

## ЛЕКЦИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 615.471.03:616.15-074

### ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ИНФОРМАТИВНОСТЬ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ АНАЛИЗАТОРОВ

В. М. Погорелов<sup>1</sup>, Л. А. Иванова<sup>2</sup>, Г. И. Козинец<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития России; <sup>2</sup>Институт медицины труда РАМН, Москва

**Резюме.** Подсчет лейкоцитарной формулы — наиболее часто запрашиваемое клиницистами исследование. Его автоматизация и правильная интерпретация результатов требуют обширных знаний в области медицины, биологии, а иногда и умения разбираться в тонкостях современных технологий, которые реализованы в гематологических анализаторах. В этой лекции мы рассматриваем традиционные и новые гематологические параметры, оцениваем эффективность и информативность гематологических анализаторов. В настоящее время подсчет клеток крови и дифференцированный подсчет лейкоцитов дополнены расширенным анализом ядросодержащих элементов, включающих клетки, обычно не встречающиеся в периферической крови: стволовые клетки, бластные клетки, атипичные лимфоциты, незрелые гранулоциты, ядросодержащие эритроциты (нормобласты), незрелые ретикулоциты и тромбоциты. Таким образом, благодаря технической революции созданы гематологические анализаторы, способные с высокой точностью оценивать не только известные характеристики клеток крови, но и вычислять ранее не известные индексы, в том числе ретикулоцитарные и тромбоцитарные. Более того, формула крови, определяемая современными приборами, вышла за пределы пяти нормальных популяций лейкоцитов. В лекции критически оцениваются возможности наиболее часто используемых автоматических анализаторов, уделено внимание как проточным системам, так и анализаторам клеточного изображения. Лекция предназначена для специальной подготовки персонала клинических лабораторий и формирования глубоких знаний лабораторной гематологии.

**Ключевые слова:** гематологические анализаторы, проточная цитометрия, анализ клеточного изображения, ошибки измерения клеток, дифференцированный подсчет лейкоцитов, стволовые клетки, бластные клетки, нормобласты, фракции незрелых ретикулоцитов и тромбоцитов, стандартизация диагностики

### EFFICIENCY AND INFORMATIVE VALUE OF HEMATOLOGICAL ANALYZERS

V.M.Pogorelov<sup>1</sup>, L.A.Ivanova<sup>2</sup>, G.I.Kozinets<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hematology Research Center, Moscow; <sup>2</sup>Institute of Labor Medicine, Moscow

**S u m m a r y.** Complete blood count (CBC) and leukocyte differential count (LDC) is the most frequently requested clinical laboratory tests. These analyses are highly automated, and the correct interpretation of results requires extensive knowledge of the analytic performance of the instruments and the clinical significance of the results they provide. We analyze the state of the art regarding traditional and new parameters with emphasis on clinical applications and analytical quality. The problems of some traditional parameters of the CBC count, such as platelet counts, some components of the LDC, such as monocyte and basophil counts, and other commonly used values, for example red cell volume distribution and platelet counts (mean platelet volume and platelet distribution) are discussed. The new parameters, evaluated from analytical and clinical viewpoints, are the available components of the extended differential count (stem cells, immature granulocytes, and erythroblasts), the immature reticulocyte fraction, the reticulocyte counts, the fragmented RBCs, and the immature platelet fraction. The potentialities of the most commonly used automated hematology analyzers are critically analyzed, with special attention to cytometry systems and cell image analyzers. The lecture is intended for special training of clinical laboratory staff and the formation of profound knowledge of laboratory hematology.

**Key words:** blood cell analyzers, flow cytometry, cell image analyzer, analytic performance, CBC count, leukocyte differential count, stem cells, blast cells, nucleated RBCs, reticulocyte fraction, immature platelet fraction, standardization

Благодаря внедрению новых физических принципов исследования клеток крови и разработке программного обеспечения автоматические гематологические анализаторы ведущих мировых фирм за два последних десятилетия подверглись серьезной тех-

нической эволюции [1—4]. Результат — повышение аналитической эффективности и информативности получаемых данных, причем старые и вновь предлагаемые клинические приложения анализаторов продолжают улучшаться благодаря специальным знаниям и собираемой информации.

Например, подсчет клеток крови (count of blood cell — CBC) и дифференцированный подсчет лейкоцитов (leukocyte differential count — LDC), т. е. формулы крови, сейчас дополнены расширенным подсчетом ядросодержащих элементов (extended differential count — EDC), включившим клетки,

#### Для корреспонденции:

Погорелов Валерий Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, зав. лабораторией гематоцитологии ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития России.

Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский переулок, д. 4а.

Телефон: +7 (916) 172-80-29.

E-mail: pogorelov.valery@gmail.com

обычно не встречающиеся в периферической крови: стволовые клетки (CD34), бластные клетки, атипичные лимфоциты, незрелые гранулоциты, ядросодержащие эритроциты (нормобласты), незрелые ретикулоциты и тромбоциты. Здесь и далее использованы оригинальные сокращения.

Аналитически надежно анализаторы выполняют подсчет эритроцитов, лейкоцитов, определение концентрации гемоглобина и среднего корпускулярного объема эритроцитов (MCV), в то время как параметры атипичных клеток, ретикулоцитарные индексы (средний объем ретикулоцитов, среднее содержание гемоглобина в ретикулоците), критерии идентификации фрагментов эритроцитов и клеток фракций незрелых ретикулоцитов или тромбоцитов (особенно при малой их концентрации) остаются статистически менее значимыми. Такие показатели как ширина распределения эритроцитов (RDW) и тромбоцитов (PDW), средний объем тромбоцитов (MPV), следует использовать с осторожностью: они еще не стандартизованы, их значения варьируют, в зависимости от условий преаналитической подготовки (времени, прошедшего с момента забора пробы крови до ее анализа, примененного антикоагулянта и т. д.).

В автоматических гематологических анализаторах благодаря использованию оптических, электрических и цитохимических свойств, как правило, адаптируются принципы проточной цитометрии [4], а в анализаторах клеточного изображения — принципы компьютерной морфометрии [5]. По своей сути все измерения параметров клеток крови с их помощью являются косвенными: объем клетки — электрический сигнал прохождения частицы через отверстие; количество незрелых клеток — флуоресценция красителя, связанного с ДНК или РНК; геометрия — поглощение света, проходящего через распластанную на стекле, фиксированную и окрашенную клетку. Значения этих измерений не соответствуют истинной величине: ошибки возникают как из-за неточности измерений, так и из-за природы самих измеряемых объектов [6]. Одним из основных источников ошибок является преаналитический период, т.е. пробоподготовка. Экспериментально доказав сопоставимость цитоцентрифугатов и воспроизводимость результатов их исследования с обычными мазками, с целью стандартизации пробоподготовки для анализа микроскопических изображений мы предлагаем их использование на практике [7].

Все ошибки измерений клеток делятся на грубые, систематические и случайные. Грубые ошибки (промахи) возникают как следствие поломки прибора, толчков при работе на нем, непредвиденного вмешательства, непригодности реагентов и т. д. Систематические ошибки, или ошибки, составляющие погрешность измерений, постоянны, входят в каждый результат по строго определенному закону. Их можно исключить, введя в результаты измерений соответствующие поправки. Причиной случайных ошибок может быть как аналитическая, так и индивидуальная биологическая изменчивость. Аналитическую точность биологически высоковарьирующих параметров можно повысить лишь до определенного

предела, при этом их клиническая значимость улучшится незначительно.

Качество любого, автоматизированного или "ручного" гематологического анализа оценивается по его надежности, которая определяется следующими терминами (ГОСТ 16263-70):

- точность измерений — качество измерений, отражающее близость результатов к истинному значению. Высокая точность соответствует малым систематическим и случайным погрешностям. Точность показывает разницу между измеренной и истинной величиной, поэтому она может быть определена только при условии, если известно истинное значение. В случае гематологических исследований стандарты имеются только для измерения гемоглобина;

- правильность измерений — качество измерений, отражающее близость к нулю систематических погрешностей в их результатах;

- сходимость измерений отражает близость между результатами, выполненными в одинаковых условиях (параллельные исследования, проведенные одним лицом в той же лаборатории, в одно и то же время, с использованием определенных измерительных приборов и т. д.);

- воспроизводимость измерений показывает вариабельность повторных измерений одного и того же образца в различных условиях (в разное время, в различных местах и т. п.).

Измерение, выполненное с высокой точностью, содержит мало погрешностей.

Для определения значения ошибок в аналитике были предложены различные методы, основанные как на мнении клиницистов, так и на результатах ежедневного анализа распределений клеток крови по измеряемым параметрам и в отношении к установленным порогам, и в отношении к биологической изменчивости. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и ограничения.

Исходя из вклада параметра в мониторинг больных, — чем он меньше, тем менее значим параметр в практическом плане, — отметим, что максимум допустимой неточности не должен быть выше половины значения внутрииндивидуальной изменчивости, а погрешность измерения — меньше  $\frac{1}{4}$  групповой биологической вариабельности (суммы внутри- и межиндивидуальной изменчивости). Чтобы вычислить общую допустимую ошибку измерения, обе оценки можно объединить. Сравнение имеющихся в литературе данных оценки аналитической ошибки (общей текущей ошибки) и ошибки, определенной на базе современного уровня исследований с использованием гематологических анализаторов, свидетельствует об удовлетворительной эффективности большинства параметров, включая количество лейкоцитов, эритроцитов, нейтрофилов и лимфоцитов, концентрацию гемоглобина и MCV. Результаты приемлемы и для количества ретикулоцитов и эозинофилов, но не оптимальны для моноцитов и базофилов. В случае подсчета тромбоцитов на фоне их нормальных значений результаты можно принять как значимые, но при тяжелой тромбоцитопении они также не оптимальны. Точность подсчета

тромбоцитов в последнем случае принципиальна — от результата зависит потребность в трансфузиях этих клеток, так как порог их критической концентрации в периферической крови больных составляет  $(20—10) \cdot 10^3/\text{мкл}$ , хотя если нет лихорадки и кровотечения, допускаются и более низкие значения. Многоцентровой мониторинг химиотерапии у больных показал, что точность оптических методов количественного анализа тромбоцитов не выше точности кондуктометрических методов: все гематологические анализаторы на  $(1,2—3,5) \cdot 10^3/\text{мкл}$  превышают референсные значения иммунологического метода. Наилучший результат дает анализ тромбоцитов на приборе Abbott Cell-dyn 4000 ("Abbott Diagnostic", США) или с использованием моноклональных антител anti-CD61 на приборе Abbott Cell-dyn Sapphire той же фирмы.

Способность метода идентифицировать количественные и качественные различия проб нормальной и патологической крови, т. е. выявлять незрелые и атипичные клетки или определять частоту морфологически измененных эритроцитов, определяется термином "клиническая чувствительность". В этом смысле современные технологии гематологических анализаторов даже с учетом "морфологических флагов" продолжают улучшаться, так как принятие решения возможно лишь при 3% ложноотрицательном результате. Исследование на гематологическом анализаторе должно сопровождаться микроскопией клеток в окрашенных мазках крови [8].

*Дифференцированный подсчет лейкоцитов (LDC)* формирует формулу крови, каждый из классов которой, даже происходя из одного и того же предшественника и взаимодействуя с другими клеточными элементами, является самостоятельным в терминах вызревания, функции и контроля. Считается, что морфологические различия лейкоцитов, ставшие основой формулы крови, описал П. Эрлих в 1891 г. (цит. по [9]).

Наиболее чувствительным и точным методом дифференцированного подсчета лейкоцитов в настоящее время является проточная цитометрия и идентификация каждого типа клеток с помощью моноклональных антител к специфическим антигенам, экспрессирующимся на их поверхности.

Традиционному микроскопическому методу подсчета лейкоцитов в мазках крови присущи три типа ошибок:

- ошибки, вызванные неравномерным распределением клеток на плоскости мазка;
- ошибки морфологической идентификации клеток, т.е. отнесения ее к соответствующему классу;
- субъективность.

Учитывая, что микроскопический анализ часто базируется на подсчете 100 клеток, можно утверждать, что все перечисленные ошибки возникают как следствие малочисленности выборки.

При автоматическом анализе на гематологическом анализаторе в выборку включается несколько тысяч клеток, результат иллюстрируется "морфологическими флагами", что приближает его к истинным значениям как при нормальных, так и при низких пропорциях клеток в периферической крови. Вместе с тем некото-

рые проблемы автоматического анализа требуют решения. Например, варибельность подсчета моноцитов и базофилов зависит от используемого гематологического анализатора, а точность результатов обязательно должна контролироваться микроскопией этих клеток в окрашенных мазках крови. В случае истинной базофилии современные анализаторы, как правило, не досчитывают базофилы или ошибочно принимают их за бластные, плазматические или лимфоидные клетки. Некоторые из этих проблем можно разрешить благодаря компьютерной обработке оцифрованных изображений клеток высокого разрешения, например с помощью системы CellaVision™ DM96 или аналогичных систем. Показано, например, что дифференцированный подсчет лейкоцитов анализатором Sysmex XE 2100 ("Sysmex Corporation", Япония) и классификация микроскопических изображений клеток системой DM96 для нейтрофилов сопоставимы и в контроле, и при патологии; корреляция для лимфоцитов и эозинофилов приемлема, а для базофилов, моноцитов и незрелых гранулоцитов (метамиелоцитов, миелоцитов и бластных клеток) — слаба [9]. Более того, результаты типирования нейтрофилов, Т-/В-лимфоцитов, моноцитов соответствующими моноклональными антителами (CD16b, CD3, CD19 и CD14) в обогащенных этими клетками фракциях (данные конфокальной лазерной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии) при анализе той же самой пробы согласуются с расположением клеток на скаттерограмме Sysmex XE 2100 [10]. После обработки специфическими реагентами и флюоресцентными красителями лейкоциты классифицируются анализатором на двухмерных скаттердиаграммах (DIFF-скаттерограмме) по размерам клеток и интенсивности флюоресценции.

*Расширенный подсчет ядродержащих элементов (EDC)* предусматривает дополнение обычного анализа пятью морфологическими классами клеток, в норме отсутствующими в пробах периферической крови здоровых людей: незрелыми или атипичными клетками, бластными клетками, незрелыми гранулоцитами, атипичными лимфоцитами, гемопоэтическими клетками-предшественниками, нормобластами. Метод предполагает снижение потребности в дополнительной микроскопии клеток как в мазках крови, так и в мазках костного мозга. Такие анализаторы, как Technicon-Siemens ("Siemens Healthcare Diagnostics Inc.", США), внутри популяции лейкоцитов могут выделять так называемые "большие неокрашенные клетки" (UC). Основная проблема метода заключается в том, что он не специфичен. Морфологический подсчет UC, например, может включить бластные клетки, атипичные лимфоциты, плазматические клетки или просто нейтрофилы, негативные в реакции на пероксидазу.

*Гемопоэтические клетки-предшественники (НРС).* Точка приложения метода — определение времени оптимального сбора CD34-положительных клеток для трансплантации после их мобилизации факторами роста или химиотерапией. Обычно для этого используют проточную цитофлуориметрию с моноклональными антителами к CD34, но это трудоемкий, дорогой метод, который к тому же требует вы-

сокой квалификации персонала. Порог варьирует от 10 до 20 CD34 в 1 мкл.

Как альтернативу Sysmex предлагает простой метод скрининга НРС на приборе Sysmex ХЕ 2100 в режиме обычного СВС. Погрешность метода зависит от концентрации клеток в пробе крови: коэффициент вариации (CV, %) для 30 НРС в 1 мкл равен 24,7%, для 15 НРС в 1 мкл и меньше — 64%. Кроме того, трехчасовая отсрочка исследования с момента забора крови занижает величину параметра на 50% даже при условии, что результаты работы на Sysmex ХЕ 2100 положительно коррелируют с анализом с CD34 моноклональными антителами:  $r = 0,64$  и  $r = 0,83$ .

Исходя из перечисленных ограничений, разработчики сделали вывод о том, что подсчет НРС на гематологическом анализаторе имеет максимальное прикладное значение в двух ситуациях:

— когда НРС не обнаруживаются после мобилизации и анализ с моноклональными антителами бесполезен;

— когда число таких клеток значительно превышает 30 в 1 мкл и их можно собрать без цитофлюориметрического исследования CD34. Если количество НРС колеблется от 0 до 30 клеток в 1 мкл, необходимо подсчитывать CD34.

*Незрелые гранулоциты (IG).* Подсчет незрелых клеток гранулоцитарного ростка важен при диагностике инфекций, особенно неонатального сепсиса. Однако вариабельность результатов у разных исследователей настолько велика, что практическое использование метода затруднено. Другие незрелые клетки гранулоцитарного ростка (метамиелоциты, миелоциты или промиелоциты) надежно идентифицируются морфологически, а также посредством многоцветовой проточной цитометрии с моноклональными антителами.

Незрелые гранулоциты обычно отсутствуют в периферической крови и появляются, увеличиваясь в количестве, при бактериальных инфекциях, остром воспалении, метастазах рака в костный мозг, некрозе тканей, реакции "трансплантат против хозяина", хирургической или ортопедической травме, миелопролиферациях, терапии стероидами и в III триместре беременности. Нейтрофилез при этом — следствие выхода из костного мозга клеток маргинального пула. Иногда (у пожилых больных или младенцев, а также у больных на фоне миелосупрессивной терапии) нейтрофилез не возникает — появление в периферической крови незрелых гранулоцитов может сопровождаться нейтропенией. В этой ситуации даже небольшое число незрелых гранулоцитов (не менее 2%) — диагностический критерий инфекции.

Хотя микроскопическая идентификация незрелых гранулоцитов не точна, особенно при их малом количестве (менее 10%), гематологический анализатор Sysmex ХЕ 2100 выполняет подсчет этих клеток с CV, равным около 7%, причем результаты анализа положительно коррелируют с данными и морфологического исследования ( $r = 0,78$ ), и проточной цитометрии ( $r = 0,96$ ). Публикации, посвященные использованию анализатора при инфекционной патологии, свидетельствуют в пользу высокой специфичности

Sysmex-анализа (от 83 до 97%), однако демонстрируют его низкую чувствительность (от 35 до 40%). Поэтому даже при статистически значимой корреляции с положительными посевами крови Sysmex-анализ не рекомендован в качестве скринингового теста.

*Ядросодержащие эритроциты (NRBCs).* Ядросодержащие эритроциты в небольших количествах ( $0,03—4,8 \cdot 10^9/\text{л}$ ) обнаруживают в крови пуповины здоровых новорожденных [11]. Эритробласты попадают только в их периферическую кровь, причем в низких концентрациях. В высоких концентрациях они могут появиться при гемолитической болезни новорожденных, а также при недоношенности или гипоксии плода. NRBCs, однако, циркулируют в крови взрослых больных при талассемии, миелопролиферации, особенно миелофиброзе, метастазах солидной опухоли в костный мозг, лейкозном экстрамедуллярном кроветворении, гемопозитическом стрессе (сепсис, массивные геморрагии, тяжелая гипоксия). С их появлением в крови положительно коррелирует плохой прогноз течения всех перечисленных состояний.

Более того оказалось, что смертность пациентов после хирургических пособий, например, операций на сердце, при наличии в их крови NRBCs может достигать 21,1%, тогда как обычно она не превышает 1,2%. Аналогично, концентрация NRBCs от  $0,2 \cdot 10^9/\text{л}$  в крови больных, перенесших трансплантацию стволовых клеток — плохой прогностический признак: смертность больных достигает 100%. Этот параметр можно использовать и для оценки эффективности трансфузий, например, при талассемии: трансфузии целесообразны, когда концентрация NRBCs менее 5 на 100 лейкоцитов. Следовательно, важно не только подтвердить присутствие NRBCs в крови, но и подсчитать их количество.

До сегодняшнего дня микроскопический анализ NRBCs остается одним из трудоемких неавтоматизированных методов исследования в гематологии [11]. При этом точность и аккуратность микроскопического подсчета редких клеточных типов вообще и этих клеток в частности оставляет желать лучшего: они могут быть пропущены, CV их значений колеблется от 30 до 100%, кроме того, завышается оценка количества лейкоцитов, а при дифференцированном подсчете — и лимфоцитов. Поэтому при сложностях диагностики специально предпринимают анализ NRBCs.

Из существующих в настоящее время автоматических гематологических анализаторов на трех (Beckman Coulter, Hialeah FL и Siemens ADVIA 2120) можно выполнить анализ NRBCs во всех пробах крови, которые исследуют на содержание гемопозитических клеток-предшественников. При работе на других анализаторах их оценка должна быть специально запрограммирована. С высокой, сравнимой с референсным методом точностью подсчет NRBCs может быть выполнен на анализаторе Sysmex ХЕ-2100 [11].

Опубликованные результаты свидетельствуют о высокой воспроизводимости (CV менее 10%) результатов анализа, точность соотносится с результатами микроскопии или проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (CV менее 20%), которая, ве-

роятно, может быть референсным методом: CV от 0,9% до 0,99%. Доверительные интервалы составляют 1—2 ядродержащих эритроцита на 100 лейкоцитов.

*Фракция незрелых ретикулоцитов (IRF).* В 1931 г. L. Heilmeyer (цит. по [13]) предложил классифицировать ретикулоциты по степени зрелости на основании результатов микроскопического исследования ретикулофиламентозной субстанции после суправитальной окраски бриллиантовым голубым. "Зрелость" ретикулоцитов оказалась индексом эритропоэтической активности костного мозга, однако плохая воспроизводимость параметра стала препятствием для его клинического применения. Позднее, учитывая, что ретикулофиламентозная субстанция представляет собой комплекс белков и рибосомной РНК, предложили метод цитометрии красителя, специфически связанного с рРНК.

Термин "фракция незрелых ретикулоцитов" был предложен В. Davis в 1997 г. [12] для оценки вызревания этих клеток крови. Сразу же стало ясно, что величина IRF зависит от используемого анализатора. Поэтому одни исследователи делят незрелые ретикулоциты по содержанию в них РНК на три популяции, другие — на две; референсные интервалы различаются, и сравнение результатов анализа проб крови даже в научных публикациях стало проблемой. Тем не менее, параметр IRF независимо от способа его определения внедрен в практику в качестве раннего и чувствительного индекса эритропоэза.

Наилучшим клиническим приложением, особенно для классификации анемий, считается в частности ранняя идентификация регенерации костного мозга при ретикулоцитопении у больных после трансплантации костного мозга или химиотерапии. Характерным для этой ситуации является выход в кровь ретикулоцитов с высоким содержанием РНК. При трансплантации как аутологичных, так и аллогенных стволовых клеток увеличение фракции IRF предсказывает успех терапии еще до возрастания абсолютного количества нейтрофилов и общего количества ретикулоцитов.

Параметр IRF нашел применение при дифференциальной диагностике приобретенной гемолитической анемии и постгеморрагической анемии, т. е. анемий с увеличенной продукцией ретикулоцитов, включая их незрелую фракцию, от анемий со сниженной костно-мозговой активностью (анемия при хронической почечной недостаточности), значит — уменьшением числа ретикулоцитов и IPF, а также от анемий при острых инфекциях или миелодиспластическом синдроме, где возникает диссоциация между общим числом ретикулоцитов (снижено или нормально) и IPF, значение которого увеличено.

Другая область практического использования параметра — мониторинг терапии алиментарных анемий (дефицит железа, витамина В<sub>12</sub> и фолатов), при эффективности которой увеличение его значения регистрируется за несколько дней до подъема числа ретикулоцитов [4]. Оказалось также, что суммарное увеличение количества ретикулоцитов с высокой и средней интенсивностью флюоресценции (данные цитометрии), т. е. HFR и MFR составляющих IFR, на

2 дня опережает появление в периферической крови больных CD34-клеток, мобилизованных химиотерапией или ростовыми факторами. Таким образом, фракция незрелых ретикулоцитов является косвенным маркером сроков сбора стволовых клеток и готовности их для аутологичной трансплантации.

Ограничения возникают в связи с различной чувствительностью используемых гематологических анализаторов, которая выше для флюоресцентных методов.

*Ретикулоцитарные индексы (RI).* Гематологические анализаторы последнего поколения кроме эритроцитарных индексов, оценивают и ретикулоцитарные индексы, среди которых клинически значимыми считаются содержание гемоглобина в ретикулоците (CHr) и средний объем ретикулоцита (MCVr) [13]. Индекс CHr прямо отражает синтез гемоглобина в клетках костного мозга и является мерой адекватности поставки железа. Снижение значений этого параметра — свидетельство железодефицитного эритропоэза, даже если традиционными биохимическими методами исследования (на ферритин и трансферрин) его не удастся выявить (воспаления, анемия хронических заболеваний). С другой стороны, параметр полезен для мониторинга внутривенной терапии железом: он возрастает уже через 48 ч после назначения препаратов. Исключение составляет гетерозиготная β-талассемия, при которой CHr всегда низкий.

Низкая величина CHr при проведении больным гемодиализа подтверждает наличие железодефицитного эритропоэза. Более того, у больных, получающих эритропоэтин, низкие значения CHr отражают функциональный дефицит железа. CHr — реальный индекс дефицита железа и железодефицитной анемии у больных детей.

Клиническую значимость MCVr, другого ретикулоцитарного индекса, пока можно только предполагать. У больных с небольшим запасом железа этот индекс быстро нарастает под влиянием терапии препаратами железа, но также быстро снижается по мере развития железодефицитного эритропоэза. При терапии витамином В<sub>12</sub> и препаратами фолиевой кислоты индекс снижается на фоне наименьшего количества ретикулоцитов и макроцитов. Если умножить величину MCVr на число ретикулоцитов, будет получен гематокрит ретикулоцитов, пригодный для обнаружения допинга в спорте. Частное от деления MCVr на MCV — один из ранних признаков восстановления эритропоэза после трансплантации костного мозга.

Таким образом, клинически CHr и MCVr перекликаются. Как известно из литературы, основное препятствие их практическому использованию состоит в том, что пока имеется лишь немного гематологических анализаторов, которые могут оценивать эти индексы: величину CHr определяют Siemens ADVIA 2120 и анализаторы Sysmex серии XE. При оценке MCVr практическая лаборатория сталкивается с отсутствием стандартов, что делает невозможным сравнение результатов, полученных на разном оборудовании. Например, средние значения и референсные интервалы MCVr на ABX Pentra ("HORIBA

Medical", Франция) — 102 и 91—111 фл, на Beckman Coulter LH-750 — 108 и 98—120 фл и на ADVIA 120 — 106 и 100—114 фл, соответственно.

*Ширина распределения эритроцитов (RDW).* Оценивая гистограмму распределения эритроцитов по объему, современные гематологические анализаторы вычисляют индекс гетерогенности [11]. На выходе это, как правило, CV (в %) и реже — стандартное отклонение от среднеарифметического значения (*SD*).

Клиническая значимость анизоцитоза эритроцитов была доказана посредством анализа кривой Прайс-Джонса, однако трудности построения кривой ограничили ее практическое использование. В 1980 г. была предложена классификация анемического синдрома по величинам MCV и RDW. В дополнение к микро-, нормо- и макроцитам эта классификация позволила разделить эритроциты на гомогенную (нормальная RDW) и гетерогенную (увеличенная RDW) популяции. Первая стала характеристикой гипопролиферативной анемии, аплазии и гетерозиготной талассемии, вторая — алиментарных анемий, дефицитных по железу, витамину В<sub>12</sub>, фолатам, а также сидеробластной анемии.

Анализ RDW стал рутинным, хотя уже в ранних работах были выявлены многочисленные исключения из правила: увеличение значений показателя при анемии вследствие хронической инфекции или приблизительно в половине случаев гетерозиготной талассемии и нормальные значения в 15—20% случаев железодефицитной анемии. Оказалось, что RDW широко варьирует в пределах одной патологии, и это снизило ценность индекса гетерогенности эритроцитов для дифференциальной диагностики, хотя и не исключило его применение в качестве общего маркера анемии.

Еще один недостаток анализа RDW связан с методом вычисления, заложенным в анализатор: некоторыми приборами (Abbott, ABX, Beckman Coulter и Siemens) параметр выдается в виде CV (в %), другими (Sysmex) — как результат измерения ширины распределения. Однако даже если RDW представлен одинаково, референсные интервалы, полученные на выборке здоровых людей с помощью различных приборов, различаются.

Это объясняется различиями алгоритмов, применяемых для "усечения" распределения — необходимого условия удаления экстремальных значений, следствия артефактов. Для обеспечения сопоставимости результатов различных анализаторов Международный совет по стандартизации в гематологии (International Council for Standardization in Haematology — ICSH) рекомендует использовать статистический метод анализа распределений эритроцитов по клеточному объему на основе референсного лог-нормального распределения и соответствия. Результаты пока не обсуждены, поэтому любое клиническое использование RDW (диагностика, дифференциальная диагностика, мониторинг терапии) должно базироваться на сравнении с эталонными значениями, установленными для каждого прибора.

*Шизоциты (FRDCs).* Шизоциты (пойкилоциты) представляют собой фрагменты, образовавшиеся в результате механического повреждения эритроцитов.

Они могут появиться в крови больных с самой различной патологией: стеноз митрального клапана, эндокардиты, миокардиодистрофия, диссеминированное внутрисосудистое свертывание (ДВС), тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (синдром Мошковиц), гемолитико-уремический синдром и вторичная реакция "трансплантат против хозяина".

Идентификация и определение количества шизоцитов — основа получения важных диагностических критериев. Например, появление обломков эритроцитов при микроангиопатии определяет диагностику и терапию. Вместе с тем шизоциты присутствуют и у здоровых людей. По разным источникам, их количество может варьировать от 0,1 до 0,6%. Обычно их циркуляция подтверждается микроскопией окрашенных мазков периферической крови, но морфологический метод не стандартизован, отличается низкой точностью, особенно при малом количестве этих клеток: при наличии 10% шизоцитов CV достигает 50%. Два коммерческих анализатора (Siemens ADVIA 2120 и Sysmex XE-2100) позволяют подсчитать количество шизоцитов при рутинных исследованиях и в ургентной ситуации. В первом случае анализ проводится в канале RBC/PLT (тромбоциты) и к шизоцитам относятся клетки, объем которых меньше 30 фл, а индекс преломления больше 1,4 (это отличает их от тромбоцитов). Во втором случае анализ выполняется в ретикулоцитарном канале и в разбросе площадей эритроцитов шизоцитами считаются наименьшие фрагменты с низким содержанием РНК.

В обоих случаях шизоциты идентифицируются только на основании размера и концентрации гемоглобина без учета их формы, т. е. в подсчет могут быть включены такие частицы, как малые эритроциты и даже мембранные фрагменты. Опубликованные данные свидетельствуют в пользу корреляции между автоматическим и микроскопическим анализом — от 0,73 до 0,95, даже если имеется тенденция к завышению значений показателя. Зависимая от концентрации шизоцитов точность их автоматического распознавания несколько ниже, чем при микроскопии: при концентрации шизоцитов от 1,42 до 6% CV равен 13 и 2,1%, соответственно. При микроангиопатии отмечена высокая диагностическая чувствительность метода, хотя и определяемая выбранным порогом — от 91,8 до 100%. Специфичность автоматической идентификации колеблется от 20 до 52,2%, т. е. она ниже чувствительности. Таким образом, параметр может быть отрицательным прогностическим критерием, хотя его значения должны быть подтверждены микроскопическими методами.

*Тромбоцитарные индексы.* Циркулирующие в периферической крови тромбоциты разнообразны по размерам, метаболизму и функциональной активности [14]. Самые крупные из них считаются реактивными и продуцирующими большие количества тромбогенных факторов.

Автоматические анализаторы подсчитывают количество тромбоцитов и определяют такие их параметры, как MPV и PDW [4].

Выраженная дисперсия тромбоцитов по объему (лог-нормальное распределение) обусловлена их об-

разованием из фрагментов цитоплазмы мегакариоцитов и из протромбоцитов. Объем тромбоцитов коррелирует с плоидностью мегакариоцитов, но точный механизм этой связи полностью не расшифрован. Увеличение MPV при повышенном обороте кровяных пластинок, по-видимому, стимулируется несколькими цитокинами (интерлейкинами — ИЛ-6 и ИЛ-11, тромбопоэтином), которые влияют на плоидность мегакариоцитов и приводят к образованию крупных и наиболее реактивных тромбоцитов. Неясно, крупными ли тромбоциты отшнуровываются в костном мозге, или их размеры уменьшаются по мере старения.

У здоровых людей отмечена нелинейная обратная корреляция между объемом и количеством циркулирующих тромбоцитов. При тромбоцитозах прослеживается тенденция к снижению MPV. В целом соотношение таково, что масса тромбоцитов остается относительно постоянной в широком интервале количества этих клеток. Исходя из этого, референсные интервалы MPV выражают функцией концентрации тромбоцитов. Широкая дисперсия нормальных значений ограничивает пригодность MPV в качестве скринингового параметра у больных с экстремальными его величинами, например при некоторых наследственных тромбоцитопениях (синдром Вискотта—Олдрича, для которого характерны сниженные значения, или синдром Бернара—Сулье, при котором значения увеличены).

Дифференциальная диагностика приобретенных тромбоцитопений позволяет отличить формы с высокими значениями MPV из-за увеличения продукции тромбоцитов в ответ на запрос периферии при нормальной функции мегакариоцитов (иммунная тромбоцитопеническая пурпура и ДВС) от форм с нормальными или пониженными MPV как следствие дефекта самой продукции тромбоцитов (острый лейкоз, аплазия костного мозга, эффекты химио-, радиотерапии). Параметр MPV также полезен при мониторинге восстановления после тромбоцитопении для выявления раннего увеличения концентрации тромбоцитов, хотя не все анализаторы способны вычислить его при выраженном уменьшении количества этих клеток [10]. Учитывая, что MPV — маркер активации тромбоцитов, некоторые авторы пытаются связать повышение его значений с риском тромбозов. Результаты противоречивы.

У лиц с коронарной болезнью MPV рассматривается как независимый фактор риска инфаркта миокарда и смерти. Некоторые исследования показали, что значение параметра увеличивается при остром инфаркте миокарда, хотя связь между ним и исходом инфаркта является предметом обсуждения. Повышенные MPV описано у 2 больных диабетом с сосудистыми осложнениями, однако в недавнем проведенных исследованиях значимых различий величины параметра у практически здоровых людей и больных диабетом, имеющих или не имеющих сосудистые осложнения не обнаружены [4].

В здоровой популяции отмечена прямая связь показателей MPV и PDW, которая сохраняется при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре и хроническом миелолейкозе, когда значения того и другого параметра увеличены. При гипопластиче-

ской или мегалобластной анемии, как и при химиотерапии, MPV падает, а PDW возрастает. Параметр PDW пригоден для диагностики реактивных тромбоцитозов, которые необходимо дифференцировать от тромбоцитозов эссенциального типа, особенно когда он комбинируется с MPV и количеством тромбоцитов для вычисления дискриминантной функции.

Анализ СВС обычно выполняют с  $K_2$ - или  $K_3$ -солями ЭДТА. Когда кровь смешивают с ЭДТА, 2—4 микронные тромбоциты быстро меняют свою форму диска на форму сфероида, покрытого филаментозными выпячиваниями. Если сфероидная трансформация тромбоцитов изначально изоволюметрическая, через 1—2 ч для равновесия объем тромбоцитов прогрессивно изменяется. Как следствие MPV увеличивается от 7,9% в течение 30 мин до 13,4% через 24 ч, если измеряется кондуктометрическим методом, или уменьшается примерно на 10%, если измеряется оптическим методом. Попытки провести математическую коррекцию этого феномена потерпели неудачу из-за непредсказуемости поведения индивидуальных проб крови.

Таким образом, при использовании ЭДТА MPV не может считаться индексом, отражающим реальную ситуацию. Это относится и к PDW, на которую при анализе на конкретных гематологических анализаторах может влиять концентрация тромбоцитов: тромбоцитопенические пробы создают проблему оценки распределения кровяных пластинок по размеру. Отсутствие стандартов и зависимости как от пробоподготовки, так и от метода измерения обуславливают различия референсных интервалов и затрудняют сравнение получаемых результатов. Поэтому, несмотря на огромное количество публикаций и ежедневную практику анализа тромбоцитарных индексов, они пока относятся к категории экспериментальных.

Оба метода оценки общего количества тромбоцитов — визуальный и компьютерный анализ изображений, — коррелируют со значениями этого параметра, полученными на гематологическом анализаторе Sysmex XE 2100 [4]. В то же время было показано, что система DM96 не может быть использована при скрининговых исследованиях: анализируются поврежденные участки мазков, не разделяются агрегаты, не отделяются изображения других клеток.

*Фракция незрелых тромбоцитов.* Разнообразие циркулирующих в периферической крови тромбоцитов определяется скоростью продукции, оборота, активации и удаления этих клеток [14]. Юные тромбоциты отличаются от зрелых клеток большей реактивностью и содержанием РНК [15]. Их количество соответствует тромбоцитопоэзу, увеличивается, когда процесс ускоряется, и уменьшается, когда он затормаживается. На моделях животных показано, что ретикулярные тромбоциты остаются в кровотоке приблизительно от 24 до 36 ч, по истечению которых в клетках прогрессивно деградирует РНК, а клеточный объем сокращается. Статистически значимое ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем увеличение количества незрелых тромбоцитов у первичных доноров тромбоцитов возникает только в динамике выполнения процедуры тромбоцитафереза, а у кадро-

вых доноров сохраняется в течение 14 дней отдыха между донациями [16].

Подсчет ретикулярных тромбоцитов, основанный на использовании проточных цитометров и связывающихся с РНК флюоресцентных красителей, зависит от условий проведения анализа, причем референсные величины варьируют в широких пределах: от менее 3 до 20% от общего количества тромбоцитов.

Несмотря на очевидные проблемы стандартизации (отсутствие референсного метода и контрольного материала), существует множество клинических приложений для определения значений ретикулярных тромбоцитов при диагностике и мониторинге.

Наиболее полезен тест (чувствительность и специфичность — более 95%) при дифференциальной диагностике тромбоцитопений, возникающих вследствие деструкции тромбоцитов, циркулирующих в периферической крови, или острой кровопотери (количество незрелых тромбоцитов увеличивается), от тромбоцитопений, связанных с несостоятельностью костного мозга (гипо-, аплазия, эффект химиотерапии), при которых доля ретикулярных тромбоцитов не отличается от контрольных значений. Увеличение пропорции ретикулярных тромбоцитов, таким образом, — ранний индикатор деструкции тромбоцитов у больных иммунной тромбоцитопенической пурпурой (ИТП) и синдромом Мошковиц. Подъем значений показателя после полихимиотерапии происходит за 1—3 дня до восстановления общего числа тромбоцитов. Величина фракции незрелых тромбоцитов, равная 7,7%, считается наилучшим фоновым значением при диагностике иммунной тромбоцитопенической пурпуры и фазы восстановления кроветворения после химиотерапии: чувствительность 86,8%, специфичность 92,6%. Для прогнозирования восстановления кроветворения полезнее параметр MPV: повышение его значений опережает подъем общего числа тромбоцитов в среднем на 4—4,5 дня. Возможность предсказать время регенерации тромбоцитов позволяет сократить число профилактических трансфузий тромбоцитов.

Увеличение количества ретикулярных тромбоцитов может быть сигналом риска тромбоза при тромбоцитозах как реактивных, так и обусловленных хроническими миелодиспластическими заболеваниями. Более того, низкая частота этих клеток при циррозе печени, видимо, согласуется с подавлением функции костного мозга, из чего можно сделать вывод, что тромбоцитопения при этой патологии обусловлена не только секвестрацией тромбоцитов в селезенке.

Недостатки стандартизации метода и потребность в специально подготовленных кадрах для проведения проточной цитофлюориметрии ограничивают подсчет ретикулярных тромбоцитов в специализированных лабораториях. Разработка специального программного обеспечения и флюоресцентных красителей для анализаторов Sysmex серии XE позволила определять параметр IPF в ретикулоцитарном канале и регистрировать его значения в реальном времени. Измерения стабильны в приготовленных на ЭДТА пробах крови в течение, по крайней мере, 12 ч. Зависимая от концентрации ошибка колеблется от 4,9 до 22%, а референсный

интервал для здоровых взрослых людей составляет 1—8%. Кроме того, оказалось, что компьютерная оценка цитохимической PAS-реакции тромбоцитов (анализ клеточных изображений) может дополнить популярный, но дорогостоящий метод исследования фракции незрелых тромбоцитов с помощью Sysmex XE 2100: увеличение значений параметра IPF (в %) статистически коррелирует с PAS-позитивностью незрелых тромбоцитов ( $r_s = 0,61$ ;  $p = 0,001$ ) [17].

Таким образом, благодаря технической революции созданы гематологические анализаторы, способные с высокой точностью оценивать не только известные характеристики клеток крови, но и вычислять ранее не известные индексы, в том числе ретикулоцитарные и тромбоцитарные. Более того, формула крови, определяемая современными приборами, вышла за пределы пяти нормальных популяций лейкоцитов. В свою очередь новая техника диктует необходимость специальной подготовки персонала клинических лабораторий, глубоких знаний лабораторной гематологии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В. С., Богомолова Н. В., Волков А. С. Автоматизация гематологического анализа. Интерпретация показателей гемограммы. Саратов: изд-во Саратовского медицинского института; 2008.
2. Клетки крови. Современные технологии их анализа. Козинец Г. И., Погорелов В. М., Шмаров Д. А. и др. М.: Триада-Фарм; 2002.
3. Луговская С. А., Почтарь М. Е., Долгов В. В. Гематологические анализаторы. М.; Тверь: Триада; 2007.
4. Buttarello M., Plebani M. Automated blood cell counts state of the art. Am. J. Clin. Pathol. 2008; 130: 104—116.
5. Погорелов В. М., Иванова И. А., Верденская Н. В. и др. "АСПЕК" — отечественная система автоматической микроскопии мазков периферической крови. Лаборатория 1999; 4: 16—17.
6. Шмаров Д. А., Козинец Г. И. Лабораторно-клиническое значение проточно-цитометрического анализа крови. М.: МИА; 2004.
7. Погорелов В. М., Краснова Л. С., Чаньева М. И. и др. Геометрия прегемолитических пойкилоцитов в стандартных цитосетрифугатах крови на предметных стеклах. Гематология и трансфузиология 2008; 6: 22—26.
8. Луговская С. А., Козинец Г. И. Гематология пожилого возраста. М.: Триада; 2010.
9. Kono M., Kondo T., Takagi Y. et al. Validation of gating and leukocyte classification on Sysmex XE series automated cell counters. Sysmex J. Int. 2010; 20 (1): 1—5.
10. Povall A., Kendrick C. J. Estimated platelet and differential leukocyte counts by microscopy, Sysmex XE-2100 and CellaVision™ DM96. N. Z. J. Med. Lab. Sci. 2009; 63 (1): 3—10.
11. Schaefer M., Rowan R. V. The clinical relevance of nucleated red blood cell counts. Sysmex J. Int. 2000; 10 (2): 59—61.
12. Davis B. H., Bigelow N. C., van Hove L., Dumlér F. Evaluation of automated reticulocyte analysis with immature reticulocyte fraction as a potential outcomes indicator of anemia in chronic renal failure patients. Lab. Hematol. 1998. 4: 169—175.
13. Луговская С. А., Почтарь М. Е. Ретикулоциты. М.; Тверь: Триада-Х; 2006.
14. Javela K. Laboratory analyses for evaluation of platelet disorders and platelet concentrates. Helsinki: Academic dissertation; 2006.
15. Ingram M., Coopersmith A. Reticulated platelets following acute blood loss. British J. Haematol. 1969; 17: 225—229.
16. Погорелов В. М., Бескоровайнова В. Ю., Лазаренко М. И. и др. Незрелые тромбоциты в периферической крови доноров до и после тромбоцитафереза. Вестник службы крови 2011; 2: 29—33.
17. Pogorelov V. M., Beskorovainova V. Ju., Chanieva M. I. et al. Periodic acid-Schiff (PAS) staining of immature platelets in donors. Platelets 2012; 23 (1): 51—59.

Поступила 16.01.12