат в качестве дозорных клеток, которые располагаются в тканях и постоянно контролируют свою микросреду для своевременного обнаружения признаков бедствия [De Visser et al., 2006].

Когда гомеостаз ткани нарушен, дозорные макрофаги и тучные клетки немедленно высвобождают растворимые медиаторы, такие как цитокины, хемокины, протеазы матричного ремоделирования и активные формы кислорода (АФК) и биоактивные медиаторы, такие как гистамин, которые вызывают мобилизацию и инфильтрацию дополнительных лейкоцитов в поврежденную ткань (процесс, который известен как воспаление). Макрофаги

и тучные клетки также могут активировать сосудистые и фибробластные ответы, чтобы предотвратить вторжение организмов и инициировать местное восстановление тканей. ДК, с другой стороны, принимают инородные антигены и мигрируют в лимфоидные органы, где они представляют свои антигены адаптивным иммунным клеткам. Поэтому они являются ключевыми элементами во взаимодействии между врожденным и адаптивным иммунитетом [De Visser et al., 2006].

NK-клетки также участвуют в клеточных перекрестных взаимодействиях между врожденными и адаптивными иммунными клетками через их способность двунаправленно взаимодействовать с ДК; некоторые субпопуляции NK-клеток устраняют незрелые ДК, тогда как другие способствуют созреванию ДК, что также может взаимно регулировать активацию NK-клеток [De Visser et al., 2006; Hamerman et al., 2005; Degli-Esposti, Smyth, 2005; Raulet, 2004].

Уникальная характеристика врожденных иммунных клеток – присущая им способность быстро реагировать при повреждении тканей происходит без памяти о предыдущих нападениях или антигенной специфичности – это определяющая особенность, которая отличает их от адаптивных иммунных клеток [De Visser et al., 2006].

Острая активация врожденного иммунитета запускает стадию активации более сложной адаптивной иммунной системы. Индукция эффективного первичного адаптивного иммунного ответа требует прямого взаимодействия со зрелыми антигенпрезентирующими клетками и провоспалительной средой. Адаптивные иммунные клетки, такие как В-лимфоциты, CD4 + хелперные Т-лимфоциты и CD8 + цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), отличается от врожденных лейкоцитов за счет экспрессии соматически генерируемых, разнообразных антигенспецифических рецепторов, которые образуются вследствие случайных генных перестановок и позволяют обеспечить более гибкий и широкий репертуар ответов, чем

врожденные иммунные клетки, которые экспрессируют закодированные зародышевой линией рецепторы [De Visser et al., 2006].

Так как отдельные В и Т лимфоциты являются коммитированными в отношении специфического уникального антигена, клональная экспансия при распознавании чужеродных антигенов необходима для получения достаточного числа антигенспецифических В и / или Т лимфоцитов для противодействия инфекции. Поэтому кинетика первичных адаптивных ответов медленнее, чем врожденных ответов. Тем не менее, во время первичных ответов подмножество лимфоцитов дифференцируются в долгоживущие клетки памяти, что приводит к большим ответам на последующие воздействие того же антигена [De Visser et al., 2006].

Вместе острая активация этих различных путей иммунного ответа эффективно удаляет или устраняет вторжение патогенов, поврежденных клеток и внеклеточного матрикса (ЕСМ). Кроме того, как только атакующие агенты устранены, иммунные клетки участвуют в нормализации клеточной пролиферации и путей клеточной гибели, чтобы обеспечить реэпителизацию и синтез нового внеклеточного матрикса. Как только заживление раны будет завершено, воспаление исчезает и гомеостаз тканей возвращается.

Из-за огромной пластичности, иммунные клетки проявляют множество эффекторных функций, которые постоянно тонко настроены, так как ткани окружающей среды изменяются.

Таким образом, иммунная система является неотъемлемой частью в поддержании гомеостаза ткани, а также участвует в патогенезе многих хронических заболеваний, таких как артрит, порок сердца, болезнь Альцгеймера и рак [De Visser et al., 2006; Finch, Crimmins, 2004].

### **1.3.2. Хроническое воспаление и развитие рака**

Когда гомеостаз тканей хронически нарушается, взаимодействие между врожденными и адаптивными иммунными клетками может быть нарушено. Также продолжительность и разрешение определяют особенности

хронического или острого воспаления, профили клеток, растворимые медиаторы, активируемые тканевые чувствительные пути двух состояний являются также определенными для каждого из путей. Деструктивные циклы, которые инициируются в тканях из-за неспособности надлежащим образом участвовать и / или отключить любую ветвь иммунной системы, могут привести к чрезмерному ремоделированию ткани, потере архитектуры ткани из-за разрушения структуры, изменения молекул белка и ДНК в связи с развитием окислительного стресса, а при некоторых обстоятельствах, к повышенному риску развития рака [De Visser et al., 2006].

Взаимодействие между иммунными клетками и раком было известно более века [Balkwill, Mantovani, 2001]. Первоначально считалось, что лейкоцитарные инфильтраты, в и вокруг развивающихся новообразований представляют собой попытку организма хозяина уничтожить опухолевые клетки. На самом деле, обширная инфильтрация НК-клеток в желудке человека или колоректальный рак связан с благоприятным прогнозом [Cosa et al., 1997; Ishigami et al., 2000]. С другой стороны, злокачественные ткани, которые содержат инфильтраты других типов клеток врожденной иммунной системы, таких как макрофаги при карциноме молочной железы человека и тучные клетки при аденокарциноме легкого человека и меланоме, как правило, связаны с неблагоприятным клиническим прогнозом [Ribatti et al., 2003; Imada et al., 2000; Leek et al., 1996; Leek et al., 1999]. Кроме того, на основе исследования населения показано, что люди, склонные к хроническим воспалительным заболеваниям имеют повышенный риск развития рака [Balkwill et al., 2005]. Кроме того, более чем при 15% онкологических заболеваний людей считается, что рак вызван инфекционными заболеваниями [Pagano et al., 2004], некоторые из которых, например, хроническая инфекция с *cag* + штаммами *Helicobacter pylori* или с вирусом гепатита – косвенно способствуют канцерогенезу через индукцию хронических воспалительных состояний [Finch, Crimmins, 2004].

Хотя казалось бы противоречивым, недавно сообщили, что кумулятивное использование антибиотиков связано с повышенным риском развития рака молочной железы [Velicer et al., 2004]. Свидетельствуют ли эти данные о том, что бактериальные инфекции защищают от рака молочной железы или что антибиотикотерапия вредна? Более вероятно, что люди, которым требуются частый прием антибиотиков подвержены большему риску развития рака, либо потому, что они поддерживают хронический низкий уровень воспаления как следствие дефектов механизмов их естественной иммунной защиты и / или потому что они не способны нормализовать их иммунный статус после заражения. Некоторая поддержка этой гипотезы исходит от экспериментальных моделей животных, в которых иммунная компетентность мыши, у которых отсутствуют ключевые медиаторы иммунной защиты хозяина, такие как  $\gamma$ -интерферон (IFN $\gamma$ ) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), спонтанно развивают различные типы рака в тканях, которые проявляется хроническое воспаление низкого уровня [Enzler et al., 2003].

Одним из прогнозов, которые можно сделать из этих популяционных и экспериментальных исследований, является то, что мутации или полиморфизмы в генах, которые кодируют иммунные модификаторы существуют у людей с хроническими воспалительными заболеваниями, для которых характерен повышенный риск развития рака. На самом деле, генетические полиморфизмы в генах, которые кодируют важные цитокины, протеазы и белки сигнальной трансдукции были определены как этиологические факторы в нескольких хронических воспалительных заболеваниях [Balkwill et al., 2005], что указывает на то, что терапевтические средства, направленные на нормализацию иммунного баланса, могут быть эффективными химиопрепаратами. Клинические исследования, в которых иммунный баланс был восстановлен у пациентов с активной болезнью Крона путем лечения с использованием GM-CSF указывают, что тяжесть заболевания

может быть уменьшена с использованием данного подхода [Korzenik et al., 2005].

Возможно, наиболее убедительные клинические доказательства наличия причинно-следственной связи между хроническим воспалением и развитием рака следуют из эпидемиологических исследований, сообщающих, что ингибирование хронического воспаления у пациентов с предраковыми заболеваниями или предрасположенных к развитию рака, имеют химиопрофилактический потенциал. Эти исследования показали, что долгосрочное использование противовоспалительных препаратов, таких как аспирин и селективные ингибиторы циклооксигеназы-2 (ЦОГ2), значительно снижает риск заболевания раком [Dannenberг, Subbaramaiah, 2003], указывая на то, что ЦОГ2 или другие ключевые молекулы, которые участвуют в биосинтезе простагландина, могут быть эффективными противораковыми мишенями.

Учитывая, что иммунная система предназначена для уничтожения «поврежденных» клеток или тканей, почему воспаление потенцирует развитие рака, а не защищает против него? Одно возможное объяснение, почему опухолевые клетки избегают механизмов иммунного надзора, заключается в том, что неопластические микроокружения благоприятствуют поляризованным хроническим про-опухолевым воспалительным состояниям, а не тем, которые представляют собой острые противоопухолевые иммунные ответы [Balkwill et al., 2005; Zou, 2005].

Клинические данные показывают, что «иммунный статус» здоровых людей отличаются от тех, в организме которых развиваются злокачественные опухоли; в последнем случае Т-лимфоциты являются функционально нарушенными [Finke et al., 1999]. Кроме того, накопление хронически активированных миелоидных супрессорных клеток и регуляторных Т-клеток обнаруживается в кровообращении, лимфоидных органах и опухолевых тканях [Curiel et al., 2004; Serafini et al., 2004]. Вместе иммунные состояния, подобные этим, могут отключить уничтожающие опухоль CD8 + ответы CTL

и позволят развиваться состоянию иммунной привилегии, которое будет способствовать избавлению от противоопухолевого иммунитета, одновременно используя активированные иммунные клетки, которые усиливают развитие рака [De Visser et al., 2006].

### **1.3.3. Адаптивный иммунитет, воспаление и рак**

Последние достижения в понимании основных механизмов хронических аутоиммунных заболеваний выявили, что адаптивный иммунитет играет решающую роль в регулировании и активации врожденных иммунных клеток в пораженных тканях [Ноебе et al., 2004].

Например, отложение интерстициального иммуноглобулина (Ig) наблюдается в тканях, которые сильно инфильтрированы врожденными иммунными клетками у пациентов с ревматоидным артритом [Firestein, 2003]. Истощение В-лимфоцитов у этих пациентов уменьшает тяжесть заболевания, как и при хронической идиопатической тромбоцитопении, аутоиммунной гемолитической анемии и системной красной волчанке. Это указывает на то, что отложение иммуноглобулина способствует хроническому воспалению и патогенезу заболевания, а не просто соотносится с этим.

Антитела, которые депонируются в интерстициальных тканях могут инициировать активацию врожденных иммунных клеток путем сшивания Fc-рецепторов или активации каскадов комплемента [Ноебе et al., 2004]. Как CD4+, так и CD8+ Т-лимфоциты являются важными модуляторами таких повреждающих тканей ответов В-лимфоцитов, и так как отложение Ig обнаруживается в пред-опухолевых или опухолевых тканях у человека, возможно что несбалансированные или измененные адаптивно-иммунные клеточные взаимодействия представляют собой основные механизмы, которые регулируют начало и / или поддержание хронического воспаления, которое связано с развитием рака.

Чтобы рассмотреть эту возможность, была оценена роль адаптивных иммунных клеток мышей HPV16 и было обнаружено, что совместный

дефицит В- и Т-лимфоцитов ослаблял инфильтрацию пред-опухоловой кожи клетками врожденной иммунной системы [de Visser et al., 2005].

Как следствие, сосудистая сеть крови оставалась спокойной, кератиноциты не могли достичь гиперпролиферативного фенотипа и общая заболеваемость инвазивными карциномами снижалась до ~ 6%, по сравнению с ~ 50% в контрольной группе [de Visser et al., 2005]. Перенос В-лимфоцитов или сыворотки от мышей HPV16 мышам HPV16 с дефицитом В- и Т-клеток восстанавливал характерное хроническое воспаление в пред-злокачественной коже, ангиогенез и гиперпролиферацию кератиноцитов, которые являются параметрами, необходимыми для полной злокачественности [de Visser et al., 2005].

Эти данные указывают на то, что В-лимфоциты и факторы, которые присутствуют в сыворотке, необходимы для формирования хронического воспалительного состояния, связанного с предзлокачественным прогрессированием, и поэтому участвуют в усилении опухолевых путей, которые необходимы для развития рака кожи. В-лимфоциты значительно не проникают в предзлокачественную кожу мышей HPV16, что указывает на то, что примирование В-лимфоцитов происходит в дренирующих лимфатических узлах антиген-презентирующими ДК кожного происхождения. Пока не ясно, какие сигналы индуцируют доставку ДК в дренирующие лимфатические узлы. Преобладающая модель миграции ДК из воспаленной ткани в лимфатические узлы включает экспрессию хемокинов (С-С мотив) рецептор 7 (CCR7) и специфических интегринов ДК и существование хемотаксического градиента от периферии к лимфатическим сосудам [Randolph et al., 2005]. Однако, участвуют ли эти пути при прогрессировании рака до сих пор остается неизвестным. Кроме того, это еще предстоит исследовать какие антигены, происходящие из кожи, запускают ответы В-лимфоцитов, которые приводят к развитию опухоли. Также неизвестно, являются ли они антигенами, которые происходят из ранней области генов или антигенов HPV16, полученных из стромальных молекул, подвергающихся ремоделированию в

предзлокачественной коже. Эти результаты демонстрируют уникальную особенность канцерогенеза кожи при у HPV16 мышей, или другие экспериментальные модели или клинические данные подтвердят ключевую роль В-лимфоцитов во время развития рака эпителия?

Потенциальная роль В-лимфоцитов и / или антител в развитии опухолей для была описана более 50 лет назад, хотя и без объяснения каких-либо основных механизмов. Эти ранние исследования продемонстрировали, что пассивный перенос опухолеспецифических антител увеличивал рост трансплантированных опухолевых клеток и химически индуцированных опухолей [Snell, 1957; Kaliss, 1958; Ran, Witz, 1972, Agassy-Cahalon et al., 1988], в то время как отсутствие В-лимфоцитов ограничивало образование опухоли [Brodth, Gordon, 1982; Monach et al., 1993].

На клинической арене существует обширная литература, которая описывает возникновение аутоантител в сыворотке крови онкологических больных и отложение интерстициальных антител в опухоли человека [Tommer et al., 1998]. Кроме того, раннее присутствие аутоантител (в частности, антиядерных и гладкомышечных антител) в сыворотке крови коррелирует с неблагоприятным прогнозом [Tan, Shi, 2003]. Указывает ли это соотношение на то, что люди с опухолями, которые прогрессируют, имеют более высокую антигенную нагрузку и, следовательно, запускают большую выработку антител, или это указывает на то, что присутствие антител предрасполагают пациентов к развитию более прогрессирующих или рецидивирующих раковых заболеваний? Хотя ответ не вполне ясен, эти данные указывают на то, что В-лимфоциты также участвуют в развитии рака человека и, следовательно, требуют более механистической оценки их роли и специфичности, чтобы определить, представляют ли они мишени для противоопухолевой терапии.

#### **1.4. Нарушение функционирования иммунной системы при лимфоме**

Основной аргумент, выдвигаемый в пользу инфекционной природы лимфомы Ходжкина, базируется на эпидемиологическом анализе частоты

заболеваемости в разных регионах. В группу повышенного риска включают однояйцевых близнецов в случае заболевания одного из них, ближайших родственников больных и лиц, перенесших инфекционный мононуклеоз. Инфекция в раннем детстве может привести к иммунизации без проявления признаков заболевания, в более поздние сроки - к развитию лимфомы Ходжкина. О значении генетических факторов в этиологии заболевания можно судить на основании частоты выявления определенных HLA-антигенов, в первую очередь у идентичных близнецов.

Другая теория базируется на вирусном поражении Т-лимфоцитов. Повышение спонтанной трансформации и появление гипербазофильных клеток в периферической крови могут служить признаком иммунной защиты сенсibilизированных лимфоцитов от генетически чужеродных, пораженных вирусом клеток. Аналогичным образом можно объяснить цитотоксическое действие лимфоцитов, полученных от пациентов с болезнью Ходжкина, на культивируемые клетки Березовского-Рид-Штернберга и сходную топографию этих клеток и лимфоцитов в организме. Циркулирующие иммунные комплексы с помощью антител адсорбируются преимущественно на этих клетках. Таким образом, феномен злокачественной трансформации фагоцитарной системы находится в центре внимания исследователей, однако вопрос о природе Т-клеточных нарушений остается открытым. Супрессорный эффект приписывают злокачественно трансформированным макрофагам.

Происхождение клетки Березовского-Рид-Штернберга окончательно не установлено. Вероятнее всего, эта клетка происходит из Т- и В-лимфоцитов. Некоторые авторы указывали, что злокачественные клетки при лимфогранулематозе могут происходить из моноцитарно-гистиоцитарно-макрофагального клона. При лимфоме Ходжкина нарушается структура лимфатических узлов; соединительнотканые тяжи, разрастаясь непосредственно от капсулы, пронизывают ткань лимфатического узла, превращая его в гранулему. Клеточный состав представлен В-лимфоцитами на разных стадиях созревания, Т-лимфоцитами с фенотипом Т-хелперов и Т-

супрессоров. При лимфоме Ходжкина особое диагностическое значение приобретает обнаружение одноядерных клеток Ходжкина, являющихся промежуточным звеном при трансформации в многоядерные клетки Березовского-Рид-Штернберга.

Понимание нормальной дифференцировки лимфоцитов позволит лучше разобраться в морфологии, иммунофенотипе и клиническом течении лимфом. Известно, что лимфоциты дифференцируются из незрелых стволовых клеток в костном мозге. На стадии реарранжировки генов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов лимфобласты (В-клетки большого размера) активно пролиферируют до превращения их в В-лимфоциты (зрелые эффекторные клетки костного мозга). В дальнейшем созревание происходит в лимфатических узлах и экстралимфатических фолликулах. В герминальном центре лимфатических узлов под влиянием антигенов лимфоциты преобразуются в иммунобласты или центробласты (крупные пролиферирующие клетки). В это время в переменных регионах иммуноглобулиновых генов появляются множественные точечные мутации, что обеспечивает их антигенную специфичность. Формирование герминального центра и образование плазматических клеток, продуцирующих IgG, происходят за счет centroцитов (малых непролиферирующих лимфоцитов). Некоторые из них мигрируют и образуют маргинальные зоны, окружающие активированные фолликулы; там они остаются в качестве В-клеток памяти.

Клетки, дифференцирующиеся в Т-лимфоциты, подразделяются на 3 типа антигенспецифических эффекторных Т-клеток: CD4 (хелперы и цитотоксические Т-клетки), CD8 (супрессоры и цитотоксические Т-клетки) и Т-клетки памяти. От генетических изменений, происходящих в клетке, зависят дифференцировка и созревание. CD (Cluster of differentiation antigens) представляют собой антигены поверхностных рецепторов, вовлеченных в дифференцировку; обнаруживаются они с помощью специфических антител. Для Т- и В-лимфоцитов антигены различны и изменяются в процессе

дифференцировки. CD выполняют несколько функций в созревании лимфоцитов, в том числе узнавание и адгезию с другими генами и молекулами. Т-клеточные CD-антигены включают: CD3, взаимодействующие с Т-рецепторами и участвующие в передаче сигналов, CD4, связывающиеся с молекулами МНС класса II, CD5, CD8, узнающие молекулы МНС класса I, и CD45. В-клеточные CD: включают CD19 и CD20, вовлеченные в сигнальную трансдукцию. Для лимфобластов характерна экспрессия концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазы и поверхностного антигена CD34, но они не обладают антигенами В- и Т-клеток. Зрелые плазматические клетки теряют В-клеточные антигены и приобретают антиген CD38.

Таким образом, в процессе созревания лимфоциты проходят сложный путь дифференцировки, который обеспечивает выполнение присущих им функций в иммунной системе организма. При нарушении такого хода событий возникают злокачественные новообразования лимфоидной природы.

В основе злокачественной трансформации клеток лежат такие явления, как нарушение механизмов регуляции функционирования генов и стабильности генома. Определенную роль в развитии НХЛ играют дефекты реакций иммунитета, такие, как дисбаланс выработки цитокинов, а также генетические нарушения реарранжировки иммуноглобулинов Т-клеточных рецепторов.

## Глава 2. Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на базе клинико-диагностической лаборатории Белгородского областного государственного бюджетного учреждения здравоохранения Белгородский онкологический диспансер в 2017-2019 годах. Проведено изучение показателей периферической крови 15 мужчин, 7 женщин больных злокачественными опухолями иммунной системы, проживающих на территории г. Белгорода и Белгородской области.

Больным была назначена полихимиотерапия с применением противоопухолевых антибиотиков (доксорубицин, блеомицин), препаратов, характеризующихся иммунодепрессивным, цитостатическим, противоопухолевым действием (циклофосфамид, дакарбазин, ритуксимаб, винкристин), противовоспалительным действием (преднизолон).

Препарат вводили внутривенно в терапевтической дозе, в соответствии с индивидуальными особенностями пациентов.

При первичном поступлении и через 7 дней после полихимиотерапии у пациентов брали кровь для проведения общего и биохимического анализов крови. Венозную кровь получали из локтевой вены путем венепункции в асептических условиях натошак. Забор крови осуществлялся в утренние часы.

Подготавливали пробирки. Накладывали жгут. Брали иглу левой рукой за цветной колпачок, правой рукой снимали короткий защитный колпачок (серого цвета) с резиновой мембраны. Вставляли освободившийся конец иглы с резиновой мембраной в держатель и завинчивали до упора. Снимали цветной защитный колпачок с иглы. Вводили иглу в вену, как это делается при обычной процедуре взятия крови шприцем. Вставляли выбранную пробирку крышкой в держатель до упора. При этом игла прокалывала резиновую мембрану в крышке пробирки – образовывался канал между пробиркой с вакуумом и полостью вены. Кровь проходила в пробирку до тех пор, пока не компенсировался созданный в пробирке вакуум. Жгут снимали, как только кровь начинала поступать в пробирку. Если кровь не шла – это могло означать,

что игла прошла вену насквозь – в этом случае необходимо было немного вытянуть иглу (но не вынимать), пока кровь не начинала поступать в пробирку. В случае, если кровь переставала течь в пробирку, иглу необходимо было перемещать в направлении вперед-назад – обычно это улучшает ток крови. Затем иглу необходимо было повернуть наполовину оборота, а жгут, если он был затянут очень туго, ослабить. Если ни одно из перечисленных действий не помогало, то иглу требовалось вынуть и искать другое место венепункции. Пробирка должна быть заполнена полностью. После заполнения пробирки следовало извлечь ее из держателя. Резиновая мембрана возвращалась в исходное положение, перекрывая ток крови по игле. При необходимости в держатель вставлялся ряд других пробирок для получения нужного объема крови для различных исследований. Повторно вводить иглу для этого не следовало.

Для исследования гематологических показателей системы крови использовали вакуумные пробирки, на внутренние стенки которых нанесена сухая ЭДТА-К2 или микрокапли раствора ЭДТА-К3 в концентрации 1,2-2,0 мг сухого реагента на 1 мл крови. ЭДТА предотвращает свертывание крови путем блокирования ионов кальция. Сразу после взятия крови пробирки 8-12 раз переворачивали на 180°С для полного смешения крови с реагентами и исключения ошибок преаналитического этапа. Перемешивание необходимо проводить осторожно во избежание гемолиза. Нельзя встряхивать пробирку.

Общий клинический анализ крови проводили с помощью гематологического анализатора COULTER LH 750 (Beckman Coulter, США) (рис. 1).



Рис. 1. Гематологический анализатор COULTER LH 750 (Beckman Coulter, США).

Для биохимического исследования забор крови осуществлялся в пробирки, внутренние стенки которых покрыты сухим активатором свертывания (SiO – оксид кремния) для ускорения образования сгустка крови. Время свертывания 20-30 мин. После взятия крови пробирки ставили в центрифугу Heraeus Labofuge 300 (Германия) и откручивали в течение 10 минут при 1500 об./мин, затем сыворотку отбирали в микрокуветы и использовали для исследования.

Исследование биохимических показателей проводили с помощью биохимической системы Beckman Coulter AU480 (Beckman Coulter, США) (рис. 2).



Рис. 2. Биохимическая система Beckman Coulter AU480 (Beckman Coulter, США).

### 2.1. Общий анализ крови

Общий анализ крови включает в себя следующие данные: количество лейкоцитов; лейкоцитарная формула; количество эритроцитов; содержание гемоглобина; гематокрит; средний объем эритроцита; среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците; средняя концентрация гемоглобина в эритроците; ширина распределения эритроцитов в %; количество тромбоцитов; средний объем тромбоцитов; тромбокрит; относительная ширина распределения тромбоцитов по объему. В таблице 1 представлены основные показатели, которые могут быть зарегистрированы с помощью гематологического анализатора COULTER LH 750 (Beckman Coulter, США), указаны пределы нормальных значений, установленные в приборе.

Таблица 1

Пороговые значения показателей, установленные в приборе  
гематологический анализатор COULTER LH 750  
(Beckman Coulter, США)

Показатель, единица измерения	Нижний предел значения нормы	Верхний предел значения нормы
WBC, 10 <sup>9</sup> /л	3,60	10,20
NE, %	43,50	73,50
LY, %	15,20	43,30
MO, %	5,50	13,70
EO, %	0,80	8,10
BA, %	0,20	1,50
NE #, 10 <sup>9</sup> /л	1,70	7,60
LY #, 10 <sup>9</sup> /л	1,00	3,20
MO #, 10 <sup>9</sup> /л	0,30	1,10
EO #, 10 <sup>9</sup> /л	0,00	0,50
BA #, 10 <sup>9</sup> /л	0,00	0,10
RBC, 10 <sup>12</sup> /л	4,060	5,630
HGB, г/л	125,000	163,000
HCT, л/л	0,3670	0,4710
MCV, fL	73,000	96,200
MCH, pg	23,800	33,400
MCHC, г/л	325,000	363,000
RDW, %	12,100	16,200
PLT, 10 <sup>9</sup> /л	152,00	348,00
MPV, fL	7,40	11,40

## 2.2. Биохимический анализ крови

В таблице 2 представлены основные показатели биохимического анализа крови, которые могут быть получены с помощью биохимической

системы Beckman Coulter AU480 (Beckman Coulter, США), указаны пределы нормальных значений, установленные в приборе.

Таблица 2

Пороговые значения показателей, установленные в биохимической системе Beckman Coulter AU480 (Beckman Coulter, США)

<b>Показатель, единица измерения</b>	<b>Нижний предел значения нормы</b>	<b>Верхний предел значения нормы</b>
TP, г/л	65,00	85,00
ALB, г/л	35,00	50,00
ALT, Ед./л	0,00	45,00
AST, Ед./л	0,00	35,00
GGT, Ед./л	0,00	55,00
ALP, Ед./л	30,00	120,00
GLUC, ммоль/л	4,10	5,90
TBIL, $\mu\text{mol/l}$	1,70	20,00
CHOL, ммоль/л	0,00	5,30
UREA, ммоль/л	1,70	8,30
CREA, $\mu\text{mol/l}$	44,00	110,00
UA, $\mu\text{mol/l}$	155,00	418,00
CA, ммоль/л	2,20	2,65
Cl, ммоль/л	90,00	115,00
K, ммоль/л	3,50	5,10
Na, ммоль/л	136,00	149,00

Биохимический анализ крови включает в себя следующие данные: общий белок; альбумин; аланиновая трансаминаза; аспартатная трансаминаза; лактатдегидрогеназа;  $\gamma$ -глутамилтранспептидаза; щелочная фосфатаза;

креатинкиназа; креатинкиназа-МВ; глюкоза; общий билирубин; прямой билирубин; холестерин (холестерол); триглицериды; липопротеины низкой плотности; мочеви́на; креатинин; мочева́я кислота; железо; кальций общий; фосфор (неорганический); хлориды; калий; магний; миоглобин; альфа амилаза; кальций ионизированный.

Статистический анализ выполнялся с помощью компьютерных программ вариационной статистики (Статистика 6.0). Полученные данные обрабатывали с использованием непараметрического парного критерия Вилкоксона. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### Глава 3. Полученные результаты и их обсуждение

Исследование показателей крови выполнено у людей с системными злокачественными опухолями иммунной системы при участии 15 мужчин, 7 женщин. В таблицах 3, 4 представлена характеристика возрастных особенностей исследуемой группы лиц.

Таблица 3

Показатели, характеризующие возраст мужчин, больных злокачественными опухолями иммунной системы

N	M, лет	Min, лет	Max, лет	m
15	60,4	46	79	

Примечание: N – количество пациентов; M – среднее значение (в годах); Min – минимальное значение (в годах); Max – максимальное значение (в годах); m – стандартная ошибка среднего.

Таблица 4

Показатели, характеризующие возраст женщин, больных злокачественными опухолями иммунной системы

N	M, лет	Min, лет	Max, лет	m
7	68,0	51	78	

Примечание: N – количество пациентов; M – среднее значение (в годах); Min – минимальное значение (в годах); Max – максимальное значение (в годах); m – стандартная ошибка среднего.

Больным была назначена полихимиотерапия с применением противоопухолевых антибиотиков (доксорубицин, блеомицин), препаратов, характеризующихся иммунодепрессивным, цитостатическим, противоопухолевым действием (циклофосфамид, дакарбазин, ритуксимаб, винкристин), противовоспалительным действием (преднизолон).

### 3.1. Показатели общего анализа крови

#### 3.1.1. Показатели общего анализа крови мужчин, больных злокачественными опухолями иммунной системы

В таблице 5 представлены показатели красной крови мужчин, больных злокачественными опухолями иммунной системы, до и после полихимиотерапии, полученные в ходе общего анализа крови.

Таблица 5

Результаты общего анализа крови мужчин. Показатели красной крови больных до и после полихимиотерапии ( $M \pm m$ )

	Показатели при поступлении	Показатели после курса ПХТ	Референсные значения	
			min	max
<b>RBC, <math>10^{12}/L</math></b>	4,211	4,077	4,06	5,63
<b>HGB, g/L</b>	128,31	123,66	125	163
<b>HCT, L/L</b>	0,389	0,379	0,367	0,471
<b>MCV, fL</b>	92,548	92,844	73	96,2
<b>MCH, pg</b>	30,52	30,285	23,8	33,4
<b>MCHC, g/L</b>	329,75	326,27	325	363
<b>RDW, %</b>	17,068	16,887	12,1	16,2
<b>RDW-SD, fL</b>	46,6	51,775	12,1	45,9

Примечание: RBC,  $10^{12}/л$  – эритроциты; RDW, % – коэффициент вариации объема эритроцитов; RDW-SD, фл – относительная ширина распределения эритроцитов по объёму; HCT, % – гематокрит; HGB, г/л – гемоглобин; MCH, пг – среднее содержание гемоглобина в эритроците; MCHC, г/л – средняя концентрация гемоглобина в эритроците; MCV, фл – средний объем эритроцитов

Действие химиотерапевтических препаратов характеризуется снижением содержания эритроцитов и гемоглобина, на 3,2% и 3,6% соответственно. Выявлено незначительное снижение средней концентрации гемоглобина в эритроците после лечения (на 1 %) (таблица 5).

Коэффициент вариации объема эритроцитов выходит за пределы референсных значений. Показатель RDW является количественной мерой анизцитоза, иллюстрирует вариабельность размеров циркулирующих эритроцитов. По данным многих исследователей, в ряде случаев железодефицитной анемии коэффициент анизотропии эритроцитов (RDW) становится выше нормы несколько раньше, чем изменяются остальные параметры (MCV и гемоглобин). Предлагается изолированное повышение RDW расценивать в качестве раннего прогностического признака развития дефицита железа [Karagöz, Tanoglu, 2013]. В последнее время было показано, что RDW значимо связан со смертностью и другими неблагоприятными последствиями в ходе развития различных клинических состояний, в том числе хронических и острых заболеваний, таких как хроническая и острая сердечная недостаточность, острая одышка, острый панкреатит, тяжелый сепсис и септический шок, травма, острая тромбоэмболия легочной артерии и даже среди пожилых людей [Hong et al., 2012; Senol et al., 2013; Kim et al., 2013; Majercik et al., 2013; Sen et al., 2014; Felker et al., 2007]. Кроме того, изменение RDW зависит от многих факторов, таких как анемия, почечная дисфункция или дисфункция печени, заболевания щитовидной железы, переливание крови, острое или хроническое воспаление, нейрогуморальная активация, недостаточное питание (например, недостаток железа, витамина В12 и фолиевой кислоты), этническая принадлежность, депрессия костного мозга, а также использование некоторых лекарств (например, эритропоэтина, антибиотиков) [Karagöz, Tanoglu, 2013; Kim et al., 2013; Jiang et al., 2014].

В таблице 6 представлены данные, характеризующие лейкоцитарную формулу мужчин, больных злокачественными опухолями иммунной системы, до и после полихимиотерапии. Выявлено снижение содержания лейкоцитов в

крови после лечения на 29,8%, при этом изменения качественного состава различных пулов лейкоцитов незначительны (таблица 6).

Таблица 6

Результаты общего анализа крови мужчин. Лейкоцитарная формула больных до и после полихимиотерапии ( $M \pm m$ )

	Показатели при поступлении	Показатели после курса ПХТ	Референсные значения	
			min	max
<b>WBC, 10<sup>9</sup>/L</b>	8,491	5,958	3,6	10,2
<b>NE, %</b>	61,567	62,743	43,5	73,5
<b>LY, %</b>	24,306	24,412	15,2	43,3
<b>MO, %</b>	12,006	10,704	5,5	13,7
<b>EO, %</b>	1,586	1,525	0,8	8,1
<b>BA, %</b>	0,535	0,616	0,2	1,5

Примечание: WBC, 10<sup>9</sup>/л – лейкоциты; NE, % – относительное (процентное) содержание нейтрофилов; LY, % – относительное (процентное) содержание лимфоцитов; MO, % – относительное (процентное) содержание моноцитов; EO, % – относительное (процентное) содержание эозинофилов; BA, % – относительное (процентное) содержание базофилов.

В таблице 7 представлено абсолютное содержание отдельных видов лейкоцитов в крови мужчин, больных злокачественными опухолями иммунной системы, до и после полихимиотерапии. Установлено, что в результате терапии отмечается снижение содержания в крови нейтрофилов на 26,0%, лимфоцитов – на 33,8%, моноцитов – на 46,4%, эозинофилов – на 18,7%, базофилов – на 8% (таблица 7). В таблице 8 представлены результаты, полученные при анализе тромбоцитарного звена гемограммы мужчин,

больных злокачественными опухолями иммунной системы, до и после полихимиотерапии.

Таблица 7

Результаты общего анализа крови мужчин. Абсолютное содержание различных пулов лейкоцитов в крови больных до и после полихимиотерапии (M ± m)

	Показатели при поступлении	Показатели после курса ПХТ	Референсные значения	
			min	max
<b>NE#, 10<sup>9</sup>/л</b>	5,394	3,992	1,7	7,6
<b>LY#, 10<sup>9</sup>/л</b>	1,905	1,261	1	3,2
<b>MO#, 10<sup>9</sup>/л</b>	1,071	0,574	0,3	1,1
<b>EO#, 10<sup>9</sup>/л</b>	0,096	0,078	0	0,5
<b>BA#, 10<sup>9</sup>/л</b>	0,025	0,023	0	0,1

Примечание: NE# – абсолютное содержание нейтрофилов; LY# – абсолютное содержание лимфоцитов; MO# – абсолютное содержание моноцитов; EO# – абсолютное содержание эозинофилов; BA# – абсолютное содержание базофилов.

Таблица 8

Результаты общего анализа крови мужчин. Показатели тромбоцитарного звена гемограммы больных до и после полихимиотерапии (M ± m)

	Показатели при поступлении	Показатели после курса ПХТ	Референсные значения	
			min	max
<b>PLT, 10<sup>9</sup>/л</b>	229,89	219,12	152	348
<b>MPV, фл</b>	8,678	8,652	7,4	11,4

Примечание: PLT (platelet) – число тромбоцитов; MPV (Mean Platelet Volume) – средний объем тромбоцитов, выражается в фемтолитрах (фл) или мкм<sup>3</sup>.

Выявлено, что терапия сопровождается снижением числа тромбоцитов на 4,7% (таблица 8).

### 3.1.2. Показатели общего анализа крови женщин, больных злокачественными опухолями иммунной системы

В таблице 9 представлены результаты исследования показателей красной крови женщин, больных злокачественными опухолями иммунной системы, до и после полихимиотерапии.

Таблица 9

Результаты общего анализа крови женщин. Показатели красной крови больных до и после полихимиотерапии ( $M \pm m$ )

	Показатели при поступлении	Показатели после курса ПХТ	Референсные значения	
			min	max
<b>RBC, 10<sup>12</sup>/л</b>	4,71	4,15	4,06	5,63
<b>HGB, г/л</b>	125,1	113,3	125	163
<b>HCT, л/л</b>	0,398	0,356	0,367	0,471
<b>MCV, фл</b>	86,59	85,43	73	96,2
<b>MCH, пг</b>	27,09	27,13	23,8	33,4
<b>MCHC, г/л</b>	313,93	317,2	325	363
<b>RDW, %</b>	14,70	14,81	12,1	16,2
<b>RDW-SD, фл</b>	43,3	43,55	12,1	45,9

Примечание: RBC, 10<sup>12</sup> /л – эритроциты; RDW, % – коэффициент вариации объема эритроцитов; RDW-SD, фл – относительная ширина распределения эритроцитов по объёму; HCT, % – гематокрит; HGB, г/л – гемоглобин; MCH, пг – среднее содержание гемоглобина в эритроците; MCHC, г/л – средняя концентрация гемоглобина в эритроците; MCV, фл – средний объем эритроцитов.

Выявлено, что полихимиотерапия сопровождается снижением содержания эритроцитов в крови на 11,9%, а также снижением содержания гемоглобина в крови на 9,4%, гематокрита на 10,5%. При этом содержание гемоглобина и гематокрит выходит за нижний предел референсного значения. Известно, что анемия высоко распространена у больных с различными типами рака, особенно при проведении химиотерапии. При этом снижение содержания гемоглобина в крови сопровождается слабостью, уменьшением толерантности к физической и умственной нагрузкам с закономерным ухудшением качества жизни. Кроме того, анемия связана с ухудшением показателей выживаемости онкологических больных [Птушкин, 2013]. Анемия на фоне онкологических заболеваний может быть обусловлена нарушением метаболизма железа, угнетением эритроидного ростка в костном мозге, продукцией цитокинов (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), обладающих негативным влиянием на различные этапы продукции эритроцитов в костном мозге, длительность их жизни и обмен железа [Птушкин, 2013; Снеговой и др., 2016]. Известно, что патологические процессы, сопровождающиеся хронической активацией иммунной системы, например, опухоль, может сопровождаться вторичным повышением концентрации гепсидина. Этот полипептид, циркулирующий в плазме и выделяющийся почками, служит негативным регулятором поступления железа из клеток (макрофаги, клетки эпителия кишечника) во внеклеточное пространство и плазму, в результате чего отмечается недостаточное поступление железа в костный мозг, несмотря на его существенные запасы в организме [Птушкин, 2013].

Известно, что частота анемии зависит от режима химиотерапии: интервала и применения препаратов платины, гемцитабина, кабацитаксела, доцетаксела, энзалутамида. Миелосупрессивный эффект при использовании цитостатических препаратов усиливается с каждым последующим курсом химиотерапии [Снеговой и др., 2016].

Установлено незначительное снижение среднего объема эритроцитов после курса полихимиотерапии (на 1,3%), которое сопровождается некоторым

повышением средней концентрации гемоглобина в эритроците (на 1,0%) (таблица 5).

В таблице 10 представлено содержание лейкоцитов и лейкоцитарная формула женщин, больных злокачественными опухолями иммунной системы, до и после полихимиотерапии.

Таблица 10

Результаты общего анализа крови женщин. Лейкоцитарная формула больных до и после полихимиотерапии ( $M \pm m$ )

	Показатели при поступлении	Показатели после курса ПХТ	Референсные значения	
			min	max
<b>WBC, 10<sup>9</sup>/л</b>	9,59	9,97	3,6	10,2
<b>NE, %</b>	66,78	74,35	43,5	73,5
<b>LY, %</b>	16,69	17,07	15,2	43,3
<b>MO, %</b>	11,63	7,73	5,5	13,7
<b>EO, %</b>	3,76	0,27	0,8	8,1
<b>BA, %</b>	1,07	0,58	0,2	1,5

Примечание: WBC, 10<sup>9</sup>/л – лейкоциты; NE, % – относительное (процентное) содержание нейтрофилов; LY, % – относительное (процентное) содержание лимфоцитов; MO, % – относительное (процентное) содержание моноцитов; EO, % – относительное (процентное) содержание эозинофилов; BA, % – относительное (процентное) содержание базофилов.

Выявлено повышение содержания лейкоцитов в крови после курса полихимиотерапии на 3,9%, сопровождавшееся увеличением относительного содержания нейтрофилов, лимфоцитов на фоне снижения относительного содержания моноцитов, эозинофилов и базофилов (таблица 10).

В таблице 11 представлено абсолютное содержание различных пулов лейкоцитов в крови женщин, больных злокачественными опухолями иммунной системы, до и после полихимиотерапии. Выявлено повышение содержания нейтрофилов на 4,2%, лимфоцитов – на 37,9% после курса полихимиотерапии. Тогда как содержание эозинофилов после приема препаратов снизилось на 88% (таблица 11).

Таблица 11

Результаты общего анализа крови женщин. Лейкоцитарная формула больных до и после полихимиотерапии ( $M \pm m$ )

	Показатели при поступлении	Показатели после курса ПХТ	Референсные значения	
			min	max
<b>NE#</b>	6,9	7,19	1,7	7,6
<b>LY#</b>	1,45	2	1	3,2
<b>MO#</b>	0,96	0,97	0,3	1,1
<b>EO#</b>	0,25	0,03	0	0,5
<b>BA#</b>	0,07	0,07	0	0,1

Примечание: NE# – абсолютное содержание нейтрофилов; LY# – абсолютное содержание лимфоцитов; MO# – абсолютное содержание моноцитов; EO# – абсолютное содержание эозинофилов; BA# – абсолютное содержание базофилов.

В таблице 12 представлены показатели, характеризующие тромбоцитарное звено гемограммы женщин, больных злокачественными опухолями иммунной системы, до и после полихимиотерапии. Установлено, что в результате химиотерапевтического лечения происходило снижение числа тромбоцитов на 10,9% (таблица 12) и незначительное уменьшение среднего объема тромбоцитов (на 1,5%).

Результаты общего анализа крови женщин. Показатели тромбоцитарного звена гемограммы больных до и после полихимиотерапии ( $M \pm m$ )

	Показатели при поступлении	Показатели после курса ПХТ	Референсные значения	
			min	max
<b>PLT, 10<sup>9</sup>/л</b>	273,63	243,8	152	348
<b>MPV, fL</b>	9,29	9,15	7,4	11,4

Примечание: PLT (platelet) – количество тромбоцитов; MPV (Mean Platelet Volume) – средний объем тромбоцитов, выражается в фемтолитрах (фл) или  $\text{мкм}^3$ .

### **3.2. Показатели биохимического анализа крови**

#### **3.2.1. Показатели биохимического анализа крови мужчин, больных злокачественными опухолями иммунной системы**

В таблице 13 представлены данные, иллюстрирующие содержание белков и ферментов в сыворотке крови мужчин, больных злокачественными опухолями иммунной системы, до и после полихимиотерапии, полученные в ходе биохимического анализа крови.

В результате полихимиотерапии у больных отмечалось снижение общего белка в сыворотке крови (на 2,5 %). При этом значение опускалось ниже границ нормы (таблица 13).

Под влиянием химиотерапевтических препаратов отмечалось изменение содержания ферментов в плазме крови. Повышалось содержание альфа-амилазы на 52,6%, аланинаминотрансферазы на 21,5% (таблица 13). Ли и соавторами (2018) сообщается о повышении содержания альфа-амилазы после химиотерапии. Повышение содержания аланинаминотрансферазы у онкологических больных после курса полихимиотерапии зарегистрировано в ходе исследований, выполненных Anber Z.N.H. (2018).

Результаты биохимического анализа крови. Белки и ферменты плазмы крови больных до и после полихимиотерапии ( $M \pm m$ )

	Показатели при поступлении	Показатели после курса ПХТ	Референсные значения	
			min	max
<b>TP, g/L</b>	65,23	63,57	66	87
<b>ALB, g/L</b>	38	38,275	35	50
<b>AMYL, U/L</b>	50,42	76,94	28	100
<b>ALT, U/L</b>	33,37	40,56	0	45
<b>AST, U/L</b>	31,38	30,59	0	35
<b>LDH</b>	268,1	262,13	0	248
<b>GGT, U/L</b>	54,175	43,03	0	55
<b>ALP, U/L</b>	77,8	69,04	30	120

Примечание: Общий белок (TP, г/л), альбумин (ALB, г/л), альфа-амилаза (AMYL, Ед./л), аланинаминотрансфераза (ALT, Ед./л), аспаратаминотрансфераза (AST, Ед./л), лактатдегидрогеназа (LDH, Ед./л), гамма-глутамилтранспептидаза (GGT, Ед./л), щелочная фосфатаза (ALP, Ед./л).

Снижалось содержание аспаратаминотрансферазы на 2,5%, лактатдегидрогеназы на 2,2%, глутамилтранспептидазы на 20,6% и щелочной фосфатазы на 11,3% (таблица 13).

Гамма-глутамил транспептидаза (ГГТ) является энзимом, в основном, вовлеченным в поддержание гомеостаза глутатиона в клетке [Wang et al., 2017]\_ который защищает клетку от активных форм кислорода [Schwameis et al., 2016]. В ряде исследований показано, что содержание ГГТ в плазме коррелирует с риском развития рака [Grimm et al., 2013; Schwameis et al., 2016].

В таблице 14 представлены показатели, характеризующие обмен углеводов, аминокислот, липидов, билирубина, мужчин, больных злокачественными опухолями иммунной системы, до и после полихимиотерапии.

Выявлено повышение содержания глюкозы на 6,9%, общего билирубина – на 8,1%, мочевины – на 9,7%, креатинина – на 3,9% (таблица 14).

Таблица 14

Результаты биохимического анализа крови. Показатели обмена углеводов, аминокислот, липидов, билирубинового обмена больных до и после полихимиотерапии ( $M \pm m$ )

	Показатели при поступлении	Показатели после курса ПХТ	Референсные значения	
			min	max
<b>GLUC, mmol/l</b>	6,08	6,5	4,1	5,9
<b>TBIL, mkmol/l</b>	10,62	11,48	1,7	20
<b>CHOL, mmol/l</b>	5,4	5,5	0	5,3
<b>UREA, mmol/l</b>	9,66	10,6	1,7	8,3
<b>CREA, mkmol/l</b>	116,98	121,6	44	110

Примечание: Глюкоза (GLUC, ммоль/л), общий билирубин (TBIL, мкмоль/л), холестерин (холестерол) (CHOL, ммоль/л), мочевина (UREA, ммоль/л), креатинин (CREA, мкмоль/л)

Согласно данным, представленным в источниках научной литературы, гипергликемия в ходе химиотерапии наблюдается примерно у 10-30% пациентов, причиной которой могут быть глюкокортикоиды и L-аспарагиназа [Hwangbo, Lee, 2017].

Содержание холестерина в сыворотке крови мужчин, больных злокачественными опухолями иммунной системы, несколько превышает

референсные значения и остается повышенным после химиотерапии. В источниках научной литературы сообщается о том, что множество химиотерапевтических агентов влияют на липидный профиль, повышая содержание холестерина [Sharma et al., 2016].

В таблице 15 представлено содержание электролитов плазме мужчин, больных злокачественными опухолями иммунной системы, до и после полихимиотерапии. Полученные данные соответствуют нормативным значениям.

Таблица 15

Результаты биохимического анализа крови. Показатели содержания электролитов в плазме больных до и после полихимиотерапии ( $M \pm m$ )

	Показатели при поступлении	Показатели после курса ПХТ	Референсные значения	
			min	max
<b>Ca, mmol/l</b>	2,30	2,17	2,2	2,65
<b>Cl, mmol/l</b>	103,6	102,6	90	115
<b>K, mmol/l</b>	4,59	4,63	3,5	5,1
<b>Na, mmol/l</b>	138	137	136	149
<b>Ca<sup>++</sup></b>	1,09	1,01	1	1,38

Примечание: кальций (Ca, ммоль/л), хлор (Cl, ммоль/л), калий (K, ммоль/л), натрий (Na, ммоль/л)

### **3.2.2. Показатели биохимического анализа крови женщин, больных злокачественными опухолями иммунной системы**

В таблице 16 представлены результаты биохимического анализа крови женщин, больных злокачественными опухолями иммунной системы, до и после полихимиотерапии.

Результаты биохимического анализа крови. Белки и ферменты плазмы крови  
больных до и после полихимиотерапии ( $M \pm m$ )

	Показатели при поступлении	Показатели после курса ПХТ	Референсные значения	
			min	max
<b>TP, g/L</b>	70,1	68,9	66	87
<b>ALB, g/L</b>	35,6	32	35	50
<b>AMYL, U/l</b>	51,0	27,67	28	100
<b>ALT, U/l</b>	20,9	26,33	0	45
<b>AST, U/l</b>	21,83	21,93	0	35
<b>LDH</b>	229,7	281,45	0	248
<b>ALP, U/l</b>	94,6	126,65	30	120

Примечание: Общий белок (TP, г/л), альбумин (ALB, г/л), альфа-амилаза (AMYL, Ед./л), аланинаминотрансфераза (ALT, Ед./л), аспаратаминотрансфераза (AST, Ед./л), лактатдегидрогеназа (LDH, Ед./л), щелочная фосфатаза (ALP, Ед./л)

Согласно полученным данным, применение лекарственных препаратов приводило к снижению содержания общего белка в плазме крови на 1,7%, альбумина – на 10,1%. Содержание амилазы после химиотерапии снижалось на 45,7%. При этом после лечения отмечалось повышение содержания аланинаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы и щелочной фосфатазы на 26,0%, на 22,5% и на 33,9% соответственно (таблица 16).

В таблице 17 представлены показатели, характеризующие обмен углеводов, аминокислот, липидов и билирубина, у женщин, больных злокачественными опухолями иммунной системы, до и после полихимиотерапии. Выявлено повышение содержания глюкозы и холестерина на 33,2% и 4,8% после курса химиотерапии, при этом значения показателей,

зарегистрированные после лечения превышают нормативные (таблица 17). Установлено, что в результате действия химиотерапевтических препаратов у женщин незначительно снижалось содержание в сыворотке общего билирубина на 5,4% и креатинина на 0,5% (таблица 17).

Таблица 17

Результаты биохимического анализа крови. Показатели обмена углеводов, аминокислот, липидов, билирубинового обмена больных до и после полихимиотерапии ( $M \pm m$ )

	Показатели при поступлении	Показатели после курса ПХТ	Референсные значения	
			min	max
<b>GLUC, mmol/l</b>	5,90	7,86	4,1	5,9
<b>TBIL, mkmol/l</b>	8,53	8,07	1,7	20
<b>CHOL, mmol/l</b>	5,34	5,61	0	5,3
<b>UREA, mmol/l</b>	7,7	7,7	1,7	8,3
<b>CREA, mkmol/l</b>	82,3	81,9	44	110

Примечание: Глюкоза (GLUC, ммоль/л), общий билирубин (TBIL, мкмоль/л), холестерин (холестерол) (CHOL, ммоль/л), мочеви́на (UREA, ммоль/л), креатинин (CREA, мкмоль/л)

В таблице 18 представлено содержание электролитов в плазме крови женщин, больных злокачественными опухолями иммунной системы, до и после полихимиотерапии. Выявлено снижение содержания кальция ниже значений нормы.

Результаты биохимического анализа крови. Показатели содержания электролитов в плазме больных до и после полихимиотерапии ( $M \pm m$ )

	Показатели при поступлении	Показатели после курса ПХТ	Референсные значения	
			min	max
<b>Ca, ммоль/л</b>	2,42	2,12	2,2	2,65
<b>Cl, ммоль/л</b>	100,87	103,07	90	115
<b>K, ммоль/л</b>	4,51	3,90	3,5	5,1
<b>Na, ммоль/л</b>	140,07	140,03	136	149

Примечание: кальций (Ca, ммоль/л), хлор (Cl, ммоль/л), калий (K, ммоль/л), натрий (Na, ммоль/л).

### 3.3. Показатели, характеризующие свертывающую систему крови

В таблице 19 представлены результаты исследования системы гемостаза мужчин, больных злокачественными опухолями иммунной системы, до и после полихимиотерапии. Выявлено снижение протромбинового индекса на 3,4%, активированного частичного тромбинового времени на 3,8% и тромбинового времени – на 4,4% после применения полихимиотерапевтических препаратов.

В таблице 20 представлены результаты исследования системы гемостаза женщин, больных злокачественными опухолями иммунной системы, до и после полихимиотерапии. Выявлено снижение протромбинового индекса на 2,9% после применения полихимиотерапевтических препаратов.

Таблица 19

Результаты исследования гемостаза ( $M \pm m$ )

	Показатели при поступлении	Показатели после курса ПХТ
<b>ПТИ, %</b>	108,76	105,06
<b>МНО</b>	0,984	1,009
<b>АЧТВ, сек</b>	33,28	32
<b>Фибриноген А, г/л</b>	3,59	4,168
<b>ТВ</b>	18,78	17,97

Примечание: ПТИ – протромбиновый индекс; МНО – международное нормализованное отношение; АЧТВ – активир.частич.тромб.время; ТВ – тромбиновое время.

Таблица 20

Результаты исследования гемостаза ( $M \pm m$ )

	Показатели при поступлении	Показатели после курса ПХТ
<b>ПТИ, %</b>	101,67	98,67
<b>МНО</b>	0,987	1,01
<b>АЧТВ, сек</b>	31	31
<b>Фибриноген А, г/л</b>	4,77	4,65

Примечание: ПТИ – протромбиновый индекс; МНО – международное нормализованное отношение; АЧТВ – активир.частич.тромб.время; ТВ – тромбиновое время.

## **Выводы**

- 1) Изучены показатели биохимического анализа крови людей с системными злокачественными опухолями иммунной системы;
- 2) Исследованы изменения показателей гематологического анализа крови в условиях развития злокачественных опухолей иммунной системы;
- 3) Выявлены особенности изменений показателей системы крови под влиянием лечения.

## Список использованных источников

1. Птушкин В.В. Анемии и дефицит железа у онкологических больных // Клиническая онкогематология. 2013. Т6. №1. С. 91-96.
2. Снеговой А.В., Ларионова В.Б., Манзюк Л.В., Кононенко И.Б. Анемии в онкологии: современные возможности поддерживающей терапии // Клиническая онкогематология. 2016;9(3):326–35.
3. Agassy-Cahalon, L., Yaakubowicz, M., Witz, I. P. & Smorodinsky, N. I. The immune system during the precancer period: naturally-occurring tumor reactive monoclonal antibodies and urethane carcinogenesis.
4. Anber Z.N.H. Effect of doxorubicin and cyclophosphamide regimen versus taxane on liver enzymes in Iraqi women with breast cancer // Biomedical Research 2018; 29 (21): 3869-3873.
5. Balkwill, F. & Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet 357, 539–545 (2001).
6. Balkwill, F., Charles, K. A. & Mantovani, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. Cancer Cell 7, 211–217 (2005).
7. Brodt, P. & Gordon, J. Natural resistance mechanisms may play a role in protection against chemical carcinogenesis. Cancer Immunol. Immunother. 13, 125–127 (1982).
8. Coca, S. et al. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. Cancer 79, 2320–2328 (1997).
9. Curiel, T. J. et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nature Med. 10, 942–94 (2004).
10. Dannenberg, A. & Subbaramaiah. Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: rationale and promise. Cancer Cell 4, 431–436 (2003).

11. De Visser, K. E., Eichten, A., & Coussens, L. M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 6(1), 24–37. doi:10.1038/nrc1782
12. de Visser, K. E., Korets, L. V. & Coussens, L. M. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* 7, 411–423 (2005)
13. Degli-Esposti, M. A. & Smyth, M. J. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nature Rev. Immunol.* 5, 112–124 (2005).
14. Dykaer R, Solwra HE. Approved recommendation on the theory of reference values. Part 6: presentation of observed values related to reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:657–62.
15. Enzler, T. et al. Deficiencies of GM-CSF and interferon  $\gamma$  link inflammation and cancer. *J. Exp. Med.* 197, 1213–1219 (2003).
16. Felker GM, Allen LA, Pocock SJ, et al. Red cell distribution width as a novel prognostic marker in heart failure: data from the CHARM Program and the Duke Databank. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:40-7.
17. Finch, C. E. & Crimmins, E. M. Inflammatory exposure and historical changes in human life-spans. *Science* 305, 1736–1739 (2004).
18. Finke, J., Ferrone, S., Frey, A., Mufson, A. & Ochoa, A. Where have all the T cells gone? Mechanisms of immune evasion by tumors. *Immunol. Today* 20, 158–160 (1999).
19. Firestein, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423, 356–361 (2003).
20. Grimm C., Hofstetter G., Aust S., Mutz-Dehbalaie I., Bruch M., Heinze G., Rahhal-Schupp J., Reinhaller A., Concin N., Polterauer S. Association of gamma-glutamyltransferase with severity of disease at diagnosis and prognosis of ovarian cancer // *British Journal of Cancer* (2013) 109, 610–614.
21. Hamerman, J. A., Ogasawara, K. & Lanier, L. L. NK cells in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 29–35 (2005).

- 22.Hoebe, K., Janssen, E. & Beutler, B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nature Immunol.* 5, 971–974 (2004).
- 23.Hoffman R. *Hematology: Basic Principles and Practice*. 3rd ed. New York, ChurchillLivingstone, 2000.
- 24.Hong N, Oh J, Kang SM, et al. Red blood cell distribution width predicts early mortality in patients with acute dyspnea. *Clin Chim Acta* 2012;413:992-7.
- 25.Horn PS, Pesce AJ Effect of ethnicity on reference intervals // *Clin Chem.* 2002 Oct; 48(10):1802-4.
- 26.Hwangbo Y., Lee E.K. Acute Hyperglycemia Associated with Anti-Cancer Medication // *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2017 Mar; 32(1): 23–29.
- 27.Imada, A., Shijubo, N., Kojima, H. & Abe, S. Mast cells correlate with angiogenesis and poor outcome in stage I lung adenocarcinoma. *Eur. Respir. J.* 15, 1087–1093 (2000).
- 28.International Committee for Standardization in Haematology. The theory of reference values. *Clin Lab Haematol* 1981;3:369–73.
- 29.Ishigami, S. et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 88, 577–583 (2000).
- 30.Jiang L., Feng X., Ma Y., Zhang M. Red cell distribution width: a novel predictor of mortality in critically ill patients // *Thorac Dis* 2014;6(9):E194-E195
- 31.Kaliss, N. Immunological enhancement of tumor homografts in mice: a review. *Cancer Res.* 18, 992–1003 (1958).
- 32.Karagöz E, Tanoglu A. Red Blood cell distribution width: an emerging diagnostic factor of acute appendicitis? *World J Emerg Surg* 2013;8:54.
- 33.Kim CH, Park JT, Kim EJ, et al. An increase in red blood cell distribution width from baseline predicts mortality in patients with severe sepsis or septic shock. *Crit Care* 2013;17:R282.
- 34.Koram K.A., Addae M.M., Ocran J.C., Adu-Amankwah S., Rogers W.O., Nkrumah F.K. Population Based Reference Intervals for Common Blood

- Haematological and Biochemical Parameters in the Akuapem North District  
// Ghana Med J. 2007 Dec; 41(4): 160–166.
35. Korzenik, J. R., Dieckgraefe, B. K., Valentine, J. F., Hausman, D. F. & Gilbert, M. J. Sargramostim for active Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 352, 2193–2201 (2005).
36. Leek, R. D. et al. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* 56, 4625–4629 (1996).
37. Leek, R. D., Landers, R. J., Harris, A. L. & Lewis, C. E. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br. J. Cancer* 79, 991–995 (1999).
38. Lu L., Lou Y., Tan H. Chemotherapy-induced fulminant acute pancreatitis in pancreatic carcinoma: A case report // *Oncol Lett.* 2014 Sep; 8(3): 1143–1146.
39. Majercik S, Fox J, Knight S, et al. Red cell distribution width is predictive of mortality in trauma patients. *J Trauma Acute Care Surg* 2013;74:1021-6.
40. Marieb E.N., Hoehn K. *Human Anatomy & Physiology*, 9th Edition. — Pearson Education, 2012. — 1270 p.
41. Monach, P. A., Schreiber, H. & Rowley, D. A. CD4+ and B lymphocytes in transplantation immunity. II. Augmented rejection of tumor allografts by mice lacking B cells. *Transplantation* 55, 1356–1361 (1993). *Immunol. Lett.* 18, 181–189 (1988).
42. Nduka N, Aneke C, Maxwell-Owhochuku S Comparison of some haematological indices of Africans and Caucasians resident in the same Nigerian environment // *Haematologia (Budap)*. 1988; 21(1):57-63.
43. Pagano, J. S. et al. Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. *Semin. Cancer Biol.* 14, 453–471 (2004)
44. Ran, M. & Witz, I. P. Tumor-associated immunoglobulins. Enhancement of syngeneic tumors by IgG2-containing tumor eluates. *Int. J. Cancer* 9, 242–247 (1972).

45. Randolph, G. J., Angeli, V. & Swartz, M. A. Dendritic cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nature Rev. Immunol.* 5, 617–628 (2005).
46. Raulat, D. H. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nature Immunol.* 5, 1038–1114 (2004).
47. Ribatti, D. et al. Tumor vascularity and tryptase-positive mast cells correlate with a poor prognosis in melanoma. *Eur. J. Clin. Invest.* 33, 420–425 (2003).
48. Schwameis R., Grimm C., Brodowicz T., Petru E., Hefler-Frischmuth K., Staudigl C., Reinthaller A., Heinze G., Polterauer S., Polterauer M. Gamma-glutamyltransferase as novel biomarker in patients with uterine leiomyosarcoma // *Scientific Reports*. 2016. 6:33757
49. Sen HS, Abakay O, Tanrikulu AC, et al. Is a complete blood cell count useful in determining the prognosis of pulmonary embolism? *Wien Klin Wochenschr* 2014;126:347-354.
50. Şenol K, Saylam B, Kocaay F, et al. Red cell distribution width as a predictor of mortality in acute pancreatitis. *Am J Emerg Med* 2013;31:687-9.
51. Serafini, P. et al. Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 64–72 (2004).
52. Sharma M., Tuaine J., McLaren B., Waters D.L., Black K., Jones L.M., McCormick S.P.A. Chemotherapy Agents Alter Plasma Lipids in Breast Cancer Patients and Show Differential Effects on Lipid Metabolism Genes in Liver Cells // *PLoS One*. 2016; 11(1): e0148049.
53. Snell, G. D. Incompatibility reactions to tumor homografts with particular reference to the role of the tumor: a review. *Cancer Res.* 17, 2–10 (1957).
54. Tan, E. M. & Shi, F. D. Relative paradigms between autoantibodies in lupus and autoantibodies in cancer. *Clin. Exp. Immunol.* 134, 169–177 (2003).
55. Tomer, Y., Sherer, Y. & Shoenfeld, Y. Autoantibodies, autoimmunity and cancer. *Oncol. Rep.* 5, 753–761 (1998)

56. Velicer, C. M. et al. Antibiotic use in relation to the risk of breast cancer. *JAMA* 291, 827–835 (2004).
57. Wang Q., Shu X., Dong Y., Zhou J., Teng R., Shen J., Chen Y., Dong M., Zhang W., Huang Y., Xie S., Wei Q., Zhao W., Chen W., Yuan X., Qi X., Wang L. Tumor and serum gamma-glutamyl transpeptidase, new prognostic and molecular interpretation of an old biomarker in gastric cancer // *Oncotarget*. 2017 May 30; 8(22): 36171–36184.
58. Zou, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature Rev. Cancer* 5, 263–274 (2005).

## **Приложения**

COULTER LH 750 System

Reference



CE

PN 427724800 (January 2013)



Beckman Coulter, Inc.  
250 S. Kraemer Blvd.  
Brea, CA 92621 U.S.A.



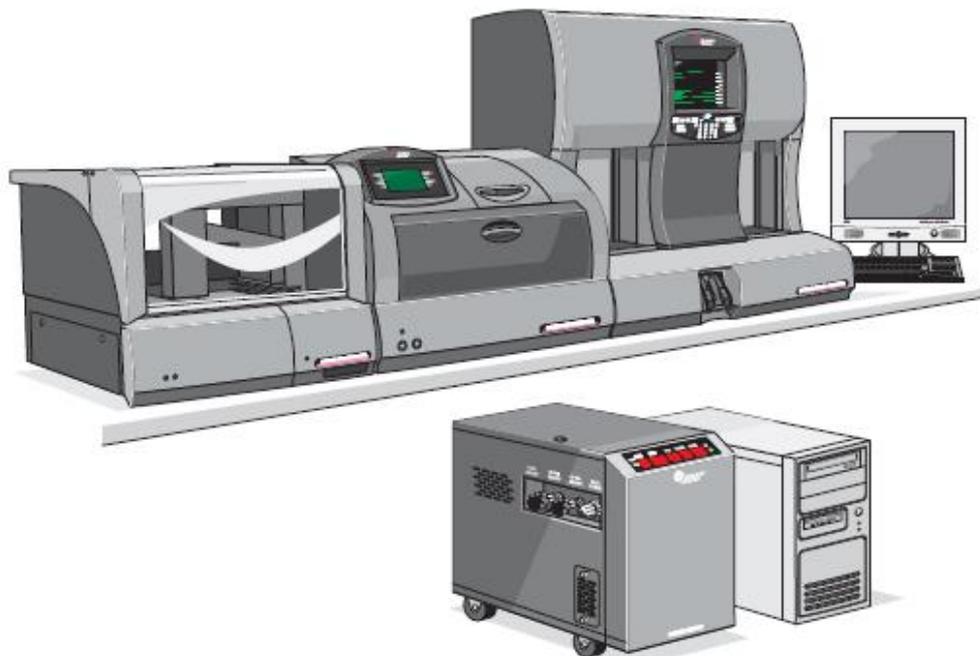
## 1.1 INTENDED USE

The COULTER LH 750 Hematology Analyzer is a quantitative, automated hematology analyzer and leukocyte differential counter For In Vitro Diagnostic Use in clinical laboratories. The COULTER LH 750 Hematology Analyzer provides automated Reticulocyte analysis and enumeration of nucleated red blood cells (NRBCs) as well as an automated method for enumeration of RBCs and WBCs in body fluids.

## 1.2 INDICATIONS FOR USE

The purpose of the LH 700 Series (Figure 1.1) is to separate the normal patient, with all normal system-generated parameters, from the patient who needs additional studies of any of these parameters. These studies might include further measurements of cell size and platelet distribution, manual WBC differential or any other definitive test that helps diagnose the patient's condition.

Figure 1.1 COULTER LH 700 Series



**Parameters**

The system determines these hematologic parameters of whole-blood specimens:

WBC	White Blood Cell or leukocyte count
RBC	Red Blood Cell or erythrocyte count
Hgb	Hemoglobin concentration
Hct	Hematocrit (relative volume of erythrocytes)
MCV	Mean Corpuscular (erythrocyte) Volume
MCH	Mean Corpuscular (erythrocyte) Hemoglobin
MCHC	Mean Corpuscular (erythrocyte) Hemoglobin Concentration
RDW	Red Cell (erythrocyte volume) Distribution Width
Plt	Platelet or thrombocyte count
MPV	Mean Platelet (thrombocyte) Volume
LY%	Lymphocyte percent
MO%	Monocyte percent
NE%	Neutrophil percent
EO%	Eosinophil percent
BA%	Basophil percent
LY#	Lymphocyte number
MO#	Monocyte number
NE#	Neutrophil number
EO#	Eosinophil number
BA#	Basophil number
NRBC%	Nucleated Red Blood Cell percent
NRBC#	Nucleated Red Blood Cell number
RET%	Reticulocyte percent
RET#	Reticulocyte number
*HLR%	High Light scatter Reticulocytes %
*HLR#	High Light scatter Reticulocytes #
IRF	Immature Reticulocyte Fraction
MRV	Mean Reticulocyte Volume
*MSCV	Mean Sphered Cell Volume
*Pct	Plateletcrit
*PDW	Platelet Distribution Width

\*For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.

Unless otherwise stated, all parameter results are shown in a US unit format throughout the manuals.

### 1.3 QUALITY CONTROL (QC)

Your laboratory can use these QC techniques with the LH 700 Series:

- Daily instrument checks
- Commercial or Patient Controls
- Delta checks
- XB Analysis
- Extended QC
- XM Analysis
- Interlaboratory Quality Assurance Program (IQAP)

Quality Assurance includes routine maintenance and service in conjunction with the use of controls and calibrators. The combination of these methods provides the assurance of complete quality control and should be applied separately or in combination, in accordance with your laboratory, state and federal protocols.

### 1.4 METHOD HISTORY

#### Development

W.H. Coulter (1956) describes the Coulter Principle:<sup>1</sup>

A suspension of blood cells is passed thru [sic] a small orifice simultaneously with an electric current. The individual blood cells passing thru the orifice introduce an impedance change in the orifice determined by the size of the cell. The system counts the individual cells and provides cell size distribution. The number of cells counted per sample is approximately 100 times greater than the usual microscope count to reduce the statistical error by a factor of approximately 10 times.

This substantial improvement in precision over previous methods helped to establish the erythrocyte count as a sensitive index of erythropoietic dyscrasia, particularly when considered together with Hct and Hgb measurements.<sup>2</sup>

The COULTER COUNTER Model S analyzer was the first instrument that automated simultaneous multiparameter measurements on blood. Brittin et al., Gottmann, and Hamilton and Davidson, reviewed the performance and clinical value of the Model S.<sup>3, 4, 5</sup>

Refinements of the COULTER COUNTER analyzer to provide accurate size (volume) distribution data led to a reawakening of interest in pathological erythrocyte size distribution, first sparked by Price-Jones.<sup>6, 7</sup>

Among the advantages offered by the Coulter method of counting and sizing was the ability to derive an accurate Hct measurement by summing the electronic volume of erythrocytes. England et al. speculated that electronic Hct measurements did not contain the trapped plasma error of centrifugal Hct measurements.<sup>8</sup>

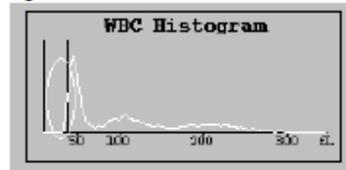
Bull et al. described the use of a COULTER COUNTER analyzer for counting thrombocytes.<sup>9</sup> This method, useful as it was, depended on preparing thrombocyte-rich plasma to avoid counting erythrocytes as thrombocytes. Mundschenk et al. and Schulz and Thom discussed the possibility of counting thrombocytes in the presence of erythrocytes and classifying them

by size.<sup>10, 11</sup> Electronic refinements in the Model S-PLUS enhanced the accuracy of the hydrodynamic method. Von Behrens and Paulus have also cited the feasibility of counting thrombocytes by the Coulter method.<sup>12, 13</sup>

#### **Corrected WBC Counts**

White Blood Cell count results from the CBC analysis. The WBC count may be adjusted for interfering substances when appropriate. If there is a population of cells in the far left of the WBC histogram, the number of cells is derived and the WBC count is corrected. No further correction of WBC is required.

**Figure 1.2 Corrected WBC**



When WBC correction has occurred, the uncorrected WBC will appear in the printout Comments field as UWBC = "value". The "Cellular Interference" suspect message is displayed and the corrected WBC count is reported. The uncorrected WBC can be found on the CBC data tab. When the separation between the WBC populations is poorly defined on the histogram, WBC correction will be performed and the corrected WBC will have an R flag.

#### **Hemoglobinometry**

The lytic reagent used for the complete blood count (CBC) parameters prepares the blood so the system can count leukocytes and measure the amount of hemoglobin. The lytic reagent rapidly and simultaneously destroys the erythrocytes and converts a substantial proportion of the hemoglobin to a stable pigment while it leaves leukocyte nuclei intact. The absorbance of the pigment is directly proportional to the hemoglobin concentration of the sample.

The accuracy of this method equals that of the hemiglobincyanide method, the reference method of choice for hemoglobinometry recommended by the International Committee for Standardization in Hematology.<sup>14</sup>

#### **Differential Measurement**

The COULTER VCS established WBC differential technology using three measurements: individual cell volume, high-frequency conductivity and laser-light scatter.

The combination of low-frequency current, high-frequency current and light-scattering technology provides abundant cell-by-cell information that is translated by the instrument into conventional stained-film leukocyte categories.

#### **Volume Analysis**

Electronic leukocyte volume analysis, using low-frequency current, has been used since 1967.<sup>15</sup> It has been evaluated as a possible adjunct to the differential white cell count.<sup>16,17,18,19</sup>

### Conductivity Analysis

Cell walls act as conductors to high-frequency current. The current, while passing through the cell walls and through each cell interior, detects differences in the insulating properties of cell components. The current characterizes the nuclear and granular constituents and the chemical composition of the cell interior.<sup>20,21,22</sup>

### Light Scatter Analysis

Coulter's experience in flow cytometry dates back decades to Fulwyler's pioneering use of light scatter for cell analysis.<sup>23</sup> Loken et al. and Jovin et al. discuss the relationship of particle size and refractivity to the angle of light scattered from a laser beam.<sup>24,25</sup>

### Reticulocyte (Retic) Analysis

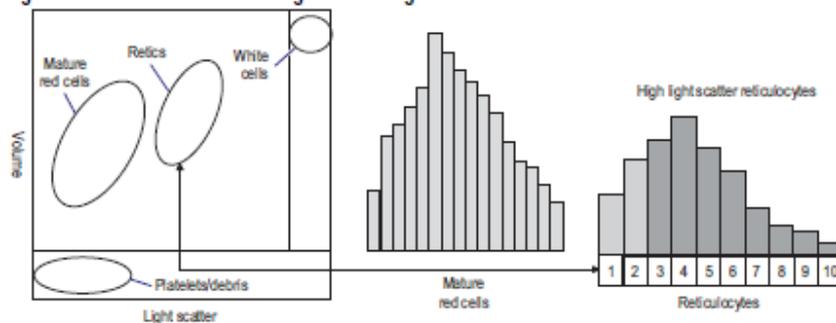
Reticulocytes are immature, nonnucleated erythrocytes retaining a small network of basophilic organelles, consisting of RNA and protoporphyrin. The enumeration of reticulocytes provides a simple, effective means to determine red cell production and regeneration.<sup>26,27,28,29</sup>

The most common means of measuring reticulocytes is to use supravital dyes, such as New Methylene Blue or Brilliant Cresyl Blue. These dyes precipitate and aggregate the basophilic substances within the reticulocyte, resulting in a granular, staining pattern easily seen with light microscopy.<sup>30</sup>

Reticulocyte immaturity is related to cell volume and light scatter. Since more immature reticulocytes are larger, contain more RNA and cause increased light scatter, the cell volume and light scatter will increase with immaturity of the cell.

Figure 1.3 illustrates the IRF and MRV algorithms. This figure is a representation of the VCS data that is shown on the two dimensional analyzer displays.

Figure 1.3 Illustration of the ten light scatter regions



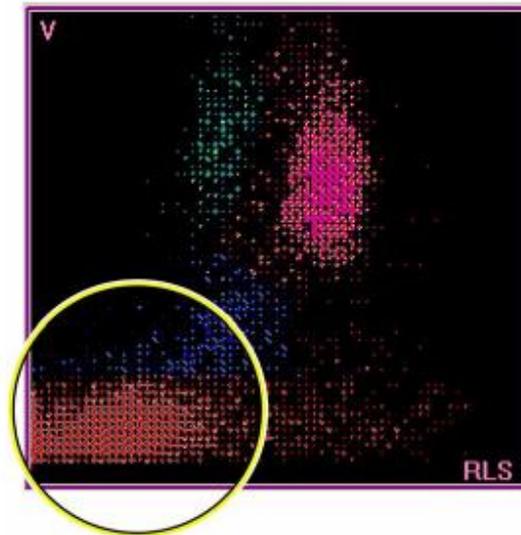
The RET% is calculated as the ratio of reticulocytes to the total number of red cells. The spectrum of light scatter intensity for the retic population is analyzed algorithmically. The detected light scatter intensity of the retic population is divided into equal regions as shown above. The IRF parameter is calculated as the ratio of the total number of retic events in the outermost eight regions (3 to 10) to the total number of retics (regions 0 to 10 - region 0 is not illustrated above). The MRV parameter is calculated as the average volume of all reticulocytes or the mean volume of all retic events.

### NRBC Enumeration

The NRBC Enumeration is achieved through the combined use of impedance and VCS technology and a proprietary algorithm.

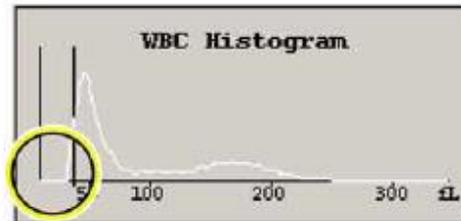
The first step in NRBC enumeration is the identification of particles in the NRBC signature position in the differential data plot. This information is generated from VCS analysis of the cells.

Figure 1.4 NRBC signature position on Differential Dataplot



Once particles have been identified in this region, the LH 700 Series examines the far left region of the WBC histogram for the presence of particles.

Figure 1.5 NRBC location on WBC histogram



If the VCS dataplot and the WBC histogram both indicate the presence of NRBCs, then the combined information is further evaluated for special data patterns -- such as small lymphocytes, giant platelets, and aging blood. If the combined information from the VCS

dataplot and the WBC histogram are consistent with NRBCs, the NRBC count is derived from the WBC histogram.

### **COULTER IntelliKinetics Application**

The LH 700 Series utilizes the COULTER IntelliKinetics application. Control of reaction kinetics is extremely important to ensure the best performance of the automated white cell differential and reticulocyte analysis. The IntelliKinetics application is a management tool for the key step of system optimization when fluctuations in external variables in the laboratory, such as temperature, occur.

The IntelliKinetics application management ensures consistent reaction kinetics. This application intelligently manages variations in ambient laboratory temperature through automatic adjustments to reagent reaction temperature, exposure time and delivery volumes. Enhancements in instrument electronics, such as improved signal-to-noise ratio, work with the IntelliKinetics application to provide better data signals for the system algorithms to analyze. Reagent temperature control helps to increase the speed of dye uptake, thereby improving instrument throughput. Analysis occurs under controlled conditions.

The LH 700 Series with the IntelliKinetics application shows improved separation of populations, both for the white cell differential and reticulocytes. Cell populations made available for analysis by the algorithms are in a more consistent location in three-dimensional space. The IntelliKinetics application, working in concert with new algorithms, provides the instrument with the best signals for analysis, even when the laboratory environment varies throughout the day.

### **XB Analysis**

Dennis B. Dorsey, MD, proposed in 1963 that the relatively constant blood cell indices could be used to follow the performance of hematology instrumentation.<sup>31</sup> Brian Bull, MD, improved the technique and it is termed XB Analysis.<sup>32</sup>

XB Analysis uses a "weighted moving average" of patient sample results because Koepke and Protector said that QC materials "ideally should be similar in structure and in reactivity to the patient constituent being measured. Therefore freshly drawn patient blood samples seem to be the most appropriate [QC material]."<sup>33</sup> Bull explains, "The analyser [sic] is considered to be 'in control' when mean MCV, MCH, and MCHC determined on a batch of 20 patients by use of the algorithm XB are within 3% of the expected mean indices of the population."<sup>34</sup>

### **XM Analysis**

XM Analysis is a quality-control method that uses an Exponentially Weighted Moving Average (EWMA) of CBC, Diff, NRBC and Reticulocyte Parameters and compares them with known target values, to monitor instrument performance. The first form of moving average statistical analysis in hematology was XB Analysis.

### **Extended QC**

Extended QC Rules are derived from the German Quality Control Guidelines for the Medical laboratory, known in Germany as Rili-BÄK. Rili-BÄK (Guidelines of the Federal Chamber of Physicians), was first published in 1987 and amended in 1990 and 1993 covering clinical chemistry, immunochemistry and other tests, but not hematology. In 2003, the guidelines were extended to include hematology.

Users can enable/disable Extended QC Rules for 5C Cell Control.

## 1.5 SYSTEM COMPONENTS

The LH 700 Series is a modular system that consists of the following units.

### Power Supply

This unit consists of two assemblies. The Electronic Power Supply assembly provides the regulated and unregulated voltages required by the circuitry of the system. The Pneumatic Power Supply assembly is the source of air pressure and vacuum.

### Diluter

This unit is the primary operating unit of the system. It performs the mixing, transporting, pipetting, diluting, lysing, and sensing functions.

### Analyzer

This unit controls the electronic sequence of each operating cycle and calculates the results. It receives count and size information directly from the Diluter while the sample is being cycled. Many of the controls and indicators needed for normal daily operation are on the front of the Analyzer.

### LH Workstation

The LH Workstation holds the data algorithms used to process the List Mode Data supplied by the Analyzer. From the List Mode Data, the Workstation computes Diff and Retic results, develops the histograms and DataPlots, and displays the results. The Workstation stores the data and transmits it to the Printer and Host computer.

The LH Workstation is equipped with a mouse that allows operator interaction with the software.

---

**CAUTION** System integrity can be compromised and operational failures can occur if:

- This equipment is used in a manner other than specified.
- You introduce software that is not authorized by Beckman Coulter into your computer.
- You install software that is not an original copyrighted version.

Operate the instrument as instructed in your product documentation. Only operate your system's computer with software authorized by Beckman Coulter. Only use software that is an original copyrighted version to prevent virus contamination.

---

The LH Workstation is not for use as a general purpose personal computer.

### Handheld Scanner

Use the handheld scanner to manually read bar-code labels.

## 1.6 HARDWARE OPTIONS

### Graphic/Laser Printer

You can use any printer that is supported by the Microsoft Windows 2000 operating system. The Printer prints the data displayed on the LH Workstation screen, including parameter data and graphics.

### LH SlideMaker

The LH SlideMaker makes blood smears from samples as they are being analyzed, according to user-defined criteria.

### LH SlideStainer

The SlideStainer stains blood smears generated by the LH SlideMaker or by manually prepared blood smears introduced into the LH SlideStainer.

## 1.7 CONTROLS AND CALIBRATOR

### Controls

Use stable reference controls to monitor the instrument performance as part of your quality control and to verify calibration. Refer to the package insert for detailed information before using a control.

COULTER 5C Cell control monitors the CBC and differential (Diff) parameters.

LATRON primer prepares the tubing and instrument components for the LATRON control.

LATRON control monitors the performance of the volume, conductivity and light scatter measurements.

Retic-C cell control monitors the reticulocyte (Retic) parameters.

Lin-C linearity control identifies the reportable range of the instrument's CBC parameters

### Calibrator

The S-CAL calibrator kit is an acceptable alternative to the whole-blood reference method of calibration. S-CAL calibrator is traceable to reference methods and materials. Use S-CAL calibrator to ensure accurate instrument measurements. Refer to the package insert for detailed information before use.

The differential and reticulocyte measurement devices are set for optimum performance at the factory.

## 1.8 REAGENTS

Beckman Coulter developed and tested this Beckman Coulter instrument exclusively for use with Beckman Coulter reagents. Because Beckman Coulter cannot guarantee the performance of the instrument using reagents not manufactured by Beckman Coulter, please be advised that the warranty on the instrument is conditioned upon the use of Beckman Coulter reagents.

### **Diluent**

Beckman Coulter diluents, including LH Series diluent and ISOTON 4 diluent, are isotonic electrolyte solutions that:

- Dilute whole-blood samples.
- Stabilize cell membranes for accurate counting and sizing.
- Conducts aperture current.
- Rinse instrument components between analyses.
- Carry and focus the sample stream in the flow cell to direct the blood cells through the aperture.

Since cell size (volume) is measured, the effect of diluent on osmosis or other phenomena must be tightly controlled. The diluent must not contain particles and must not support growth of bacteria or molds.

### **CBC Lytic Reagent**

LYSE S III Diff lytic reagent:

- Rapidly lyses erythrocytes (RBCs), freeing hemoglobin (Hgb) and reducing the size of cellular debris to a level that does not interfere with leukocyte (WBC) count.
- Causes a substantial conversion of the Hgb to a stable cyanide-containing pigment, the absorbance of which is directly proportional to the Hgb concentration over the clinical range.

LYSE S 4 Lytic reagent:

- Rapidly lyses erythrocytes (RBCs), freeing hemoglobin (Hgb) and reducing the size of cellular debris to a level that does not interfere with leukocyte (WBC) count.
- Causes a substantial conversion of the Hgb to a stable oxyhemoglobin-based hemachromagen, the absorbance of which is directly proportional to the Hgb concentration over the clinical range.

### **LH Series PAK Reagent System**

The LH Series PAK Reagent Kit contains Erythrolyse II Diff Lytic Reagent and Stabilysse Diff Preservative. The Diff Lytic Reagent:

The Diff Lytic Reagent:

- Dilutes the blood samples
- Rapidly lyses erythrocytes (RBCs)
- Reduces cellular debris to an insignificant level

The Diff Preservative:

- Maintains leukocyte (WBCs) in their near-natural state
- Allows the leukocytes to be differentiated into their subpopulations through the volume, conductivity and light-scatter measurements.

### **The LH Series RETIC PAK Reagent Kit**

The LH Series RETIC PAK Reagent Kit contains Reagent A Retic Stain and Reagent B Retic Clearing Solution.