

Зенина М.Н.¹, Шилова Е.Р.¹, Черныш Н.Ю.²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», г.Санкт-Петербург.

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

СОВРЕМЕННЫЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ АНАЛИЗАТОРЫ – ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ

Резюме. В статье рассматриваются новые возможности исследования показателей общего анализа крови (ОАК) с помощью современных гематологических анализаторов. Данные, полученные на гематологических анализаторах, помогают в диагностическом поиске и выборе тактики лечения. Современные гематологические анализаторы с высокой точностью оценивают известные характеристики клеток крови и вычисляют

новые ретикулоцитарные и тромбоцитарные индексы. В лекции оцениваются возможности наиболее часто используемых автоматических анализаторов.

Ключевые слова: гематологический анализатор, общий анализ крови, фракции незрелых ретикулоцитов и тромбоцитов

Zenina M.N.¹, Shilova E.R.¹, Chernysh N.Y.²

²Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St.Petersburg

²Almazov National Medical Research Center, St.Petersburg

MODERN HEMATOLOGICAL ANALYZERS – OPPORTUNITIES AND LIMITATIONS

Abstract. The article discusses new possibilities for the study of blood parameters using modern hematological analyzers. The data obtained on hematological analyzers help in the diagnostic search and the choice of treatment tactics. Modern hematology analyzers evaluate the known characteristics of blood cells and calculate new reticulocyte and platelet

indices with high accuracy. The capabilities of the most commonly used automatic analyzers are evaluated in this lecture.

Key words: hematology analyzer, complete blood count, fractions of immature reticulocytes and platelets.

Эра автоматизации гематологических исследований началась в двадцатые годы прошлого столетия, когда доктор Wintrobe предложил количественно определять содержание лейкоцитов, тромбоцитов, гематокрита и концентрации гемоглобина с использованием центрифуги и стеклянной трубки [1]. Этот метод существует и сегодня под названием QBS (Quantitative Buffy Coat). В тридцатые – пятидесятые годы прошлого века число элементов крови определяли фотоэлектрически (Moldavan, 1934), оптически-турбидиметрически (Around, 1945), измерением рассеянного света (Langercrantz, 1950; Hodkinson, 1953). Начало же массовой автоматизации исследований в гематологии положил в 1956 г доктор Coulter. Будучи в конце 40-х годов XX века служащим Военно-морского флота США, Wallace H. Coulter разработал импедансометрический метод определения количества и размера частиц [2]. Главным образом он был предназначен для быстрого подсчета клеток крови путем измерения изменения электропроводности их суспензии в проводящей жидкости, проходящей через отверстие малого диаметра. Счетчик Культера Model A, разрабо-

танный братьями Wallace H. и Joseph R. Coulter и вышедший в продажу в 1954 году, стал первым коммерческим прибором подобного типа, предназначенным для гематологических исследований. Учитывая тот факт, что эти приборы были первыми счетчиками и анализаторами размера частиц, они сыграли главную роль в развитии технологии клеточного анализа. С тех пор продолжается непрерывный процесс эволюции и развития этого метода. В настоящее время практически все гематологические анализаторы используют принцип импедансометрии (Культера). Клетки считаются в изотоническом растворе, что исключает деформацию и неправильное определение их размера. Этот метод позволяет определить большинство эритроцитарных показателей, связанных с объемом клетки. В литературе этот способ обозначают DC (direct current- измерение сопротивления).

По количеству измеряемых параметров и степени дифференциации лейкоцитов гематологические анализаторы на несколько классов. Приборы, измеряющие порядка десяти и менее параметров, без дифференциации лейкоцитов, практически не встречаются уже на практике).

Следующий класс гематологических анализаторов, или 3-diff – это автоматические гематологические анализаторы, определяющие до 20 параметров, включая расчетные показатели красной крови и тромбоцитов, гистограммы распределения лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов по объему, а также частичную дифференцировку лейкоцитов на три популяции - лимфоциты, моноциты (средние клетки) и гранулоциты. Приборы этой группы используют для подсчета клеток только импедансным методом, а гемоглобин измеряют фотометрическим методом.

Более сложные технологически 5 diff анализаторы позволяют проводить развернутый анализ крови, в том числе полную дифференцировку лейкоцитов по 5-ти параметрам (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, лимфоциты и моноциты), получать гистограммы распределения лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов по объему и скатерограммы. Получить эти показатели стало возможно с использованием наряду с методом Культера новых, усовершенствованных технологий, таких как, например, радиочастотный анализ (RF – radio frequency), который является разновидностью кондуктометрического метода и используется на некоторых гематологических анализаторах. При прохождении апертурного отверстия объектом в токе высокой частоты также возникают сигналы, амплитуда которых зависит от размеров ядра, плотности ядерного матрикса и цитоплазматических включений. Эти сигналы в большей степени отражают характер внутренней структуры клетки, по сравнению с классическим кондуктометрическим измерением. В фотооптическом методе (регистрация светорассеяния и поглощения) электрическое поле заменено использованием источника света (чаще всего лазерным). Оптические детекторы основаны на пропускании суспензии клеток по капилляру через сфокусированный луч света, поступающий от лазера или лампы. В момент пересечения луча клеткой происходит поглощение или рассеяние света, которое обусловлено клеточным размером, формой, плотностью, окрашиванием и гранулярностью внутриклеточных структур. Рассеянный свет от клеток и частиц состоит из дифракционных, рефракционных и отражающих компонентов. Светорассеяние для характеристики клеток измеряется разными путями. При малых углах относительно оси падающего света преобладает дифракция. Рассеяние вблизи первого минимума переднего светового дифракционного изображения используется для измерения размеров объекта. С возрастанием угла рассеивания увеличивается значение рефракционных эффектов. Поскольку рефракционные лучи пересекают внутренности клетки, регистрируемые при этом сигналы в большей степени отражают внутриклеточную микроструктуру. Преломление

зависит от поглощения и может применяться для измерения способности клеток окрашиваться поглощающими красителями. Ослабление осевого света (поглощение) также используется для проточного анализа.

Для дифференцировки основных групп гранулоцитов используется измерение активности пероксидазы в лейкоцитах (PEROX channel), когда определяют одновременно абсорбцию и дисперсию видимого света. Эти два сигнала образуют картину разделения клеток, которые отличаются друг от друга объемом и содержанием пероксидазы. Наряду с методом PEROX употребляется также метод BASO. Благодаря использованию специфического лизиса базофилов, в отличие от других лейкоцитов, не теряют цитоплазмы и считаются отдельно. В канале BASO измерение дисперсии лазерного света под углом 2-3° и 5-15° позволяет различать клетки в зависимости от формы ядра.

Некоторые производители пошли по пути использования флуоресцентных красителей, что связано с тем, что флуоресцентное излучение прямо пропорционально специфическим клеточным компонентам. Концентрация красителя для исследований очень низкая, при этом нефлуоресцирующие соединения могут становиться флуоресцирующими при взаимодействии с внутриклеточными структурами или ферментами. Изучение поляризации флуоресценции позволяет охарактеризовать такое важное биологическое свойство как вязкость, или текучесть мембран, которое отражает функциональное состояние клетки. При поляризации лазерного излучения флуоресцирующего излучения и интенсивности поляризованного света уменьшается. Поляризация светорассеяния используется в специализированной технологии «MAPSS» (поляризация многоугольного светорассеяния), применяемой в гематологических анализаторах для дифференцировки морфологических элементов крови.

Еще один метод, прекрасно зарекомендовавший себя для измерения и дифференцировки клеток крови, это, так называемый, метод трехмерного анализа лейкоцитов (VCS). Принцип определения лейкоцитов использует три особенности клеток, анализируемые одновременно: объем (Volume), электропроводность (Conductivity) и дисперсия лазерного света (Scatter). Основные параметры, оцениваемые по этому методу – это объем клеток, измерение импеданса низкой частоты (DC), кондуктометрическое измерение высокой частоты (RF) и дисперсия света (DF1).

Наиболее современные 5 diff+ и 6 diff анализаторы, располагающие расширенными возможностями – это сложные аналитические системы, выполняющие не только развернутый анализ крови с дифференцировкой лейкоцитов по пяти параметрам, но и подсчет и анализ ретикулоцитов, неко-

торых субпопуляций лимфоцитов и т.д. При этом наблюдается интеграция проточной цитометрии с гематологическими анализаторами с целью увеличения специфичности методов выявления основных количественных характеристик морфологии клеток крови и дифференциации клеток с определением их ростковой принадлежности. В таких анализаторах используют моноклональные антитела для дифференциации лимфоцитов (CD4, CD8), ретикулоцитов (CD73), тромбоцитов. Такие приборы при необходимости комплектуются блоком для автоматического приготовления и окраски мазков из заданных образцов крови [3].

Применение многопараметровых гематологических анализаторов позволяет автоматизировать процесс подсчета клеток крови и получить дополнительные, высокоинформативные характеристики клеток крови. Однако следует принимать во внимание различие аналитических возможностей различных типов гематологических анализаторов, ограниченную способность некоторых моделей анализаторов проводить полную дифференцировку лейкоцитов. В основе работы анализаторов 3diff лежит кондуктометрический метод. Анализаторы 5diff и более используют в своей работе комбинации разных методов. И гематологические анализаторы, дифференцирующие лейкоциты на три популяции, могут использоваться только для динамического наблюдения за состоянием крови пациентов, но не для постановки диагноза, требующего подсчет формулы крови.

В гематологических анализаторах всех классов представлены показатели общего анализа крови количественные эритроцитарного, лейкоцитарного и тромбоцитарного звеньев. Однако, набор параметров отличаются от класса и производителя оборудования.

К эритроцитарным параметрам относятся следующие измеряемые показатели:

- Количество эритроцитов (RBC - red blood cell) - $\times 10^9/\text{л}$
- концентрация гемоглобина (Hb, HGB, hemoglobin) - г/л
- гематокрит (Hct, HCT, hematocrit) - %

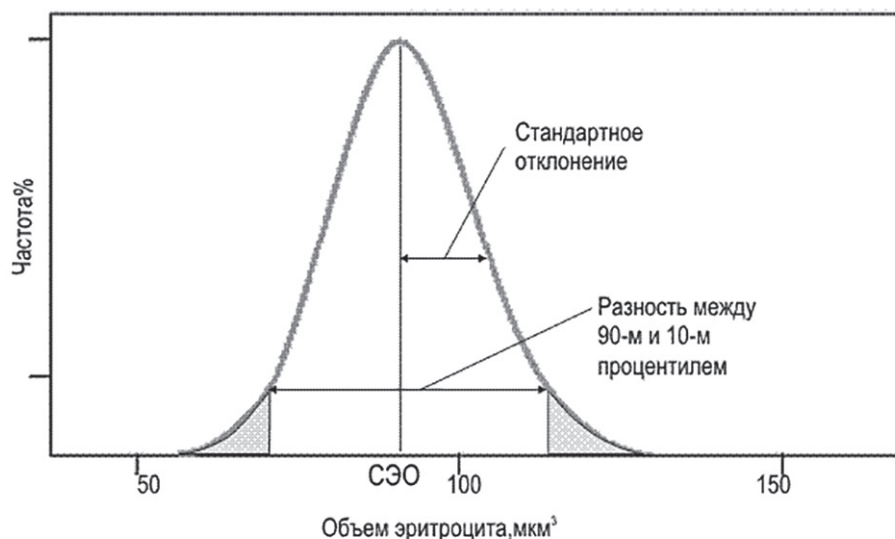
Эритроцитарные индексы, относящиеся к расчетным параметрам это MCV, MCH и MCHC, где MCV - средний объем эритроцита (mean corpuscular volume) измеряется в мкм^3 или фемтолитрах (фл), MCH - среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците (mean corpuscular hemoglobin) и MCHC - средняя концентрация гемоглобина в эритроците (mean corpuscular hemoglobin concentration). По MCH, измеряемому в абсолютных единицах (норма 27-31 пг) анемии делят на нормо-, гипо- и гиперхромные. MCV меняется в течение жизни и у новорожденных достигает 128 фл, далее в первую неделю жизни снижается до

100, к году составляет 77-79 фл и в возрасте 4-5 лет нижняя граница нормы (80 фл) стабилизируется. MCV у взрослых ниже 80 фл оценивается как микроцитоз, выше 95 фл - как макроцитоз. Концентрация гемоглобина (MCHC) внутри эритроцита в норме составляет 33-37 г/дл. Это самый стабильный гематологический показатель. Любая неточность, связанная с определением гемоглобина, гематокрита, MCV, приводит к увеличению MCHC, поэтому этот параметр чаще всего используется как индикатор ошибки прибора, или ошибки, допущенной при подготовке пробы к исследованию. Гематологическая гистограмма - это графическое изображение распределения различных популяций клеток по их количеству и размеру (объему). Гистограмма распределения эритроцитов по объему RDW (red cell distribution width) - это показатель анизоцитоза эритроцитов. Рассчитывается как коэффициент вариации среднего объема эритроцитов (норма 11,5 - 14,5%).

Параметр, получаемый из гистограмм RDW-CV - это коэффициент вариации отклонения размера эритроцитов от среднего значения (68,26% всей области распределения эритроцитов). Рассчитывается по формуле $\text{RDW-CV} (\%) = \text{SD} / \text{MCV} \times 100$, где SD - стандартное среднее квадратичное отклонение. На этот показатель влияет MCV, поэтому при микроцитозе, так и при макроцитозе отмечается тенденция к увеличению RDW-CV.

В некоторых гематологических анализаторах имеется еще один расчетный показатель - RDW-SD, который независим от MCV и представляет собой прямое измерение ширины эритроцитарной гистограммы на уровне 20% пика кривой. При этом высота пика RBC- гистограммы принимается за 100%. Норма RDW-SD - 42 ± 5 фл. Клинически значимое значение $\text{RDW-SD} > 60$ фл. Оба показателя RDW определяют вариабельность эритроцитов по объему. Повышение RDW предполагает присутствие смешанной популяции клеток (нормоциты и микроциты, или макроциты и нормоциты). Более чувствительным показателем при наличии минорной популяции макроцитов или микроцитов является RDW-SD, так как он измеряет нижнюю часть кривой распределения эритроцитов по объему. Показатель RDW характеризует колебания объема клеток внутри популяции и не связан с абсолютной величиной объема эритроцитов. При наличии в крови популяции эритроцитов с измененным, но достаточно однородным размером (например, микроциты) значения RDW могут быть в пределах нормы (11,5 - 14,5%). При выраженном анизоцитозе эритроцитов показатель MCV, характеризующий средний объем всей клеточной популяции, является нормальным, а RDW будет повышенным [4].

Рисунок 1. Эритроцитометрическая кривая (схема по Harrison).



Ширину эритроцитометрической кривой можно охарактеризовать с помощью коэффициента вариации (отношение стандартного отклонения к среднему эритроцитарному объему) и разности между 90-м и 10-м процентилем (рисунок 1).

Таким образом, используя параметры гематологических анализаторов класса 3 diff, мы можем определить характер изменений эритроидного ростка. При снижении гемоглобина – какая именно анемия у пациента – микроцитарная, нормоцитарная, или макроцитарная, гипо-, гипер- или нормохромная. К сожалению, никакие изменения формы эритроцитов приборы данного класса показывать не могут. В случае, если у пациента имеется несоответствие объема и диаметра клеток (при врожденной микросфероцитарной анемии), приборные значения не показывают изменений эритроцитов и оценить проблему можно только при исследовании окрашенных препаратов под микроскопом. Ограниченные возможности гематологических анализаторов этого класса не позволяют сократить объем выполняемых микроскопических исследований, и основная часть диагностики приходится на микроскопию, выполняемую врачами.

В анализаторах класса 5diff представлен один из новых эритроцитарных индексов CHCM (corpuscular hemoglobin concentration mean), определяющий среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (г/дл) получаемый уже непосредственно прямым измерением. Распределение клеток по содержанию гемоглобина измеряется, фиксируется гистограмма и вычисляются два параметра – средняя концентрация гемоглобина в клетке, которая в отличие от MCHC обозначается CHCM (cellular hemoglobin concentration mean) и ширина распределения клеток по концентрации гемоглобина (HDW – hemoglobin distribution width).

К измеряемым показателям относится также CH – содержание гемоглобина в эритроцитах (cellular hemoglobin content pg). И еще один из новых показателей, это HDW, или ширина распределения концентрации гемоглобина в эритроцитах hemoglobin concentration distribution width pg/dL.

В настоящее время в высокотехнологичных анализаторах появились новые эритроцитарные показатели, такие как, подсчет фрагментов эритроцитов, или FRC (fragmented cells (RBC-F), которые имеют особое значение в оценке тромботических микроангиопатий. Определяется также процент гипохромных эритроцитов (Hуро%), что используется в диагностике гипохромных анемий, особенно при латентном дефиците железа и мониторинге терапии рекомбинантным эритропоэтином. Наличие более 10% гипохромных эритроцитов является индикатором железодефицитного состояния.

Для оценки регенераторной способности системы кроветворения необходимо исследование ретикулоцитов. Использование современных автоматизированных систем позволяет с достаточной степенью надежности определить ряд параметров, позволяющих количественно оценить степень расстройств эритропоэза, в том числе, на стадии созревания ретикулоцитов. Для автоматизированного анализа ретикулоцитов используют метод проточной цитометрии. В различных анализаторах используются разные реагенты и принципы измерения ретикулоцитов, такие как нефлюорохромная краска новый метиленовый синий; флуоресцирующие красители (тиазол оранжевый, тиофлавин Т, полимитин, цианин CD4K530, акридин оранжевый, оксазин 750 и др.). Анализ ретикулоцитов можно проводить и на проточных цитофлуориметрах с использованием моноклональных антител, меченых флуорохромом (BD Retic-Count).

Автоматизированный подсчет ретикулоцитов отличается значительно большей точностью (исследуются более 30000 эритроцитов) и воспроизводимостью (коэффициент вариации составляет около 6%), обеспечивает возможность получения новых показателей, оценивающих степень зрелости ретикулоцитов по измерению в них содержания РНК. Анализатор позволяет определять: относительное (RET%) и абсолютное (RET#) количество ретикулоцитов, индекс созревания ретикулоцитов (IMM% или IRF), средний объем ретикулоцитов (MRV), а также разделять ретикулоциты на 3 класса по степени зрелости:

- RET L — ретикулоциты с низким содержанием РНК, наиболее зрелые

- RET M — ретикулоциты со средним содержанием РНК

- RET H — ретикулоциты с высоким содержанием РНК, самые молодые.

В 1989 году Б. Дэвис (Davis B.H.) и Н. Бигелоу (Bigelow N.C.) предложили индекс зрелости ретикулоцитов, или фракцию незрелых ретикулоцитов (IRF) в зависимости от содержания в ретикулоцитах РНК, как параметр, отображающий эффективность эритропоэза [5].

IRF (Immature Reticulocyte Fraction) является показателем степени зрелости ретикулоцитов и составляет в норме 2-12%. Эта фракция объеди-

няет RET M и RET H и характеризуется также такими показателями, как HLR% (High Light Scatter Reticulocyte) - относительное количество ретикулоцитов с высоким светорассеиванием (количество незрелых ретикулоцитов) и HLR# (HighLight Scatter Reticulocyte) — абсолютное количество ретикулоцитов с высоким светорассеиванием.

Показатели IRF используются для мониторинга костномозговой регенерации после трансплантации костного мозга, интенсивной химиотерапии, терапии дефицита железа, витамина B12, или фолиевой кислоты, определения степени токсического воздействия химиопрепаратов на костный мозг, дифференциальной диагностики анемий, детекции апластических кризов.

Один из методов, используемых для анализа ретикулоцитов в анализаторах, основан на уже упомянутой выше трехмерной VCS технологии. Для окраски ретикулоцитов применяется краситель, идентифицирующий РНК в ретикулоцитах (ReticPrep реагент А, модифицированный новый метиленовый синий), и стабилизирующий фиксирующий реагент (ReticPrep реагент В) – закисленный гипотонический раствор, вызывающий набухание эритроцитов до сферической формы без их фрагментации и обеспечивающий выход гемоглобина во внешнюю среду.

Таблица 1. Референтные значения ретикулоцитарных показателей (анализаторы компании Beckman Coulter)

Параметры	Единицы измерения	Референтные значения (Beckman Coulter)
Retic %	%	0,45 – 2,28
Retic # (абсолютное количество ретикулоцитов)	$\times 10^6/\text{мклL}$	0,02 – 0,11
IRF (содержание незрелых ретикулоцитов)		0,163 – 0,362
MRV (средний объем ретикулоцитов)	fl	102,73 – 124,89
MSCV (средний объем сферулированных ретикулоцитов)	fl	84 – 104
HLR % (относительное количество ретикулоцитов с высоким светорассеиванием)	%	0,07 – 0,71
HLR# (абсолютное количество ретикулоцитов с высоким светорассеиванием)	$\times 10^6/\text{мкл}$	0,003 – 0,050

Другим методом анализа ретикулоцитов является технология MAPSS™ (многоугловое поляризационное разделение пучка) и трехцветная флуоресцентная технология. С помощью этой технологии можно проводить полный анализ ретикулоцитов и их классификацию, а также измерять индекс молодых ретикулоцитов (IRF). Результаты представляются с пороговой меткой, позволяющей четко разделять взрослые и молодые ретикулоциты. Значение IRF представляется в процентном соотношении к общему числу ретикулоцитов [6].

Для получения параметров ретикулоцитов

нашел применение также метод проточной цитофлуориметрии. Флуоресцентный краситель полиметин избирательно окрашивает РНК ретикулоцитов и позволяет использовать для их анализа диодные лазеры. В проточной кювете клетки пересекают луч полупроводникового лазера длиной 633 нм. При этом происходит рассеивание луча под большим и малым углами и возбуждение флуоресцентного красителя. При анализе полученных сигналов измеряются отклонение лазерного луча под малым углом (прямое светорассеивание FSC), зависящее от размера клетки, отклонение лазерного

В ПОМОЩЬ ПРАКТИЧЕСКОМУ ВРАЧУ

луча под углом до 90° (боковое светорассеивание SSC) зависящее от плотности структур и детектирование флуоресцентного сигнала (SFL), который регистрируется параллельно с боковым светорассеиванием и позволяет судить о содержании РНК в клетках. При этом в каждом образце просчитывается более 30000 клеток. Используемая технология обеспечивает точный подсчет ретикулоцитов даже при их предельно низких концентрациях. Ретикулоциты дифференцируются в зависимости от степени зрелости, размерам и средней величине

ну RET-Y. Диапазон значений RET-Y ch 1630-1860 AU (или 171,0 – 196,3 в зависимости от модификации прибора). Согласно данным S. Franck, J. Linszen, M. Messinger и L. Thomasa, используя регрессивную формулу $y = 5.5569 \times e^{0.001x}$ эти значения соответствуют их гемоглобиновому эквиваленту RET-He с референтными значениями 28,2–35,7 pg.

Референтные значения ретикулоцитарных показателей при использовании различных гематологических анализаторов приведены в таблицах 1 и 2.

Таблица 2. Референтные значения ретикулоцитарных показателей (анализаторы компании Sysmex – XT – 2000i)

Параметры	Единицы измерения	Референтные значения (Sysmex – XT – 2000i)
Retic %	%	0,59 – 2,07
Retic# (абсолютное количество ретикулоцитов)	10^{12} x/L	22,4– 93,5
IRF (содержание незрелых ретикулоцитов)		2,1 – 17,5
MFR		1,8 – 14,4
HFR		0 – 2,4
RET – Ych*	AU	171,0 – 196,3
RET – He	pg	28,2 – 36,4

*RET-Ych - 1630-1860 AU (или 171,0 – 196,3 в зависимости от модификации прибора)

Используемая технология позволяет определить такой уникальный параметр, как содержание гемоглобина в ретикулоцитах CHr, с референтными значениями 28–35 pg.

Использование в диагностической практике новых ретикулоцитарных показателей в сочетании с эритроцитарными индексами и результатами традиционных морфологических исследований мазков периферической крови значительно сужают выбор из возможных нозологических форм, для разграничения которых используют дополнительные исследования. Кроме того, ретикулоцитарные параметры позволяют проводить мониторинг состояния пациентов и эффективности проводимой терапии [7].

Клинический анализ крови невозможен без определения параметров лейкоцитов (WBC – white blood cells, $\times 10^9$ /л). Рассмотрим, какие лейкоцитарные параметры получают на гематологических анализаторах различных классов. В приборах 3 diff измерение числа лейкоцитов проводится после полного лизиса эритроцитов. Все частицы размером более 35 фл считаются как лейкоциты. Тромбоциты, размер которых меньше порогового значения 35 фл, исключаются из подсчета. Коэффициент вариации (CV) при автоматическом определении этого показателя составляет 2–3%. Количество параметров лейкоцитарной формулы, определяемое на гематологическом анализаторе, варьирует от 6 до 10 с учетом относи-

тельного и абсолютного количества клеток. Гематологические анализаторы 3diff дифференцируют лейкоциты на три популяции (лимфоциты, средние клетки и гранулоциты) и определяют как относительное, так и абсолютное их содержание. В гематологических анализаторах 5 diff подсчитываются все 5 классов лейкоцитов, встречающихся в норме: нейтрофилы, лимфоциты, моноциты, эозинофилы и базофилы. При этом методы, используемые в приборах разных производителей, отличаются. Главным же преимуществом автоматического подсчета лейкоцитарной формулы является повышение точности результатов за счет измерения большого количества клеток по сравнению с микроскопическим исследованием [8].

Технология проточной цитометрии, используемая в гематологических анализаторах 5 diff+ и 6 diff, позволяет “заглянуть” внутрь клетки, когда по количеству нуклеиновых кислот можно судить об их метаболической активности. Это позволило разработать новые параметры, позволяющие представить количественную оценку реактивных изменений системы кроветворения пациента в ответ на воспаление и инфекции: статус активации нейтрофилов (NEUT-RI, NEUT-GI), незрелые гранулоциты (IG) и активированные лимфоциты (RE-LYMP, AS-LYMP).

Все гематологические анализаторы, от самых простых до сложных, определяют абсолютное чис-

ло тромбоцитов (PLT – platelet, $\times 10^9/\text{л}$). Подсчет тромбоцитов гематологическими анализаторами проводится без предварительного лизиса эритроцитов, на основании различий в размере тромбоцитов и эритроцитов. Это может создавать проблемы при дифференцировке больших форм тромбоцитов (макротромбоцитов) и сравнимых с ними по объему эритроцитов (микроцитов) или их фрагментов (шизоцитов), а также фрагментов цитоплазмы лейкоцитов (клеточный дебрис). В большинстве приборов оценивают такие параметры, как средний объем тромбоцитов (MPV, фл), ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW, %), тромбокрит (PCT, %). В то же время, гематологические анализаторы различных фирм отличаются по набору дополнительных критериев оценки тромбоцитарного звена. Современные технологии (кондуктометрический метод с гидродинамическим фокусированием, проточная цитометрия), используемые в высокотехнологичных гематологических анализаторах, позволяют получить более подробную информацию о клеточных популяциях в виде таких параметров, как количество больших тромбоцитов (L-PLT); процент объема крупных тромбоцитов (> 12 фл) от всего объема тромбоцитов (P-LCR); показатель фракции незрелых тромбоцитов (IPF); средняя концентрация компонентов тромбоцитов (MPC, г/дл), средняя сухая масса тромбоцитов (MPM, пг), ширина распределения тромбоцитов по концентрации компонентов (PCDW, г/дл), ширина распределения тромбоцитов по сухой массе (PMDW, пг). Данные параметры можно интерпретировать только при строгом соблюдении преаналитического этапа (правильный выбор антикоагулянта, время выполнения исследования и т.д.) и могут оказать большую помощь клиницистам в оценке тромбоцитарного звена [9].

Следует помнить о возможных ошибках при подсчете тромбоцитов - ложном завышении при выраженном микроцитозе эритроцитов, криоглобулинемии, гемолизе, наличие фрагментов эритроцитов и лейкоцитов. Ложное занижение получают при агрегации тромбоцитов, тромбоцитарном "сателлизме" (прилипанию тромбоцитов к лейкоцитам), наличии гигантских тромбоцитов, агрегации эритроцитов, тромбообразовании, взятии крови с гепарином, гипертромбоцитоз (более $1000 \times 10^9/\text{л}$).

У некоторых пациентов может происходить спонтанная агрегация тромбоцитов, или, так называемая, ЭДТА-зависимая псевдотромбоцитопения.

Средний объем тромбоцитов MPV (mean platelet volume фл) в норме варьирует от 7,4 до 10,4 фл и имеет тенденцию к увеличению с возрастом. В течение первых двух часов после взятия крови с ЭДТА происходит «набухание» тромбоцитов с изменением их объема и соответственно увеличением MPV. При наличии макротромбоцитов порог измерения для тромбоцитов может быть превышен, и они не попадают в счет, что приводит к занижению MPV.

Небольшие фрагменты эритроцитов и лейкоцитов могут препятствовать измерению MPV. Тромбоциты могут быть в агглютинатах эритроцитов, что приведет к ошибочным результатам MPV. Подобные ошибки можно проверить по аномальным значениям MCH и MCHC. MPV рассматривается как маркер интенсивности тромбоцитопоза, поскольку молодые пластинки более крупные, или как маркер агрегационной активности тромбоцитов, так как увеличивается при их активации и превращении из дисков в сферы с псевдоподиями на начальных этапах агрегации. Несмотря на большое количество исследований, свидетельствующих о высокой прогностической ценности MPV при различных состояниях, следует учитывать особенности трактовки результатов измерения данного параметра. Во многих исследованиях показано, что MPV не имеет одного интервала нормальных значений, а существует нелинейная, обратная зависимость между MPV и количеством тромбоцитов у здоровых лиц с нормальным их числом. Поэтому некоторые авторы рекомендуют при решении вопроса о соответствии величины MPV нормальным значениям вместо одного интервала для каждого прибора разработать номограмму, которая отражает указанную зависимость.

Другими параметрами анализаторов, связанными с размером тромбоцитов, являются L-PLT – число крупных тромбоцитов и P-LCR – процент объема крупных тромбоцитов (> 12 фл) от всего объема тромбоцитов. Большие тромбоциты, вероятно, являющиеся молодыми формами, дают более высокий сигнал флюоресценции. Процент L-PLT рассчитывается от общего количества тромбоцитов и предположительно является индикатором активности тромбоцитопоза в костном мозге. Общее число тромбоцитов включает суммарный счет обычных и крупных тромбоцитов. При увеличении числа L-PLT возрастает риск тромбообразования.

На анализаторах 5 diff + доступен показатель IPF (фракции незрелых тромбоцитов), который рассчитывается по соотношению объема и содержанию нуклеиновых кислот в клетках, меченных полиметином (проточная цитометрия). Установлено, что данный параметр имеет одинаковые референтные интервалы в разных лабораториях, что делает его более удобным для клинического использования. В целом, показатели L-PLT и IPF являются более чувствительными параметрами, чем MPV, так как не зависят от распределения объемов по различным значениям.

Для анализа степени однородности популяции тромбоцитов используют параметры PDW, PCDW и PMDW. PDW – показатель, отражающий степень гетерогенности тромбоцитов по размеру (анизцитоз тромбоцитов). Величина PDW в среднем составляет 10–15%. Этот показатель находится в обратной зависимости от числа тромбоцитов и периода их жизни. В каждом конкретном случае

важна не только величина PDW, но и ее изменение во времени, а также связь с другими тромбоцитарными показателями. Одновременное присутствие фракций мелких (зрелых, неактивных) и больших (молодых, активированных) тромбоцитов ведет к увеличению PDW, но при этом MPV может оставаться в пределах нормы. Сочетание повышенного PDW с увеличением MPV отражает нарастание числа крупных тромбоцитов при усилении их продукции и активации. Ложное увеличение PDW может быть признаком присутствия агрегатов тромбоцитов, микроэритроцитов, фрагментов эритроцитов.

Параметры PCDW и PMDW характеризуют степень гетерогенности тромбоцитов по MPC и MPM и рассчитываются как стандартные среднеквадратичные отклонения концентрации компонентов тромбоцитов или сухой массы тромбоцитов от их средних значений. PCDW можно использовать для контроля пригодности (жизнеспособности) тромбоцитарных концентратов при трансфузиях. По некоторым данным, пациенты с высокими PCDW и PMDW имеют более высокие риски смертельного исхода при ДВС.

PCT – тромбокрит, отражает долю тромбоцитов в общем объеме крови. Нормальные значения варьируют в пределах от 0,15 до 0,35%. У здорового человека при уменьшении числа тромбоцитов усиливается тромбоцитопоз, в циркулирующую кровь попадает большое число молодых, более крупных тромбоцитов, что ведет к увеличению MPV. При увеличении количества циркулирующих тромбоцитов снижается продукция их в костном мозге, в результате снижается процент крупных форм и уменьшается MPV. Однако при нарушении этого равновесия происходит или уменьшение PCT, что в конечном счете приводит к патологии первичного гемостаза и риску возникновения кровотечений, или повышение PCT, что увеличивает риск тромбозов. По литературным данным, PCT является более чувствительным параметром для оценки риска возникновения кровотечений, чем число тромбоцитов. Снижение

параметра PCT до уровня <0,1% обуславливает возникновение послеоперационных кровотечений у пациентов с развивающейся тромбоцитопенией.

Оценка тромбоцитарных параметров с использованием гематологических анализаторов является дешевым и быстрым методом анализа состояния тромбоцитов. Однако тромбоцитарные индексы довольно вариабильны в зависимости от преаналитических факторов. В частности, время после венопункции является критическим для определения параметров активации тромбоцитов *in vivo*. Тромбоциты могут быть спонтанно активированы *in vitro*, что доказано зависимыми от времени изменениями тромбоцитарных параметров. В случае хранения образцов крови в пробирках с КЗЭДТА при комнатной температуре в течение 2 часов наблюдается ступенчатое увеличение MPV, уменьшение MPC, увеличение MPM и снижение PCDW. Эти колебания не зависят от тяжести сопутствующих ССЗ. По данным многих авторов оптимальным временем для исследования MPV в пробирках с ЭДТА можно считать 2 ч после взятия крови. Также существуют определенные сложности с установлением референтных интервалов (необходимо учитывать антикоагулянт, возраст пациента, модель анализатора). Все это создает определенные трудности при интерпретации результатов тромбоцитарных параметров.

Таким образом, современные гематологические анализаторы позволяют получить достаточно полную информацию об изменениях крови пациента. Нужно помнить, что объем информации зависит от класса прибора и его потенциальных возможностей. Применение современных гематологических анализаторов не исключают роль врачей клинической лабораторной диагностики, а существенно меняют их функции. Появляется возможность более полной оценки состояния гемопоэза больного и оформления заключения о предположительном диагнозе, необходимых исследованиях и наблюдениях в процессе лечения.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Kushner J. P. Maxwell Myer Wintrobe: Influential Teacher in the Field of Hematology MD// The Hematologist. – 2007 – Vol.4, № 6
2. Родченкова В. В. Звезды аналитического приборостроения. Уоллес Генри и Джозеф Ричард Культеры// Аналитика – 2021 – выпуск 4, № 3. – С. 12-14.
3. Интерпретация показателей крови на автоматическом анализаторе / Д.С. Сачилович, О.А. Шумак, Ж.Н. Пугачева, Е.П. Лукьяненко, Т.П. Кляпец. – Гомель: ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2018 – 26 с.
4. Погорелов В. М., Иванова Л. А., Козинец Г. И. Эффективность и информативность гематологических анализаторов // Гематол. и трансфузиол. – 2012. – т. 57, № 3. – С.30-37.
5. Davis B.H., Bigelow N.C. Flow cytometric reticulocyte quantification using Thiazole Orange provides clinically useful reticulocyte maturity index // Archives of Pathology and Laboratory Medicine. – 1989. –Vol.113. – P.684-689.
6. Kratz A., Lee S.H., Zini G., Riedl J.A, Hur M., Machin S. International Council for Standardization in Haematology. Digital morphology analyzers in hematology: ICSH review and recommendations // Int J Lab Hematol. – 2019. – Vol.41, №4. – P. 437-447.
7. Chabot-Richards D.S., George T.I. White blood cell counts: reference methodology // Clin Lab Med. 2015. - Vol.35, №1. – P.11-24.
8. Sukhacheva E. Comments re article on comparison of performance and abnormal cell flagging of two automated hematology analyzers: Sysmex XN 3000 and Beckman Coulter DxH 800// Int J Lab Hematol. –2020. – Vol. 42, №3.
9. Bruegel M., Nagel D., Funk M., Fuhrmann P., Zander J., Teupser D. Comparison of five automated hematology analyzers in a university hospital setting: Abbott Cell-Dyn Sapphire, Beckman Coulter DxH 800, Siemens Advia 2120i, Sysmex XE-5000, and Sysmex XN-2000 // Clin Chem Lab Med. – 2015 Vol. 53, №7. – P.1057-1071.