

Подсчет ретикулоцитов и определение связанных с ними параметров с помощью анализаторов серии LH компании Beckman Coulter Inc.

Соколов А.Ю.

Москва

Автоматизация анализа ретикулоцитов

Определение содержания ретикулоцитов – традиционный тест оценки состояния эритропоэза, имеющий особое значение для диагностики анемии или наблюдения за ходом ее лечения. Использование методов проточной цитометрии для анализа содержания ретикулоцитов позволило увеличить надежность и точность измерений, а также дало возможность использовать новые параметры, отражающие степень созревания клеток и их размеры. Для определения пригодности этих параметров в целях диагностики и лечения многих анемических состояний были начаты независимые клинические исследования.

Традиционный метод подсчета ретикулоцитов (микроскопия) вследствие присущей ему неточности, особенно в области низких и высоких значений концентрации клеток, имеет ограничения при использовании в качестве средства мониторинга [2, 6]. Вариабельность приготовления и окрашивания мазка крови, ограниченное количество анализируемых клеток и систематические ошибки самой методики – все это приводит в конечном итоге высоким значениям коэффициента вариации (от 25 до более чем 50%) [1, 7–10].

В последние годы анализ ретикулоцитов включен в набор методик многих гематологических анализаторов средней и высокой производительности [28–30]. В настоящее время используются современные методы тестирования, реализованные в гематологическом оборудовании второго поколения, автоматически проводящем аспирацию, подготовку образца и анализ параметров ретикулоцитов. Полная автоматизация процесса анализа позволила устранить вариабельность, связанную с выполнением мазков крови, окрашиванием и систематическими погрешностями метода, способствовала высокой воспроизводимости результатов. Кроме того, возможность анализировать более 30000 клеток в обычном автоматическом режиме, в отличие от 1000 клеток при руч-

ном анализе, позволило повысить точность и воспроизводимость автоматического метода [6, 13, 28–30].

Технология подсчета ретикулоцитов компании Beckman Coulter

В гематологических анализаторах компании Beckman Coulter для оценки содержания ретикулоцитов используют нефлуорохромный краситель метиленовый синий для преципитации РНК в ретикулоцитах. Назначение красителя – идентификация ретикулоцитов среди эритроцитов.

Кровь перемешивается с метиленовым синим и инкубируется в течение короткого промежутка времени. Затем добавляется кислый, гипоосмотический, гемолитический раствор, позволяющий частично снизить концентрацию гемоглобина в ретикулоцитах за счет образования пор в мембране клетки и выхода гемоглобина во внешнюю среду, но оставляющий окрашенную РНК в клетке. Функция этого раствора двояка: удаление гемоглобина из ретикулоцитов и придание красным клеткам сферической формы без их лизиса. Гемолитический раствор также имеет свойство фиксатора, поддерживающего сферическую форму клеток за счет их осмотического набухания. Удаление гемоглобина из сферических клеток является необходимым, поскольку это усиливает выраженность ретикулома и повышает точность последующего определения ретикулоцитов. Неправильная форма зрелых эритроцитов и ретикулоцитов приводит к непредсказуемому светорассеянию (в интервале от 0 до 90°) при прохождении клеток через лазерный луч. Придание клеткам сферической формы способствует воспроизводимости светорассеяния, служит основой для определения ретикулоцитов в образце.

Технология VCS

После окрашивания и удаления гемоглобина, для идентификации клеток, подсчета и классификации ретикулоцитов применяется технология VCS, использующая уникаль-

ные методики проточной цитометрии. Идентификация и классификация производится на основе одновременно-го анализа клеток по трем параметрам: объему (Volume), электрической проводимости в токе высокой частоты (Conductivity) и светорассеиванию (Light Scatter).

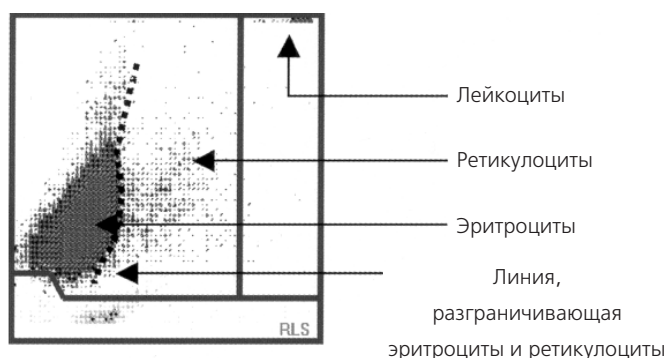
Объем, измеряемый с помощью постоянного тока, позволяет установить размер клетки. Анализ ретикулоцитов в значительной степени зависит от информации о размерах, поскольку незрелые клетки больше зрелых.

Измерение электрической проводимости, при использовании тока радиочастотного диапазона, обеспечивает информацию о внутренней структуре клетки.

Измерение параметров светорассеивания при прохождении клеток через лазерный луч, дает информацию о характере клеточной поверхности и гранулярности клетки. Анализ ретикулоцитов также в значительной степени зависит от информации о светорассеивании, поскольку незрелые клетки, содержащие остаточную РНК, рассеивают свет сильнее зрелых красных клеток.

Типичная диаграмма анализа ретикулоцитов

Рисунок (приведен пример двумерной диаграммы – Объем/Светорассеивание) иллюстрирует типичную диаграмму, получаемую при анализе ретикулоцитов. Линия, разграничивающая эритроциты и ретикулоциты, проведена



в соответствии с алгоритмом проведения анализа и локализации популяций клеток в трехмерной диаграмме с учетом значений всех трех измеряемых параметров (Объем/Светорассеивание/Проводимость).

Маркировка результатов анализа ретикулоцитов

С помощью сложных алгоритмов позиционные параметры в сочетании со специальным способом статистической обработки данных используются для обеспечения достоверности результатов и активации маркеров ретикулоцитов. Определенные клинические состояния могут давать диаграммы значений, не соответствующие известным типам распределения зрелых красных клеток и ретикулоцитов.

Подобные атипичные образцы вызывают появление сообщений **Verify Retic** (Проверьте распределение ретикулоцитов) или **Abnormal Retic Pattern** (Аномальное распределение ретикулоцитов), информирующих о необходимости дальнейших лабораторных исследований.

Примеры аномального распределения клеток

Образцы с **серповидными клетками (sickle cell)** (средняя диаграмма) содержат красные клетки различной формы и размеров, что проявляется на диаграмме в виде увеличения значения объема и стандартного отклонения как ретикулоцитов, так и зрелых красных клеток. Как и в предыдущем случае, этот тип распределения может иметь разную степень выраженности, в зависимости от различий в протекании заболевания у разных пациентов и их состояния.

На правой диаграмме обнаружена субпопуляция клеток, имеющих большой объем и светорассеивание, более соответствующие лейкоцитам, нежели ретикулоцитам. Эта популяция рассматривается как континуум лейкоцитов **малого объема (low volume)**, появляющийся, возможно, вследствие их разрушения.



Фракция незрелых ретикулоцитов (IRF)

Фракция незрелых ретикулоцитов (IRF) определяется как соотношение молодых, или незрелых, ретикулоцитов и общего количества ретикулоцитов. Незрелые ретикулоциты имеют большие размеры и обладают наибольшими светорассеивающими свойствами, а, следовательно, на более высоким содержанием РНК.

Клиническое применение IRF

В норме содержание незрелых ретикулоцитов не превышает 5% от общего количества ретикулоцитов. Выброс незрелых ретикулоцитов в периферическую кровь возникает в периоды интенсивной стимуляции эритропоэза, при таких состояниях как геморрагия и некоторые формы анемии, или при терапии, стимулирующей продукцию клеток костного мозга [2]. IRF можно назвать эквивалентом «сдвига влево», как правило, связанного с появлением нейтрофильных лейкоцитов. Данный параметр дает

дополнительную информацию о красных клетках, что позволяет сократить время от постановки диагноза до начала терапии или длительность самой терапии.

Из литературных данных известно, что индекс IRF в комбинации с подсчетом ретикулоцитов может быть использован для улучшения классификации форм анемии, мониторинга характеристики восстановления клеток костного мозга и терапии анемии [3–5, 10–12, 18–22].

Возможно дополнительное и более специфичное клиническое применение IRF [3, 4, 5, 10, 11, 12, 18–22]:

- Мониторинг регенерации стволовых клеток после трансплантации костного мозга,
- Мониторинг регенерации костного мозга после интенсивной химиотерапии,
- Мониторинг терапии железом, витамином В₁₂ или фолатом,
- Мониторинг воздействия токсичных лекарств на костный мозг,
- Мониторинг состояния трансплантата почки с помощью анализа эритропоэза,
- Контроль условий неонатального переливания крови.

Улучшение классификации, диагностики и лечения анемии

Davis B. и др. [2, 12] полагают, что при использовании индекса IRF в сочетании с подсчетом ретикулоцитов классификация форм анемии может быть улучшена. В таблице приведены сведения об уровне IRF и содержании ретикулоцитов при различных клинических состояниях.

Мониторинг восстановления костного мозга после трансплантации

Трансплантация костного мозга выполняется достаточно часто при некоторых гематологических заболеваниях и химиотерапии солидных опухолей. Перед транспланта-

цией пациент получает высокую дозу радиации в целях облучения костного мозга и подвергается интенсивной химиотерапии. Этот процесс приводит к снижению или прекращению продукции клеток крови. Возникающие состояния требуют постоянного контроля для определения количества и продолжительности применения антибиотиков и продуктов крови [15].

После трансплантации, в профилактических целях и для исследования восстановления компонентов костного мозга пациенту проводят расширенный гематологический анализ крови, включая дифференциальный анализ и подсчет ретикулоцитов. Первичный общепринятый индикатор восстановления продукции миелоидных клеток, а также успешности пересадки костного мозга – это абсолютное количество нейтрофилов. Увеличение после трансплантации содержания нейтрофилов и незрелых миелоидных клеток до $0,5 \times 10^9/\text{л}$ и более, как правило, указывает на успешную пересадку [5, 15, 16].

Мониторинг количества тромбоцитов проводится реже, несмотря на то, что этот параметр является хорошим индикатором продукции мегакариоцитов. Поскольку пациентам требуется частая трансфузия тромбоцитарной массы, увеличение количества тромбоцитов может быть следствием этой процедуры и не соответствовать их реальной продукции костным мозгом [3, 5].

Увеличение содержания ретикулоцитов более 1% или их абсолютного количества до $50 \times 10^9/\text{л}$ используется как индикатор восстановления эритроидного ростка. [3, 15]. Хотя увеличение количества ретикулоцитов отражает восстановление костного мозга, этот показатель менее чувствителен, чем абсолютное содержание нейтрофилов. Davis B. провел исследование крови 20 пациентов после пересадки костного мозга и обнаружил у них снижение продукции ретикулоцитов на срок от одной до семи недель по сравнению с ростом абсолютного количества нейтрофилов [15].

Клиническое состояние	Уровень IRF	Содержание ретикулоцитов
Пересадка костного мозга	Повышенный	Пониженное
Гемолитическая анемия	Повышенный	Повышенное
Железодефицитная анемия	Повышенный	Нормальное или пониженное
Недостаток В ₁₂ или фолата	Повышенный	Нормальное или пониженное
Недавняя геморрагия	Повышенный	Нормальное или повышенное
Талассемия	Нормальный или повышенный	Повышенное
Миелодиспластические синдромы	Нормальный или повышенный	Нормальное или пониженное
Апластический криз	Нормальный или пониженный	Пониженное
Гипопластическая анемия	Нормальный или повышенный	Пониженное
Миелоидно-лимфоидные злокачественные образования	Пониженный	Нормальное
Апластическая анемия	Пониженный	Пониженное

В ходе обследования пациентов при пересадках костного мозга [3, 17] обнаружено, что в отличие от содержания ретикулоцитов, IRF ответ тесно связан и часто предшествует ответу нейтрофилов при восстановлении активности костного мозга. Существенное преимущество индекса IRF заключается в том, что он менее подвержен влиянию факторов, вносящих вариабельность в количество нейтрофилов, например, при клинических или субклинических инфекциях. Увеличение IRF более чем на 20% после трансплантации костного мозга указывает на восстановление эритроидной продукции.

Как показано Davis B. и др., IRF в сравнении с подсчетом ретикулоцитов позволяет получить подтверждение успешной трансплантации на более ранних стадиях (примерно в два раза раньше, чем другими методами). Davis делает вывод, что IRF – наиболее чувствительный индикатор благополучной пересадки костного мозга, поскольку возрастание этого показателя является наиболее ранним ответом, обнаруживаемым современными лабораторными методами [14].

Мониторирование эритропоэза при трансплантации почки

Эритропоэтин (ЕРО) – это гормон, регулирующий продукцию красных клеток костным мозгом. При повышении продукции эритропоэтина, отмечаемом при анемических состояниях, уровень его возрастает, увеличивается продукция эритроцитов, в кровотоке из костного мозга освобождаются ретикулоциты [23]. Поскольку почки являются первичным источником эритропоэтина, хроническая почечная недостаточность приводит к хронической анемии, связанной с нехваткой продукции и секреции эритропоэтина. Хотя традиционная терапия заключается в переливании крови для поддержания уровня гемоглобина, наиболее эффективным средством лечения анемии при хронической почечной недостаточности является пересадка почки.

Moulin B. и др. [27] исследовали состояние 74 пациентов после пересадки почки, проведя серию измерений эритропоэтина сыворотки, гематокрита, параметров ретикулоцитов и креатинина сыворотки. После трансплантации IRF вырос на 25% по сравнению с дооперационным уровнем, и это произошло, в среднем, за семь дней до повышения абсолютного количества ретикулоцитов. Авторы пришли к выводу, что IRF является более чувствительным ранним индикатором эритропоэза, после пересадки почки, чем абсолютное количество ретикулоцитов.

Мониторирование терапии эритропоэтином при хронической почечной недостаточности

Поскольку не всем пациентам с хронической недостаточностью почек показана трансплантация, альтернативным переливанию крови средством терапии является применение рекомбинантного эритропоэтина человека (r-HuEPO), что позволяет снизить риск, связанный с постоянными переливаниями [24].

R-HuEPO – эффективное терапевтическое средство для пациентов с анемией, вызванной хронической почечной недостаточностью, которое позволяет компенсировать отсутствие почечной продукции эритропоэтина и поддержать уровень гемоглобина. Также доказано, что r-HuEPO эффективен при лечении анемии, связанной с недостаточным ответом на ЕРО, наблюдаемым при синдроме приобретенного иммунодефицита, раке или у пациентов, не переносящих переливания крови [24].

Поскольку затраты на лечение хронической недостаточности почек постоянно растут, мониторинг эффективности терапии r-HuEPO, приобретает большое значение как средство снижения расходов [25, 26]. IRF, по-видимому, является одним из наиболее важных и чувствительных параметров для оценки ответа пациента на терапию ЕРО [12, 19].

Недавние технологические достижения предоставили в распоряжение клиницистов более точные методы подсчета ретикулоцитов и позволили использовать новые параметры. Один из таких новых параметров, фракция незрелых ретикулоцитов, имеет практическое применение в клинической медицине. [25]. В настоящее время компания Beckman Coulter предлагает своим клиентам оборудование, позволяющее определить ряд параметров ретикулоцитов, и намерена продолжать поддержку исследований применения этих параметров в будущем.¹

¹ Список литературы находится в редакции