

## ФУНКЦИИ ЛЕЙКОЦИТОВ

### Точная оценка функций лейкоцитов и высокая эффективность рабочего процесса

#### Уверенное распознавание злокачественных и реактивных изменений гематологической картины

Неспособность распознать злокачественные изменения гематологической картины крови является одной из самых значимых проблем в работе лабораторий и имеет серьезные последствия для здоровья пациентов. Таким образом, возможность избежать получения ложноотрицательных результатов при анализе злокачественных образцов имеет очень большое значение. Полагаться на результаты неавтоматизированного анализа мазков не рекомендуется, так как в этом случае отмечается высокая вариабельность в интерпретации морфологии лимфоцитов. Также стоит отметить высокую статистическую вариабельность при анализе образцов с малым количеством клеток. В таких ситуациях могут помочь автоматизированные гематологические анализаторы.

И дело не только в высокой точности их работы. После появления подозрения на малигнизацию лабораториям необходимо выполнить трудоемкие и дорогостоящие повторные исследования. Поэтому анали-

Объединение двух каналов проточной цитометрии в одном устройстве-анализаторе позволяет обнаруживать злокачественные изменения с высокой точностью и избирательностью. Это достигается за счет того, что различные белые тельца крови выполняют различные функции.

заторы должны уметь отсеивать ложноположительные результаты для более быстрой диагностики и снижения затрат. Сочетая результаты анализа XN-DIFF и данные канала WPC (лейкоциты-прекурсоры и патологические клетки), анализатор Sysmex XN обеспечивает высокие чувствительность и специфичность обнаружения реактивных и злокачественных клеток.

#### Измерение по методу XN-DIFF

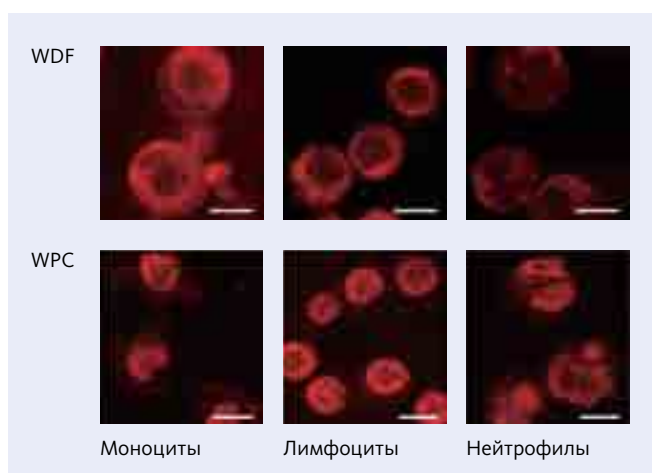
В канале WDF (лейкограмма) происходит флуоресцентное маркирование белых кровяных телец, на этот процесс влияют состав мембраны и цитоплазмы клеток. Состав липидной мембраны активированных или незрелых клеток отличается от того, который характерен для неактивных и зрелых клеток. 1 | 8

Уникальная комбинация реагентов (лизис и введение маркеров), а также время инкубации позволяют выделять разные популяции клеток. Сначала лизирующий реагент проникает в клеточные мембраны, при этом масштаб повреждений мембраны зависит от липидного состава, который, в свою очередь, зависит от типа клетки (уровня зрелости) и ее состояния (активирована или нет).

Затем флуоресцентный маркер помечает РНК, находящуюся в цитоплазме (рис. 1). Выраженность флуоресцентного сигнала зависит от степени перфорированности мембраны (липидного состава) и общего количества РНК в цитоплазме. Данные о составе мембраны и цитоплазматической РНК (флуоресценция), объеме клетки (прямое рассеивание) и межклеточной структуре (боковое рассеивание) анализируются патентованными алгоритмами, обеспечивающими точное определение реактивных, незрелых или патологических клеток в образце крови.

### WPC-канал (лейкоциты-прекурсоры и патологические клетки)

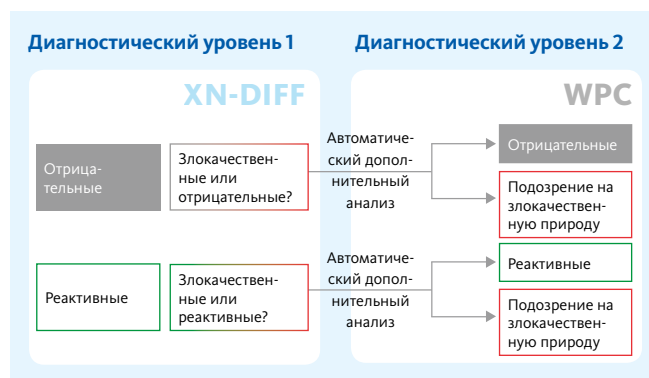
Лизирующий реагент, поступающий в канал WPC, в значительной степени воздействует на липиды мембраны клетки за счет того, что здесь, в отличие от канала WDF, используется другое поверхностно-активное вещество, а время инкубации увеличено. Кроме того, флуоресцирующий реагент имеет более высокую концентрацию полиметина и, следовательно, выполняет маркирование ДНК ядра клетки.



**Рис. 1** Микрофотографии флуоресцирующих популяций клеток после маркирования реагентами WDF и WPC. WDF флуоресцентный маркер в основном связывается с РНК в цитоплазме, в то время как маркер WPC связывается преимущественно с ДНК в ядре клетки. Длина отрезка – 5 мкм. По материалам Каваучи с соавт [1].

Примером того, как функции или статус активации клетки влияют на липидный состав мембраны, являются так называемые «липидные рафты». Липидные рафты – это богатые холестерином и гликофинголидами микроструктуры клеточных мембран, которые играют важную роль в перемещении мембранных белков и осуществлении передачи клеточных сигналов. Липидные рафты более структурированы и упакованы плотнее, чем окружающий их липидный бислой; при этом они способны свободно в нем перемещаться.

Повышенное число липидных рафтов в клеточной мембране наблюдается в более активированных клетках при межклеточном взаимодействии (например, злокачественные и активированные зрелые клетки) по сравнению с клетками, находящимися в состоянии покоя и незрелыми клетками [2 – 3]. Более высокая пермеаблизация некоторых типов клеток, таких как абнормальные лимфоциты, приводит к потере цитоплазмы и уменьшению размера клетки (прямое рассеивание).



**Рис. 2** Двухуровневый подход, используемый в анализаторах *Systemex XN* для распределения образцов по трем разным четко заданным категориям: отрицательные, реактивные (флаг «Атипичные лимф?») и подозрение на злокачественность (флаги «Бласты?» или «Абнорм. лимф?»)

Таким образом, WDF-канал позволяет оценить цитоплазматическую активность, а WPC-канал детектирует абнормальные клетки, исходя из строения их мембраны, которая определяет их размер (уменьшение размера клеток некоторых типов) и доступность ДНК для связывания с маркерами (рис. 1).

Задействование обоих каналов и соответствующих наборов реагентов в определенных условиях позволяет оптимизировать чувствительность и специфичность обнаружения злокачественных клеток. Как показано на рис. 2, в WDF-канале возможно выявление большей части отрицательных и некоторых реактивных образцов. Некоторые образцы отмечаются как содержащие злокачественные или нормальные клетки (рис. 2: «Злокачественные или отрицательные?»), а другие образцы отмечаются как содержащие злокачественные или реактивные клетки (рис. 2: «Злокачественные или реактивные?»). В отношении образцов, которые помещаются в одну из этих категорий, затем проводится автоматическое рефлекс-тестирование в WPC-канале.

WPC-канал может классифицировать подозрительные образцы по трем четко заданным категориям (реактивные, подозрение на злокачественность или отрицательные). Это позволяет лабораториям классифицировать все образцы по данным категориям и уточнять причину реактивности клеток после исключения малигнизации.

Данным категориям анализатор присваивает флаги со следующими значениями: «подозрение на злокачественность» (метки «Бласты?» или «Абнорм. лимф?») или «реактивные клетки» (метка «Атипичные лимф?»). Таким образом, работа анализаторов серии XN основывается на рекомендациях Европейского консенсуса о идентификации клеток крови, предлагающий распределение атипичных лимфоцитов по группам «Атипичные лимфоциты, подозрение на реактивность» и «Атипичные лимфоциты, подозрение на новообразование» [4].

В одном из недавних исследований [5] было продемонстрировано, что анализаторы серии XN имеют выдающиеся показатели по чувствительности выявления бластов и абнормальных лимфоцитов при межинструментальном сравнении выявления патологических флагов в 349 образцах, собранных случайно в ходе рутинных исследований (таблица 1). В другом недавнем исследовании [6] были продемонстрированы хорошие характеристики анализаторов серии XN по обнаружению лейкоцитоза неопластического и реактивного генеза (таблица 2). Авторы пришли к выводу, что анализатор серии XN имеет показатели чувствительности и специфичности, схожие с морфологическим исследованием мазков крови.

**Таблица 1** Чувствительность, специфичность, диагностическую ценность положительных и отрицательных результатов у пяти разных анализаторов в отношении 349 образцов, полученных рандомизированно. По материалам Брюгел с соавт [5].

Референсные значения по данным микроскопического исследования	N	Анализатор	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	Диагностическая ценность положительных результатов (%)	Диагностическая ценность отрицательных результатов (%)
Бласты (флаг «Бласты?»)	34	Sapphire	76	93	55	97
		DxH 800	74	95	63	97
		Advia 2120i	65	97	65	97
		XE-5000	65	98	79	96
		<b>XN-2000</b>	<b>97</b>	<b>96</b>	<b>70</b>	<b>100</b>
Клетки лимфомы (флаг «Абнорм. лимф?»)	25	Sapphire	56	94	44	96
		DxH 800	64	94	47	97
		Advia 2120i	72	88	31	98
		XE-5000	80	95	54	99
		<b>XN-2000</b>	<b>80</b>	<b>95</b>	<b>59</b>	<b>98</b>
Неопластические клетки (флаг «Бласты?» и/или «Абнорм. лимф?»)	57	Sapphire	74	95	72	95
		DxH 800	81	95	75	96
		Advia 2120i	77	94	71	96
		XE-5000	75	96	80	95
		<b>XN-2000</b>	<b>96</b>	<b>94</b>	<b>75</b>	<b>99</b>

**Таблица 2** Рабочие характеристики анализаторов серии XN по определению лейкоцитов реактивного и неопластического генеза. По материалам Шуфф-Вернер с соавторами [6]

Референсные значения по данным микроскопического исследования, иммунофенотипирования и клинической диагностики	N	Анализатор	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	Диагностическая ценность положительных результатов (%)	Диагностическая ценность отрицательных результатов (%)
Бласты (флаг «Бласты?»)	30	Морфология	93	99	90	99
		XE-2100	90	39	17	97
		<b>XN-2000</b>	<b>93</b>	<b>96</b>	<b>74</b>	<b>99</b>
Клетки лимфомы (флаг «Абнорм. лимф?»)	18	Морфология	89	99	89	99
		XE-2100	78	62	14	97
		<b>XN-2000</b>	<b>89</b>	<b>97</b>	<b>70</b>	<b>99</b>
Неопластические клетки (флаг «Бласты?» и/или «Абнорм. лимф?»)	48	Морфология	92	98	92	98
		XE-2100	85	41	25	92
		<b>XN-2000</b>	<b>94</b>	<b>93</b>	<b>75</b>	<b>99</b>
Реактивные лимфоциты (флаг «Атипич. лимф?»)	35	Морфология	91	100	97	100
		XE-2100	63	77	31	98
		<b>XN-2000</b>	<b>86</b>	<b>98</b>	<b>86</b>	<b>99</b>

### Точное описание реактивных состояний путем количественной оценки параметров крови

При выявлении реактивных клеток у пациента подозревается воспалительный процесс инфекционной или неинфекционной природы, поэтому очень важно быстро провести дифференциальную диагностику различных реактивных состояний. Например, лечащие врачи должны определить соответствующую терапию для пациентов и не допустить чрезмерного использования антибиотиков в случае вирусных инфекций.

Правильное диагностирование предполагаемых воспалительных процессов по результатам клинического осмотра, биохимических маркеров и микробиологических культур крови – это трудоемкий и затратный процесс. Тем не менее, если лаборатория располагает возможностью быстрого определения этиологии воспалительного процесса, это позволяет выполнить необходимый дополнительный анализ. В свою очередь, лечащий врач может начать, менять или адаптировать тактику терапии.

Новые «Расширенные параметры воспаления» позволяют проводить количественную оценку активированных лимфоцитов и нейтрофилов. Полученные результаты могут быть использованы после исключения малигнизации. Сочетание параметров RE-LYMP и AS-LYMP, которые используются для подсчета всех реактивных лимфоцитов и лимфоцитов, синтезирующих антитела, соответственно, предоставляет дополнительную информацию о клеточной активации систем врожденного и приобретенного иммунного ответа. Кроме того, гранулярность и реактивность нейтрофилов (параметры NEUT-GI и NEUT-RI соответственно) позволяют дифференцировать ранние и поздние стадии бактериальных инфекций.

Несмотря на то что параметры RE-LYMP и AS-LYMP измеряются в WDF-канале, их использование несколько ограничено без данных, полученных из WPC-канала, так как малигнизация образца не может быть исключена с помощью данных из WDF-канала в примерно 60 % случаев исследования реактивных образцов. Например, в массиве данных, состоящем из 7782 образцов CBC + DIFF, полученных из регионального госпиталя, 148 из 255 реактивных образцов (с флагом «Атипич. лимф?» по данным WPC-канала) получили комбинацию флагов «Атипич. лимф?» и «Бласты /

Абнорм. лимф?» в ходе начального измерения XN-DIFF. Для этих 148 образцов значения RE-LYMP и AS-LYMP считаются недостоверными ввиду подозрения на малигнизацию. Таким образом, только 107 образцов из 255 были достоверно флажированы, как «Атипич. лимф?», что позволило бы незамедлительно использовать эти данные в ходе лечения. «Расширенные параметры воспаления» и их клиническая значимость описаны в нашем информационном буклете «Новые гематологические параметры для оперативного мониторинга реакции иммунной системы».

### Значение для рабочего процесса Оптимизация рабочего процесса благодаря снижению числа ложноположительных малигнизированных образцов

Высокая специфичность важна для снижения количества случаев ложноположительных злокачественных образцов. Необходимость проведения микроскопии мазков для подтверждения присутствия злокачественных клеток может быть значительно снижена при получении результатов исследования в каналах WDF и WPC. Например, в вышеупомянутом массиве данных (7782 образца CBC+DIFF, полученных из регионального госпиталя) 51 образец (8%) из 665, флажированных, как «Бласты/Абнорм. лимф?» XN-DIFF каналом, при последующем измерении в WPC канале могут быть реклассифицированы как «отрицательные» и 60 образцов (9%), как «реактивные». Таким образом, 111 образцов (17%) флажированные, как «Бласты / Абнорм. лимф?» могли быть переведены в категорию «немалигнизированные». В таблице 3 приводится сводная информация по снижению числа образцов крови с подозрением на малигнизацию, полученная в ходе нескольких исследований в разных когортах пациентов.

В заключение следует отметить, что необходимость использования микроскопии мазков для подтверждения присутствия злокачественных клеток может быть сокращена приблизительно на 20% (гематологическая лаборатория, работающая с рутинными образцами) и на более чем 40% (специализированная лаборатория с высокой долей положительных образцов) при сочетанном использовании каналов WDF и WPC для анализа [6–9].

**Таблица 3** Сводные опубликованные результаты по снижению числа образцов с подозрением на малигнизацию при анализе в каналах WDF и WPC анализаторов серии XN.

Публикация	Число пациентов	Когорта пациентов	Снижение числа случаев подозрения злокачественной природы образцов при анализе в каналах WDF и WPC анализатора серии XN
Seo <i>et al.</i> [7]	1005	Взрослые – малигнизации	63% по сравнению с XE-2100*
Jones <i>et al.</i> [8]	150	Дети – малигнизации	46% по сравнению только с XN-DIFF
Schuff-Werner <i>et al.</i> [6]	253	Взрослые – малигнизации	41% по сравнению с XE-2100
Briggs <i>et al.</i> [9]	1000	Рутинные образцы, университетский госпиталь	49% по сравнению с XE-2100*

\* Заявленное снижение количества мазков крови на основании флажирования образцов, как малигнизированные и реактивные («Бласты?», «Абнорм. лимф?», «Атипич. лимф?»).

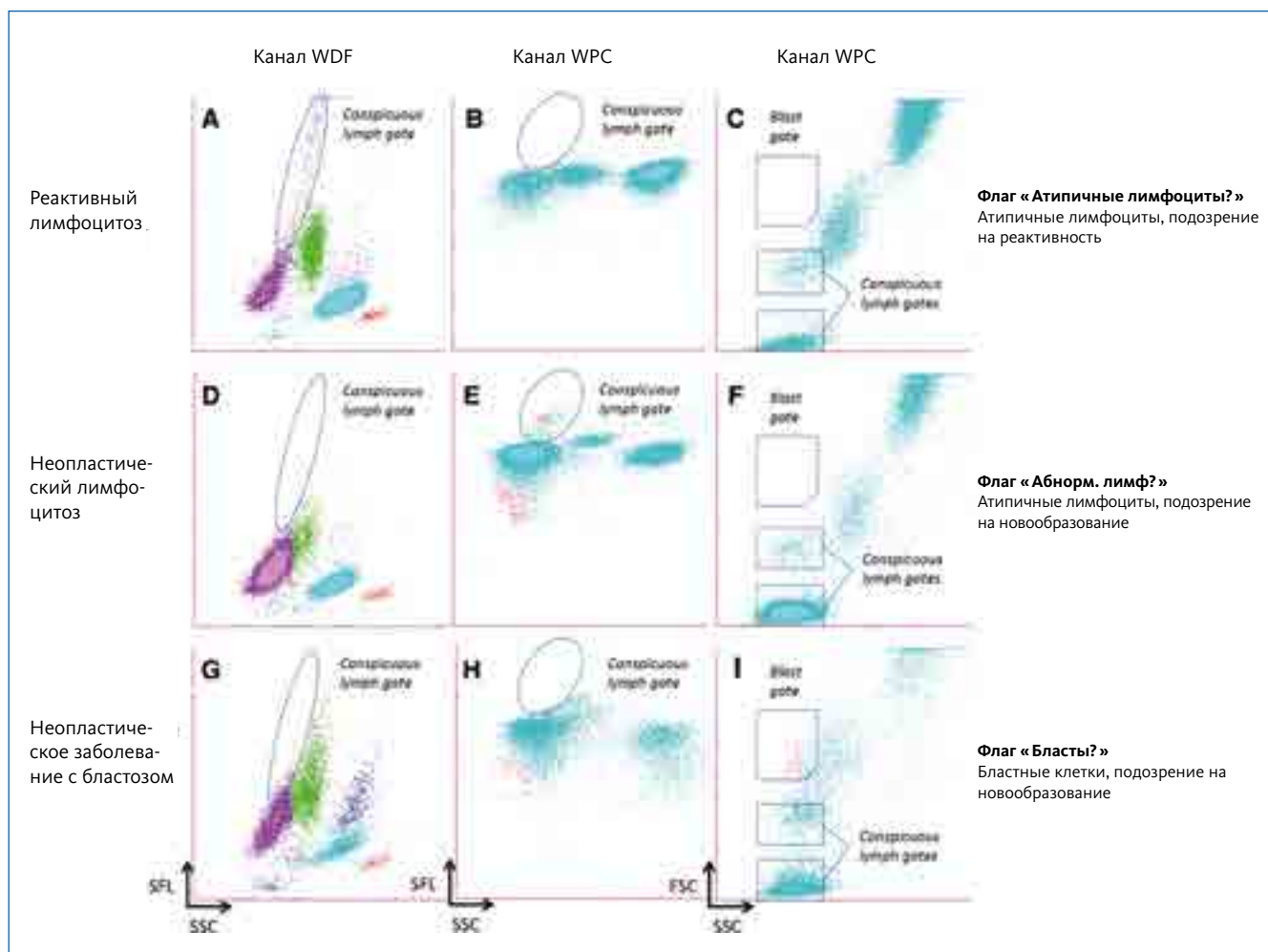
### Уточнение области поиска при микроскопии мазков

Информация WPC-канала может также помочь морфологам, так как достоверно злокачественные образцы распределяются по четко заданным категориям: образцы, содержащие бласты (флаг «Бласты?»), и образцы, содержащие абнормальные, неопластические лимфоциты (флаг «Абнорм. лимф?»). Это позволяет морфологам сфокусировать свое внимание на конкретных типах клеток и патологий при проведении последующей микроскопии мазка. На рис. 3 приводятся возможные способы оптимизации работы при использовании WPC-канала.

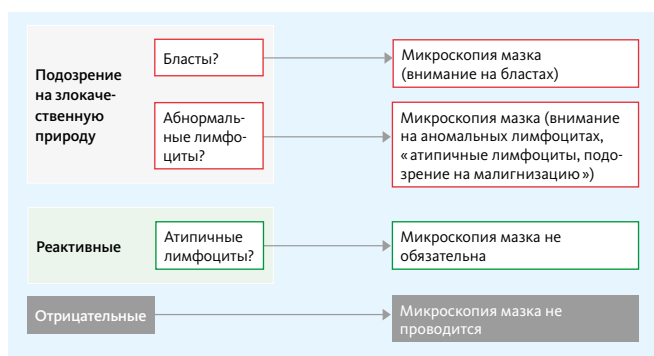
На рис. 4 показаны примеры из трех клинических случаев, различия между которыми были установлены при помощи данных из WPC-канала (реактивный образец, неопластический лимфоцитоз и неопластическое заболевание с бластозом).

### Как использование количественной информации по реактивным состояниям может оптимизировать вашу работу

Как было описано выше, «Расширенные параметры воспаления» могут предоставить количественные данные о статусе активации иммунной системы, что позволяет лабораториям создавать новые процедуры работы с мазками и, следовательно, оптимизировать рабочий процесс за счет уменьшения числа мазков, не имеющих клинической ценности.



**Рис. 3** Предполагаемый алгоритм работы с мазком на основе данных, полученных в ходе WPC-анализа. Образцы с подозрением на малигнизацию распределены по группам, что позволяет сконцентрироваться на конкретных типах клеток в ходе последующей микроскопии мазка. Образцы, классифицированные как «отрицательные» или «реактивные», могут не требовать последующей микроскопии.

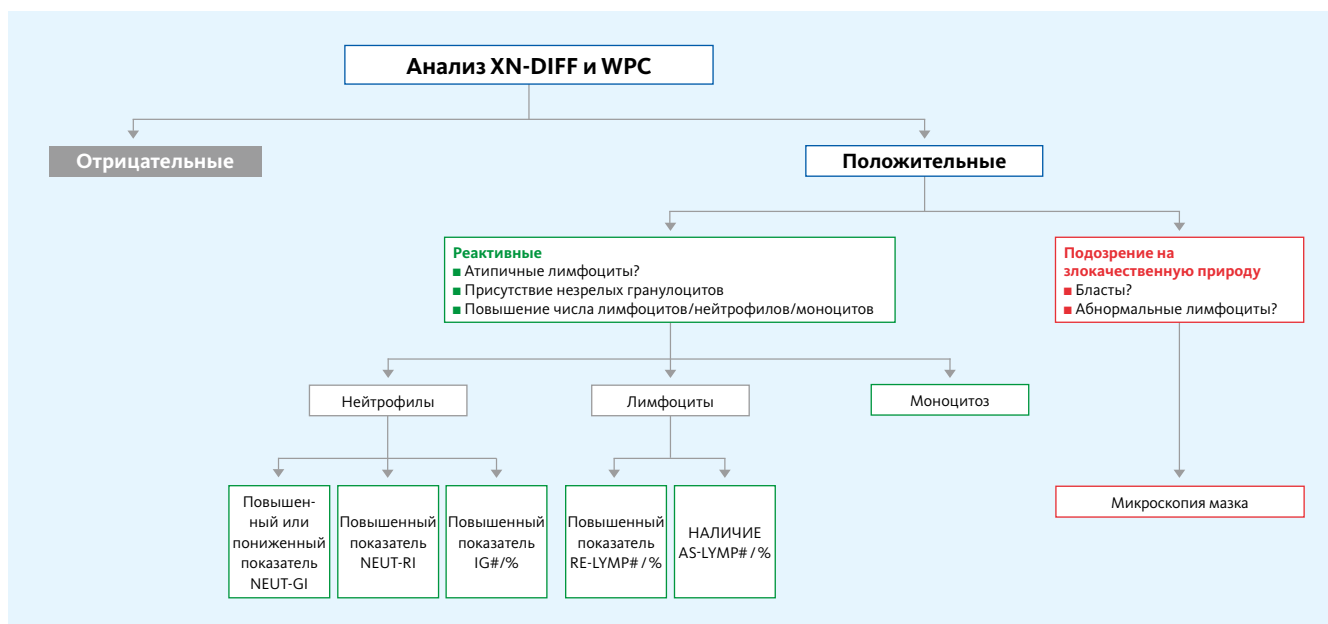


**Рис. 3** Примеры скатерограмм из WDF и WPC каналов, полученные при анализе трех клинических случаев. Реактивный лимфоцитоз (выздоровление после цитомегаловирусной инфекции) (A – C), неопластический лимфоцитоз (B-CLL) (D – F) и неопластическое заболевание с бластозом (AML M4) (G – I). По материалам Шуфф-Вернер с соавт. [6]

Как правило, в лабораториях рассматривается большое число реактивных и отрицательных образцов, а доля образцов, поступающих от пациентов с ранее недиагностированными злокачественными заболеваниями, достаточно мала. Это означает, что необходи-

мость в проведении микроскопии мазка для проверки наличия подозрительных клеток, например в случае моноцитоза, лимфоцитоза или наличия незрелых гранулоцитов (IG), может быть значительно снижена, так как по большей части такие результаты связаны с реактивными состояниями. Информация о количестве реактивных клеток может быть направлена врачу сразу же после анализа.

Незрелые гранулоциты, как правило, присутствуют в реактивных образцах, а подсчет таких клеток и анализ их морфологии при микроскопии не несет значительной клинической ценности в образцах уже известных пациентов. С другой стороны, у пациента с хронической миелоцитарной лейкемией незрелые гранулоциты могут встречаться в периферической крови, но в этом случае любое дополнительное исследование направлено не на подсчет IG, а на установление морфологии других клеток и, соответственно, диагноза.



**Рис. 5** Возможные (определяемы пользователем) алгоритмы для снижения количества мазков в ходе мониторинга заболевания с использованием параметров подсчета реактивных клеток IG, RE-LYMP и AS-LYMP, а также параметров NEUT-GI и NEUT-RI. Красный: микроскопия мазка обязательна; зеленый: микроскопия мазка необязательна.

Systex рекомендует вносить «Расширенные параметры воспаления» в ЛИС вместе с данными б-дифф анализа, включающего информацию о числе незрелых гранулоцитов, а также проведение микроскопии мазка, согласно схеме на рис. 5.

### Заключение

Пропуск малигнизированного образца является одной из насущных проблем для современных гематологических лабораторий. Таким образом, очень важной является способность обнаружить неопластические клетки в образце крови с высокой степенью чувствительности. Однако с точки зрения организации и рентабельности рабочего процесса в лаборатории минимизация числа нецелесообразных дополнительных исследований также имеет очень большое значение.

Двухуровневый подход к проведению анализа, применяемый в анализаторах серии XN, где задействуются каналы WDF и WPC, позволяет исключить малигнизацию с высокими чувствительностью и специфичностью. Это также позволяет проводить более качественную диагностику и мониторинг реактивных состояний

без потребности в клинически нецелесообразных дополнительных исследованиях. Канал WPC может реклассифицировать значительную часть образцов с подозрением на малигнизацию по результатам анализа XN-DIFF и перевести их в категории «реактивные» или «отрицательные».

Совместное использование обоих каналов может также оказать значительную помощь для морфологической классификации, особенно при исследовании образцов, содержащих лимфоциты неясной морфологии. Взаимодействие между каналами WDF и WPC может значительно снизить количество микроскопий и привнести добавочную клиническую значимость с помощью «Расширенных параметров воспаления».

## Ссылки

- [1] **Kawauchi S et al.** (2014): Comparison of the Leukocyte differentiation Scattergrams Between the XN-Series and the XE-Series of Hematology Analyzers. *Sysmex Journal International* Vol. 24 No. 1.
- [2] **Tuosto L et al.** (2001): Organization of plasma membrane functional rafts upon T cell activation. *Eur J Immunol.* 31(2): 345 – 9.
- [3] **Li YC et al.** (2006): Elevated Levels of Cholesterol-Rich Lipid Rafts in Cancer Cells Are Correlated with Apoptosis Sensitivity Induced by Cholesterol-Depleting Agents. *Am J Pathol.* 168(4):1107 – 18.
- [4] **Zini G et al.** (2010): A European consensus report on blood cell identification: terminology utilized and morphological diagnosis concordance among 28 experts from 17 countries within the European LeukemiaNet network WP10, on behalf of the ELN Morphology Faculty. *Br J Haematol.* 151(4): 359 – 64.
- [5] **Bruegel M et al.** (2015): 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.* 53(7):1057 – 71.
- [6] **Schuff-Werner P et al.** (2016): Performance of the XN-2000 WPC channel-flagging to differentiate reactive and neoplastic leukocytosis. *Clin Chem Lab Med.* 54(9):1503 – 10.
- [7] **Seo JY et al.** (2015): Performance evaluation of the new hematology analyzer Sysmex XN-series. *Int J Lab Hematol.* 37:155 – 64.
- [8] **Jones AS et al.** (2015): The value of the white precursor cell channel (WPC) on the Sysmex XN-1000 analyser in a specialist paediatric hospital. *J Clin Pathol.* 68(2):161 – 5.
- [9] **Briggs C et al.** (2012): Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system. *J Clin Pathol.* 65:1024 – 30.

Получите новые знания из общедоступных информационных буклетов компании «Сисмекс»:  
[www.sysmex.ru/whitepapers](http://www.sysmex.ru/whitepapers)