

## ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Шульга А.С.<sup>1,2</sup>, Крайнова Н.Н.<sup>1,2</sup>, Бурцев Д.В.<sup>1,2</sup>

### СТАБИЛЬНОСТЬ ГЕМОЦИТОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФОРМУЛЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ХРАНЕНИЯ ОБРАЗЦОВ ВЕНОЗНОЙ КРОВИ

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 344022, г. Ростов-на-Дону, Россия;  
<sup>2</sup>ГАУ Ростовской области «Областной консультативно-диагностический центр», 344000, г. Ростов-на-Дону, Россия

*Цель работы - определение изменений, происходящих в показателях автоматизированного подсчета лейкоцитарной формулы крови при хранении образцов цельной крови в течение 3 дней при комнатной температуре (25 °С), охлаждении до 4 °С и нагревании до 35 °С. 60 проб цельной крови измеряли в режиме развернутого общего анализа крови с лейкоцитарной формулой в различные временные точки: сразу после взятия крови и через 3, 6, 12, 24, 48 и 72 часов. Использовали вакуумные пробирки с антикоагулянтом K<sub>2</sub>EDTA, результаты получены с применением гематологического анализатора UniCel DxH 800 (Beckman Coulter Inc., USA, Miami, FL). Изменения значений параметров относительно исходного уровня для каждой комбинации времени и температуры оценивали с помощью теста совпадающих пар Уилкоксона.*

*Среди лейкоцитарных показателей относительное процентное и абсолютное количество нейтрофилов, базофилов и эозинофилов при отсроченном исследовании проб крови имело тенденцию к увеличению, а моноцитов и лимфоцитов – к снижению. При этом чем больше времени прошло от момента забора крови до проведения гемоцитометрии и чем выше была температура хранения, тем значительнее были обнаруженные изменения.*

*На основании результатов данного исследования можно сделать заключение, что при использовании технологии VCS даже через 12 ч от момента взятия крови результаты автоматизированного подсчета лейкоцитарной формулы могут быть недостоверными, если образец хранился при 25 °С или 4 °С, а при 35 °С отдельные лейкоцитарные параметры нестабильны уже через 6 часов.*

**Ключевые слова:** стабильность образцов; хранение пробирок с цельной кровью; гематологические исследования; гематологические анализаторы

**Для цитирования:** Шульга А.С., Крайнова Н.Н., Бурцев Д.В. Стабильность гемоцитометрических показателей лейкоцитарной формулы при различных условиях хранения образцов венозной крови. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (11): 579-591.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-579-591>

**Для корреспонденции:** Шульга Александр Сергеевич, канд. мед. наук, ассистент каф. персонализированной и трансляционной медицины; e-mail: [contrarius@yandex.ru](mailto:contrarius@yandex.ru).

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила	13.06.2024
Принята к печати	26.09.2024
Опубликовано	25.10.2024

*Shulga A.S.<sup>1,2</sup>, Kraynova N.N.<sup>1,2</sup>, Burtsev D.V.<sup>1,2</sup>*

### STABILITY OF HEMOCYTOMETRIC INDICES OF LEUKOCYTE FORMULA UNDER DIFFERENT STORAGE CONDITIONS OF VENOUS BLOOD SAMPLES

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Rostov State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Rostov-on-Don, Russia;

<sup>2</sup>State Autonomous Institution of the Rostov Region "Regional Consultative and Diagnostic Center", Rostov-on-Don, Russia

*The aim of the work was to determine the changes occurring in the parameters of automated counting of leukocyte blood formula under the condition of storage of whole blood samples for 3 days at room temperature (25 °C), cooling to 4 °C and heating to 35 °C. 60 whole blood tubes were measured in the unfolded total blood count mode with leukocyte formula at different time points: immediately after blood collection and then sequentially after 3, 6, 12, 24, 48, and 72 h. Vacuum tubes with anticoagulant K<sub>2</sub>EDTA were used, and the results were obtained using a UniCel DxH 800 hematology analyzer. Changes in parameter values relative to baseline for each combination of time and temperature were evaluated using the Wilcoxon matched pairs test.*

*Among the leukocytic parameters, the relative percentage and absolute number of neutrophils, basophils and eosinophils tended to increase, while monocytes and lymphocytes tended to decrease. At the same time, the more time elapsed from the moment of blood collection to hemocytometry and the higher the storage temperature was, the more significant were the changes detected.*

*Based on the results of this study, it can be concluded that when using VCS technology, even after 12 h from the time of blood collection to the measurement of the total blood count, the automated leukocyte count report may contain an unreliable result if the sample was stored at 25 or 4 °C. When tubes are stored at 35 °C, the stability of individual leukocyte parameters is already lost after 6 h.*

**Key words:** sample stability; storage of whole blood tubes; hematological studies; hematological analyzers

**For citation:** Shulga A.S., Kraynova N.N., Burtsev D.V. Stability of hemocytometric indices of leukocyte formula under different storage conditions of venous blood samples. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (11): 579-591 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-579-591>

**For correspondence:** Shulga Alexander Sergeevich, PhD (medical sciences), assistant of the Department of Personalized and Translational Medicine; e-mail: [contrarius@yandex.ru](mailto:contrarius@yandex.ru)

**Information about authors:**

Shulga A.S., <https://orcid.org/0009-0003-3202-4875>;

Kraynova N.N., <https://orcid.org/0009-0000-6791-4219>;

Burtsev D.V., <https://orcid.org/0000-0002-4673-7003>.

**Acknowledgment.** *The study had no sponsor support.*

**Conflict of interests.** *The authors declare absence of conflict of interests.*

Received 13.06.2024

Accepted 26.09.2024

Published 25.10.2024

**Введение.** Централизованные клинические лаборатории, оснащенные современными автоматическими анализаторами, способны эффективно и своевременно обрабатывать большие объемы поступивших для гемцитометрии образцов. Надежность результатов, выдаваемых гематологическим анализатором, в первую очередь зависит от соблюдения всех процедур как внутреннего, так и внешнего контроля качества исследований, а также своевременного технического обслуживания прибора. С другой стороны, необходимы гарантии соблюдения всех преаналитических требований: сбор образцов надлежащим образом в пробирки с соответствующим антикоагулянтом, безошибочная маркировка пробирок, их хранение и транспортировка согласно установленным правилам, а также анализ образцов в сроки, которые считаются подходящими или рекомендованы производителем. Нередко в централизованные лаборатории поступают образцы, хранившиеся несколько суток от момента забора и зачастую с нарушением температурного режима – т.е. при комнатной температуре и выше. В таких условиях важно установить пределы достоверности результатов при обработке старых образцов на автоматическом анализаторе.

Производители гематологических анализаторов и данные, приводимые в научной литературе, указывают, что образцы крови, хранящиеся при температуре от 3 до 8 °С, обычно дают надежные результаты по большинству параметров при сроке хранения до двух суток [1–4]. Однако известные мнения о пригодности для оценки различных показателей гемограммы тех образцов, которые хранились более 1–2 дней, неоднозначны, в особенности при различных температурных режимах хранения образцов.

**Цель** настоящего исследования – определить изменения, происходящие в параметрах автоматизированного подсчета лейкоцитарной формулы на гематологическом анализаторе при хранении проб крови в различных температурных режимах.

**Материал и методы.** Для исследования использовались образцы цельной крови от 20 здоровых амбулаторных пациентов без известных заболеваний. Участник исследования считался здоровым, если человек сам заявлял о своем здоровье и в течение месяца, предшествующего венепункции, не было острых заболеваний, а также сообщал об отсутствии сахарного диабета, почечной недостаточности, повышенного кровяного

давления и не получал антиагрегантную или антикоагулянтную терапию на момент взятия крови.

От каждого пациента были собраны в пробирки с K<sub>2</sub>EDTA 3 образца крови объемом по 6 мл, т. е. всего 60 пробирок. В течение 30 минут после сбора трижды выполнялся развернутый общий анализ каждой пробы крови с лейкоцитарной формулой на гематологическом анализаторе UniCel DxH 800 Coulter Cellular Analysis System (Beckman Coulter Inc., USA, Miami, FL) со строгим соблюдением инструкции для оператора из руководства по эксплуатации анализатора. Исследовали показатели лейкоцитарной формулы в общем клиническом анализе крови (CBC/Diff): количество лейкоцитов (WBC), относительное количество (%) нейтрофилов (NE%), эозинофилов (EO%), базофилов (BA%), моноцитов (MO%), лимфоцитов (LY%), нормобластов (NRBC/100 лейкоцитов) и абсолютное количество (x10<sup>9</sup>/л) нейтрофилов (NE#), эозинофилов (EO#), базофилов (BA#), моноцитов (MO#), лимфоцитов (LY#) и нормобластов (NRBC#).

Для каждого из этих параметров было рассчитано среднее значение по 9 исходным измерениям; эти средние значения были приняты в качестве исходных (базовых).

После определения исходных значений образцы подлежали хранению: из трех образцов крови, взятых от каждого из 20 доноров, один хранился при комнатной температуре (25 °С), второй — в холодильнике при 4 °С, третий — в термостате при 35 °С. Образцы анализировали после 3, 6, 12, 24, 48 и 72 часов хранения. В каждой из этих временных точек для каждого из 20 образцов на гематологическом анализаторе проводились три измерения параметров CBC/Diff, после чего пробирки продолжали храниться при указанных температурах. По результатам трех измерений рассчитывалось медианное и среднее значение каждого параметра, которое принималось как исходное для данного образца и данных значений времени и температуры хранения.

Нормальность данных оценивалась с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Большинство переменных не имели нормального распределения, поэтому использовались методы непараметрической статистики. Различия между образцами оценивались с помощью теста совпадающих пар Уилкоксона, *p*-значения менее 0,05 считались статистически значимыми.

Во всех временных точках каждого из режимов хра-

нения образцов были приготовлены микроскопические препараты для качественной оценки морфологических изменений лейкоцитов с применением автоматической системы клеточной визуализации «Vision Nema Pro Cell Imaging Analyzer®» компании West Medica.

Удовлетворительные результаты внутрилабораторного контроля качества в оценке работы геманализатора были получены на протяжении всего исследования. Температура хранения образцов контролировалась и поддерживалась в заданных пределах на протяжении всего эксперимента.

**Результаты.** В табл. 1–3 представлены медианные значения и статистическая значимость изменений параметров лейкоцитарной формулы при трех исследуемых режимах хранения. Для удобства восприятия данные таблиц интерпретированы также на рис. 1 (А–Н).

Независимо от температурного режима хранения образцов через 3 часа отмечались первые статистически значимые различия количества нормобластов, которые с увеличением времени хранения только усиливались. Во временной точке 3 часа, кроме роста содержания нормобластов, других достоверных изменений не отмечалось при всех режимах хранения.

Через 6 часов от момента получения исходных значений в нулевой точке проверка статистической значимости различия показателей с помощью теста совпадающих пар Уилкоксона выявила достоверные изменения как относительного, так и абсолютного содержания базофилов при хранении пробирок в термостате (35 °С); в дальнейшем эти изменения увеличивались.

По истечении 12 часов от начала эксперимента и далее, достоверный рост абсолютной и относительной концентрации базофилов наблюдался при любом режиме хранения образцов. Кроме того, в условиях нагревания образцов в термостате (35 °С) также повышалось относительное содержание эозинофилов и снижалось как относительное, так и абсолютное количество моноцитов.

После 24 часов хранения при комнатной температуре (25 °С) отмечалось снижение относительного содержания моноцитов и увеличение относительного количества эозинофилов и базофилов; в абсолютных значениях наблюдался прирост числа базофилов и снижение количества лимфоцитов. В образцах, подвергшихся охлаждению, регистрировался относительный прирост количества эозинофилов, базофилов и относительное снижение числа лимфоцитов; в абсолютных значениях увеличивалось содержание нейтрофилов и базофилов. В образцах из термостата через 24 ч изменялись все относительные значения исследуемых параметров: снижалось содержание лимфоцитов и моноцитов, увеличивалось количество нейтрофилов, эозинофилов и базофилов, а также снижалось общее количество лейкоцитов; в абсолютном выражении отмечено снижение количества лимфоцитов и моноцитов, продолжающееся увеличение концентрации базофилов.

Через 48 часов хранения пробирок при комнатной температуре и в относительном, и в абсолютном выражении определялось снижение количества лимфоцитов и моноцитов, увеличение числа нейтрофилов, эозинофилов и базофилов. В пробах, подвергшихся нагреванию, отмечалось снижение количества лимфоцитов и моноцитов, увеличение числа нейтрофилов и эозинофилов. При этом достоверно снизилось процентное и

абсолютное содержание базофилов. При охлаждении образцов в течение двух суток отмечено снижение относительного содержания лимфоцитов и моноцитов на фоне нарастания количества эозинофилов и базофилов, также увеличивались концентрации нейтрофилов, эозинофилов и базофилов. Общая концентрация лейкоцитов снизилась в образцах, подвергшихся нагреванию, а при режимах хранения с комнатной температурой или в холодильнике – оставалась неизменной.

Спустя 72 часа от начала исследования при комнатной температуре, равно как и при нагревании, в относительном и в абсолютном выражении определялось снижение количества лимфоцитов и моноцитов, увеличение числа нейтрофилов и эозинофилов. При этом процентное и абсолютное содержание базофилов при нагревании образцов достоверно снижалось, а при хранении в условиях комнатной температуры – повышалось. В результате охлаждения образцов в течение трех суток снижалось относительное содержание лимфоцитов и моноцитов на фоне нарастания количества нейтрофилов, эозинофилов и базофилов, также увеличивались концентрации нейтрофилов, эозинофилов и базофилов на фоне снижения содержания моноцитов. Установлено, что общая концентрация лейкоцитов снизилась в образцах, подвергшихся нагреванию, а при режимах хранения с комнатной температурой или в холодильнике она оставалась неизменной.

**Обсуждение.** Большинство клеток кроветворной системы имеют короткий срок жизни – менее суток для нейтрофилов и несколько недель или месяцев для моноцитов и лимфоцитов [5]. Но эти сроки приведены для лейкоцитов, находящихся в трех естественных средах их пребывания – костном мозге, крови и тканях. Если учесть известные данные, что сроки гибели лейкоцитов регулируются внешними факторами [6], то продолжительность жизни белых клеток крови сокращается *in vitro* при сборе образцов в пробирки. В результате клеточной дегенерации, имеющей место при старении клеток, происходит потеря отдельных клеточных характеристик, измеряемых анализатором. Вероятно, наблюдаемые в нашем эксперименте изменения в лейкоцитарных параметрах есть следствие утраты одной или нескольких морфологических особенностей клеточных популяций, что приводит к ошибочной идентификации анализатором одного типа клеток вместо другого. Результаты настоящего исследования продемонстрировали нестабильность большинства параметров автоматизированного подсчета лейкоцитарной формулы, выдаваемых гематологическим анализатором DxH 800, начиная с 24 часов хранения образцов вне зависимости от температуры хранения.

Концентрация лейкоцитов не отличалась от базовой для всех временных точек при температуре хранения образцов 25 и 4 °С. Эффект хранения пробирок с кровью при 35 °С сказывался на количестве лейкоцитов спустя 24 ч от момента взятия. Кроме того, в препаратах, приготовленных через 24–48 часов, фиксировалось увеличенное количество неклассифицированных клеток и разрушенных клеток-теней (рис. 10). Это сопровождалось выдачей анализатором системных уведомлений типа «избыток неклеточных элементов» в проточной ячейке («Excessive Debris») и «старый образец» («Aged Sample»). Предыдущие исследования показали, что общее количество лейкоцитов стабильно при 4 °С

в течение 72 ч при измерении на нескольких гематологических анализаторах, но при комнатной температуре наблюдается разница результатов в зависимости от используемого оборудования: Advia 120 со стабильностью до 48 ч, Sysmex XE 2100 со стабильностью до 24 ч и Sysmex XE-5000 со стабильностью до 72 часов [7, 8].

В нашем эксперименте количество полиморфноядерных лейкоцитов — самых многочисленных и самых короткоживущих из всех лейкоцитов — имело тенденцию к неуклонному увеличению при любом режиме хранения образцов. Одновременно с этим относительное и абсолютное содержание мононуклеаров (как моноцитов, так и лимфоцитов) неуклонно снижалось.

Известно, что уже через 30 минут после взятия начинаются морфологические изменения клеток крови, которые усиливаются с увеличением времени и условий хранения крови [9]. После взятия образцов клетки крови начинают испытывать кислородное голодание, что приводит к снижению окислительного фосфорилирования и падению уровня аденозинтрифосфата (АТФ). Снижение АТФ вызывает нарушение работы  $\text{Na}^+$ -насоса, что приводит к увеличению поступления  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{Na}^+$ , а также к увеличению эффлюкса  $\text{K}^+$  в результате набухания клеток [10, 11]. Снижение АТФ также приводит к активации анаэробного гликолиза, который сопровождается сокращением запасов гликогена, увеличением концентрации молочной кислоты и снижением pH, что способствует кластеризации хроматина. В итоге нарушается морфологическая целостность клеток крови, т.е. изменяется форма клеточных стенок, хроматина, ядра и размер клеток. Изменения в ядре протекают в трех последовательных стадиях и сопровождаются повреждением дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и хроматина. На первом этапе базофильная окраска хроматина выцветает (кариолизис), что, возможно, происходит под действием дезоксирибонуклеазы (ДНКазы). Далее происходит кариопикноз — дегенерация клетки, при которой ядро уменьшается в размере, ДНК превращается в твердую массу, хроматин конденсируется и ядро приобретает насыщенно базофильную окраску. На третьем этапе наблюдается фрагментация ядра — кариорексис.

При микроскопии препаратов крови нами наблюдался ряд характерных дегенеративных повреждений лейкоцитов, которые условно можно разделить на начальные и поздние. К ранним апоптотическим изменениям нейтрофилов относятся набухание ядер с изменениями хроматина, который за счет приобретаемого разряжения и снижения плотности упаковывания в ядре окрашивается более однородно и гомогенно по сравнению с нативными функционально активными ядрами. Микроскопическим подтверждением этого процесса является обнаружение нами аномальных и «псевдомолодых» форм, имитирующих облик миелоцитов и метамиелоцитов (рис. 3), а также появление «псевдопалочкоядерных» нейтрофилов (рис. 2). В данном контексте примечательна работа J.-L. Vives-Corrons соавт. [10], в которой международная группа из 14 экспертов в области лабораторной гематологии микроскопически оценила суммарно 490 мазков крови, исследуя признаки старения лейкоцитов, и определила снижение относительного количества сегментоядерных нейтрофилов в пользу палочкоядерных форм как результат апопто-

тических изменений в нейтрофильном ряду. В нашей работе при микроскопии препаратов крови также наблюдалось перераспределение в пользу увеличения содержания палочкоядерных форм, что было наиболее выражено для термостатируемых образцов. При этом внутренние алгоритмы системы клеточного анализа DxH800 сигнализировали уведомлениями оператору о подозрении на сдвиг лейкоцитарной формулы влево до палочкоядерных форм — «Left Shift», присутствии юных гранулоцитов — «Imm Grans», включая промиелоциты, миелоциты и метамиелоциты.

Наблюдаемые нами более поздние дегенеративные изменения гранулоцитов включали уменьшение размеров клетки в целом и ядра, конденсацию хроматина в темные пикнотичные массы и потерю сегментированной структуры ядра вплоть до разделения долей (кариорексис; рис. 5). Цитоплазматический ободок плазмолеммы может выглядеть неровным или нечетко очерченным, т.к. плазматическая мембрана становится активной и «взъерошенной» в процессе, называемом зейозом (zeiosis) [6]. В цитоплазме наблюдается вакуолизация и потеря гранул (дегрануляция) (рис. 4, 8). В итоге клетка может разорваться на связанные с мембраной фрагменты, называемые апоптотическими телами, плотно заполненные клеточными органеллами и фрагментами ядра. Таким образом, структуры с провоспалительным содержанием, включая лизосомы и митохондрии, хорошо сохраняются внутри телец, которые фагоцитируются макрофагами [12].

Мононуклеарные клетки подвергались аналогичным морфологическим изменениям, как и нейтрофилы: в них также наблюдались вакуоли и усиленная ядерная лобуляция вплоть до дезинтеграции ядер (рис. 9). J. V. Kennedy и соавт. [9], ранжируя степень вакуолизации в лейкоцитах, установили следующие закономерности: незначительная цитоплазматическая вакуолизация в моноцитах может быть обнаружена через 1 ч, прогрессирующая до умеренной — через 4 ч; вакуолизация в нейтрофильных гранулоцитах появляется через 3–4 ч и прогрессирует до умеренной через 6 часов. Лимфоциты претерпевают аналогичные изменения — такие, как образование цитоплазматических вакуолей, уплотнение и гомогенное окрашивание пикнотичного хроматина, расщепление ядра.

Апоптоз моноцитов и неправильная идентификация анализатором дегенерированных моноцитов как нейтрофилов может объяснить наблюдаемое в нашем эксперименте снижение относительного и абсолютного содержания моноцитов при одновременном увеличении концентрации и процентной доли нейтрофилов.

Некоторые из описанных изменений лейкоцитов имитируют те, что наблюдаются при миелодиспластических синдромах (МДС), и если врач-микроскопист не знает о нарушениях сроков и условий хранения крови, то это может в отдельных случаях стать причиной ошибочных интерпретаций результатов общего анализа крови. Это касается псевдопельгеризации, вакуолизации цитоплазмы, дегрануляции клеток и потери четкости цитоплазматических границ. В связи с этим крайне важно для клинической диагностики гематологических заболеваний с применением микроскопического наблюдения морфологии клеток в мазках периферической крови и, в первую очередь, оценки

диспластических изменений то, чтобы мазки были приготовлены как можно скорее. Авторы «Классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей» Всемирной организации здравоохранения и в издании 2008 года [13], и в редакции 2017 [14] года рекомендуют, чтобы «слайды для оценки дисплазий были сделаны из свежеполученных образцов, образцы же, подвергавшиеся воздействию антикоагулянтов более 2 часов, являются непригодными».

В нашей работе абсолютные и относительные значения эозинофилов имели тенденцию к увеличению с течением времени, при том, чем выше была температура хранения пробирок, тем раньше проявлялся достоверный прирост количества. При оценке концентрации и относительной доли базофилов нами было отмечено во всех трех температурных режимах хранения статистиче-

ски значимое нарастание значений. Однако, начиная со вторых суток хранения образцов в термостате и далее мы наблюдали достоверное снижение числа базофилов как в абсолютном, так и в относительном выражении. Это уменьшение в отчетах гематологического анализатора может свидетельствовать о критическом влиянии высокой температуры, приводящей к дегрануляции базофилов, т.е. к утрате зернистости цитоплазмы (пожалуй, самой характерной морфологической особенностью базофилов) и, в конечном итоге, к их лизису (рис. 8).

Концентрация нормобластов достоверно увеличивалась, начиная с 3 часов с момента взятия крови независимо от режима хранения. Среднее медианное значение ядросодержащих нормобластов для всех образцов в базовой точке составило 0,11/ 100 лейкоцитов. При этом медианные значения выходили за верхний рефе-

Таблица 1

Медианные значения и статистическая значимость изменений параметров лейкоцитарной формулы при температуре хранения 25 °С

Показатель	Медиана; (межквартильный интервал); p в сравнении с исходным образцом (0 ч):						
	0 ч	3 ч	6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
WBC, x10 <sup>9</sup> /л	6,4 (5,20-7,10)	6,4 (5,20-7,10) p=0,4343	6,45 (5,25-7,10) p=0,3595	6,20 (5,20-7,00) p=0,3651	6,50 (5,30-6,90) p=0,5280	6,1 (5,05-6,80) p=0,7657	6,3 (5,10-6,90) p=0,7445
NE%	54,34 (51,70-61,07)	54,11 (51,29-60,31) p=0,0725	54,96 (51,56-61,74) p=0,1521	55,09 (51,50-62,06) p=0,5559	55,39 (53,18-63,48) p=0,0754	<b>60,75</b> <b>(58,14-68,04)</b> p<0,0001	<b>65,70</b> <b>(63,67-75,95)</b> p<0,0001
LY%	31,51 (23,78-35,14)	31,68 (23,62-35,31) p=0,0911	31,66 (23,87-35,33) p=0,2647	30,67 (23,21-34,78) p=0,3163	30,81 (22,75-33,78) p=0,2271	<b>29,39</b> <b>(21,54-32,18)</b> p<0,0001	<b>26,51</b> <b>(18,41-30,08)</b> p<0,0001
MO%	9,54 (7,12-10,91)	9,46 (7,55-10,99) p=0,6210	9,57 (7,41-11,25) p=0,6401	9,46 (7,46-10,42) p=0,4820	<b>8,51</b> <b>(7,18-10,32)</b> p=0,0077	4,67 <b>(3,53-6,46)</b> p<0,0001	2,63 <b>(2,03-3,54)</b> p<0,0001
EO%	1,74 (1,30-3,19)	1,79 (1,33-3,39) p=0,4686	1,75 (1,30-3,30) p=0,8473	1,82 (1,31-2,84) p=0,3233	<b>2,04</b> <b>(1,38-3,18)</b> p<0,0001	2,37 <b>(1,69-3,24)</b> p<0,0001	2,59 <b>(1,90-3,69)</b> p<0,0001
BA%	0,68 (0,53-0,89)	0,67 (0,53-0,83) p=0,7840	0,70 (0,55-0,82) p=0,5946	<b>0,96</b> <b>(0,64-1,14)</b> p<0,0001	<b>0,91</b> <b>(0,56-1,07)</b> p<0,0001	1,03 <b>(0,68-1,29)</b> p<0,0001	1,01 <b>(0,83-1,18)</b> p<0,0001
NRBC /100 лейкоцитов	0,10 (0,06-0,16)	<b>0,19</b> <b>(0,14-0,32)</b> p<0,0001	<b>0,28</b> <b>(0,16-0,46)</b> p<0,0001	<b>0,42</b> <b>(0,29-0,60)</b> p<0,0001	<b>0,63</b> <b>(0,27-0,63)</b> p<0,0001	0,70 <b>(0,41-0,99)</b> p<0,0001	0,78 <b>(0,55-1,76)</b> p<0,0001
NE#	3,45 (2,81-4,43)	3,46 (2,77-4,34) p=0,7487	3,49 (2,80-4,36) p=0,7515	3,46 (2,85-4,27) p=0,5826	3,49 (2,85-4,38) p=0,4763	3,74 <b>(3,07-4,63)</b> p<0,0001	4,07 <b>(3,31-5,02)</b> p<0,0001
LY#	1,69 (1,52-2,25)	1,66 (1,53-2,29) p=0,0575	1,68 (1,52-2,27) p=0,0778	1,61 (1,52-2,24) p=0,0608	<b>1,59</b> <b>(1,48-2,17)</b> p<0,0001	1,53 <b>(1,42-1,96)</b> p<0,0001	1,35 <b>(1,24-1,91)</b> p<0,0001
MO#	0,55 (0,49-0,63)	0,55 (0,47-0,64) p=0,5411	0,56 (0,49-0,64) p=0,4944	0,54 (0,49-0,60) p=0,3403	0,50 (0,45-0,58) p=0,2058	<b>0,29</b> <b>(0,23-0,36)</b> p<0,0001	0,18 <b>(0,11-0,21)</b> p<0,0001
EO#	0,11 (0,07-0,25)	0,10 (0,08-0,26) p=0,3479	0,11 (0,08-0,26) p=0,5960	0,11 (0,08-0,23) p=0,3682	0,13 (0,08-0,26) p=0,1931	<b>0,14</b> <b>(0,10-0,25)</b> p<0,0001	0,15 <b>(0,11-0,28)</b> p<0,0001
BA#	0,042 (0,03-0,05)	0,043 (0,04-0,05) p=0,9608	0,044 (0,03-0,06) p=0,3901	<b>0,054</b> <b>(0,04-0,07)</b> p<0,0001	<b>0,060</b> <b>(0,04-0,07)</b> p<0,0001	<b>0,058</b> <b>(0,03-0,07)</b> p<0,0001	0,063 <b>(0,05-0,07)</b> p<0,0001
NRBC#	0,007 (0,004-0,01)	<b>0,012</b> <b>(0,01-0,02)</b> p<0,0001	<b>0,017</b> <b>(0,01-0,03)</b> p<0,0001	<b>0,025</b> <b>(0,02-0,04)</b> p<0,0001	<b>0,024</b> <b>(0,02-0,04)</b> p<0,0001	<b>0,033</b> <b>(0,02-0,07)</b> p<0,0001	0,052 <b>(0,03-0,12)</b> p<0,0001

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: статистическая значимость изменений p<0,05, тест совпадающих пар Уилкоксона. Полужирным курсивом выделена статистически значимая разница.

Медианные значения и статистическая значимость изменений параметров лейкоцитарной формулы при температуре хранения 4 °С

Показатель	Медиана; (межквартильный интервал); р в сравнении с исходным образцом (0 ч):						
	0ч	3ч	6ч	12ч	24ч	48ч	72ч
WBC, x10 <sup>9</sup> /л	6,4 (5,20-7,10)	6,40 (5,30-7,05) <i>p</i> =0,2447	6,40 (5,30-7,20) <i>p</i> =0,0595	6,50 (5,50-7,50) <i>p</i> =0,1827	6,40 (5,50-7,20) <i>p</i> =0,1026	6,60 (5,60-7,40) <i>p</i> =0,0984	6,70 (5,50-7,60) <i>p</i> =0,0647
NE%	54,45 (52,22-62,17)	53,89 (52,00-62,05) <i>p</i> =0,2787	54,22 (52,46-61,32) <i>p</i> =0,7768	54,28 (52,04-61,61) <i>p</i> =0,7825	53,82 (52,13-61,38) <i>p</i> =0,7766	55,03 (52,25-62,98) <i>p</i> =0,4703	<b>59,66</b> <b>(55,54-70,58)</b> <i>p</i> <0,0001
LY%	32,06 (24,20-34,73)	31,17 (24,22-34,27) <i>p</i> =0,0788	31,75 (23,72-33,96) <i>p</i> =0,0519	31,43 (23,94-34,05) <i>p</i> =0,0622	<b>30,90</b> <b>(23,54-33,79)</b> <i>p</i> <0,0001	<b>31,06</b> <b>(22,8-34,06)</b> <i>p</i> =0,0052	<b>28,94</b> <b>(21,29-32,8)</b> <i>p</i> <0,0001
MO%	9,85 (7,59-10,76)	9,58 (7,90-10,97) <i>p</i> =0,4054	9,99 (7,36-10,91) <i>p</i> =0,6114	9,28 (7,31-11,17) <i>p</i> =0,9120	9,32 (7,60-11,24) <i>p</i> =0,5986	<b>7,8</b> <b>(6,31-10,98)</b> <i>p</i> =0,0004	<b>6,15</b> <b>(4,75-8,8)</b> <i>p</i> <0,0001
EO%	1,66 (1,45-3,12)	1,86 (1,32-3,26) <i>p</i> =0,3096	1,65 (1,37-3,40) <i>p</i> =0,4982	1,87 (1,42-3,42) <i>p</i> =0,5608	<b>1,99</b> <b>(1,58-3,36)</b> <i>p</i> <0,0001	<b>2,25</b> <b>(1,72-4,15)</b> <i>p</i> <0,0001	<b>2,59</b> <b>(1,97-3,70)</b> <i>p</i> <0,0001
BA%	0,68 (0,54-0,86)	0,73 (0,57-0,89) <i>p</i> =0,2423	0,88 (0,63-1,19) <i>p</i> =0,7742	<b>1,10</b> <b>(0,84-1,34)</b> <i>p</i> =0,0010	<b>1,04</b> <b>(0,82-1,31)</b> <i>p</i> <0,0001	<b>1,10</b> <b>(0,82-1,51)</b> <i>p</i> <0,0001	<b>1,19</b> <b>(0,96-1,41)</b> <i>p</i> <0,0001
NRBC/100 лейкоцитов	0,11 (0,06-0,16)	<b>0,26</b> <b>(0,14-0,37)</b> <i>p</i> <0,0001	<b>0,33</b> <b>(0,20-0,54)</b> <i>p</i> <0,0001	<b>0,47</b> <b>(0,34-0,67)</b> <i>p</i> <0,0001	<b>0,69</b> <b>(0,39-1,11)</b> <i>p</i> <0,0001	<b>0,92</b> <b>(0,63-1,54)</b> <i>p</i> <0,0001	<b>1,47</b> <b>(0,61-2,16)</b> <i>p</i> <0,0001
NE#	3,45 (2,81-4,43)	3,54 (2,81-4,49) <i>p</i> =0,0918	3,61 (2,84-4,48) <i>p</i> =0,0620	3,60 (2,87-4,53) <i>p</i> =0,0642	<b>3,66</b> <b>(2,86-4,63)</b> <i>p</i> =0,0154	<b>3,63</b> <b>(2,88-4,61)</b> <i>p</i> =0,0251	<b>4,03</b> <b>(3,09-4,88)</b> <i>p</i> =0,0070
LY#	1,69 (1,48-2,25)	1,68 (1,46-2,24) <i>p</i> =0,3996	1,71 (1,47-2,26) <i>p</i> =0,5986	1,70 (1,51-2,23) <i>p</i> =0,6283	1,69 (1,52-2,19) <i>p</i> =0,6901	1,73 (1,52-2,27) <i>p</i> =0,0570	1,63 (1,46-2,13) <i>p</i> =0,1221
MO#	0,55 (0,49-0,63)	0,57 (0,49-0,65) <i>p</i> =0,5123	0,55 (0,50-0,65) <i>p</i> =0,7487	0,57 (0,51-0,65) <i>p</i> =0,2054	0,59 (0,47-0,66) <i>p</i> =0,2087	0,52 (0,40-0,66) <i>p</i> =0,2964	<b>0,43</b> <b>(0,33-0,60)</b> <i>p</i> <0,0001
EO#	0,11 (0,07-0,25)	0,11 (0,08-0,27) <i>p</i> =0,7567	0,11 (0,07-0,27) <i>p</i> =0,8556	0,11 (0,08-0,28) <i>p</i> =0,2906	0,12 (0,09-0,30) <i>p</i> =0,0985	<b>0,14</b> <b>(0,10-0,30)</b> <i>p</i> =0,0067	<b>0,16</b> <b>(0,12-0,31)</b> <i>p</i> <0,0001
BA#	0,045 (0,03-0,05)	0,042 (0,03-0,07) <i>p</i> =0,0568	0,053 (0,04-0,07) <i>p</i> =0,4912	<b>0,067</b> <b>(0,04-0,10)</b> <i>p</i> =0,0132	<b>0,067</b> <b>(0,05-0,08)</b> <i>p</i> =0,0006	<b>0,069</b> <b>(0,05-0,09)</b> <i>p</i> <0,0001	<b>0,078</b> <b>(0,06-0,10)</b> <i>p</i> <0,0001
NRBC#	0,007 (0,004-0,01)	<b>0,015</b> <b>(0,01-0,02)</b> <i>p</i> <0,0001	<b>0,018</b> <b>(0,01-0,03)</b> <i>p</i> <0,0001	<b>0,030</b> <b>(0,02-0,04)</b> <i>p</i> <0,0001	<b>0,043</b> <b>(0,02-0,07)</b> <i>p</i> <0,0001	<b>0,056</b> <b>(0,04-0,10)</b> <i>p</i> <0,0001	<b>0,068</b> <b>(0,04-0,12)</b> <i>p</i> <0,0001

ренный предел в 0,6/ 100 лейкоцитов, используемый в нашей лаборатории, через сутки от момента взятия крови. Увеличение абсолютных и относительных значений нормобластов можно связать с ошибочной идентификацией анализатором апоптотически измененных лейкоцитов. На рис. 6 можно заметить морфологическое сходство дегенерировавших лейкоцитов с характеристиками истинных оксифильных нормобластов, изображенных на рис. 7: размер немногим больше эритроцита, эксцентрично расположенное небольшое пикнотичное ядро, эозинофилия цитоплазмы. Пожалуй, единственный признак, свидетельствующий в пользу нейтрофильного происхождения клеток на рис. 6 – это цитозольная азурофильная зернистость. С учетом того, что дегрануляция является одним из основных

апоптотических процессов, то, вероятно, со временем формируется пул таких дегенерировавших лейкоцитов, утративших цитоплазматические гранулы и, тем более становящихся похожими на нормобласты.

В научных работах, посвященных исследованию стабильности клеток крови при хранении, нам было интересно в первую очередь сравнить результаты нашей работы с выводами исследований, проведенных на том же оборудовании, или же на гематологическом анализаторе фирмы Beckman Coulter, отличном от нашей модели. Полученные нами результаты отчасти согласуются с исследованием В. Oztas и соавт. [15], в котором 30 образцов крови с ЭДТА инкубировались при комнатной температуре 25 °С и в интервалы 2, 4, 8 и 24 ч выполнялось измерение на приборе Beckman Coulter Unicel DxH 800.

Таблица 3

Медианные значения и статистическая значимость изменений параметров лейкоцитарной формулы при температуре хранения 35 °С

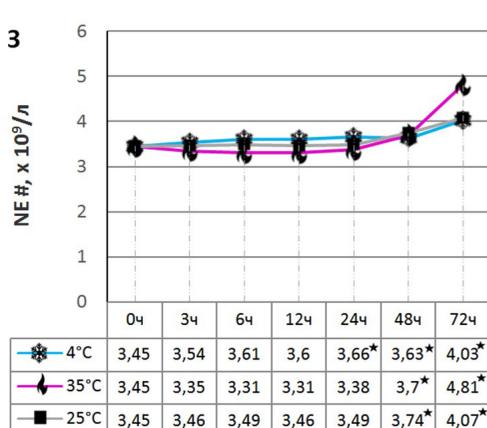
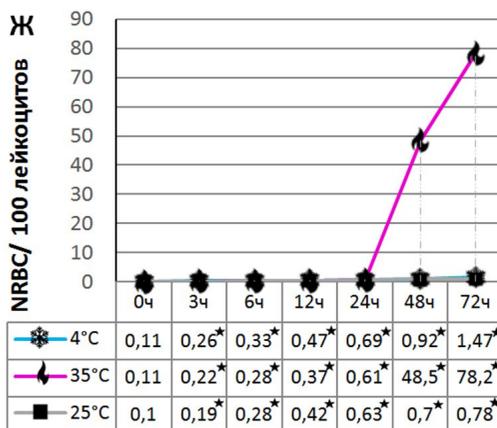
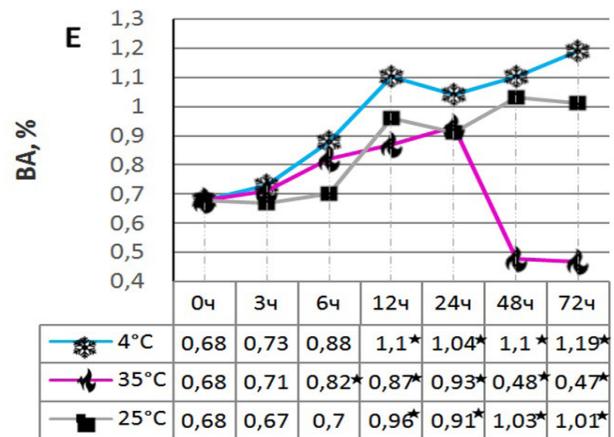
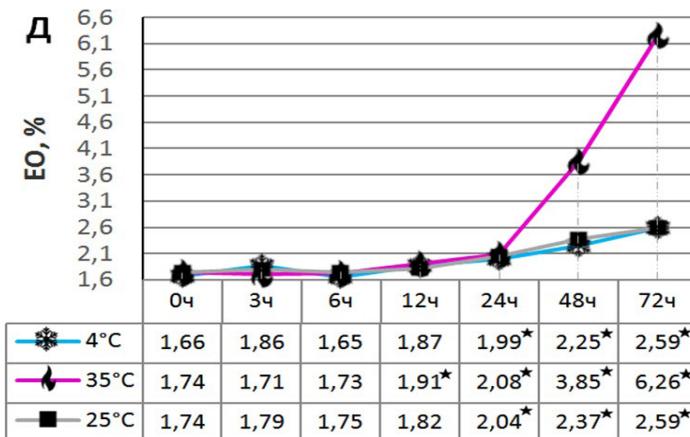
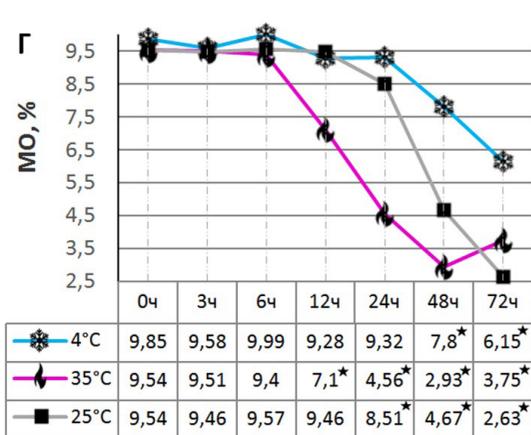
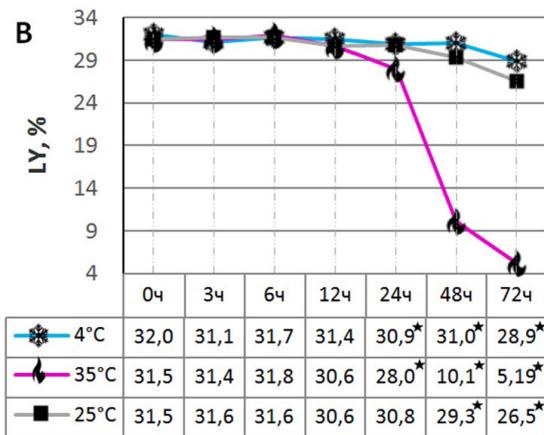
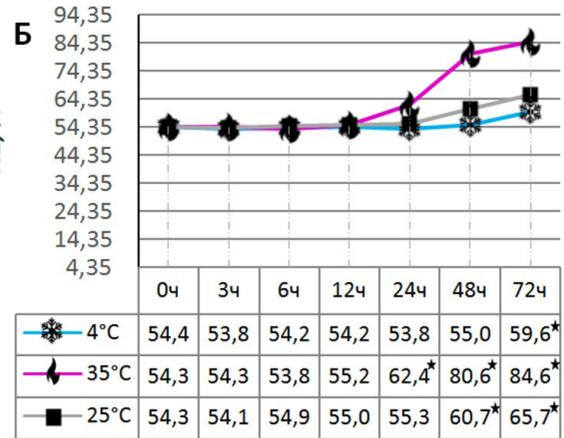
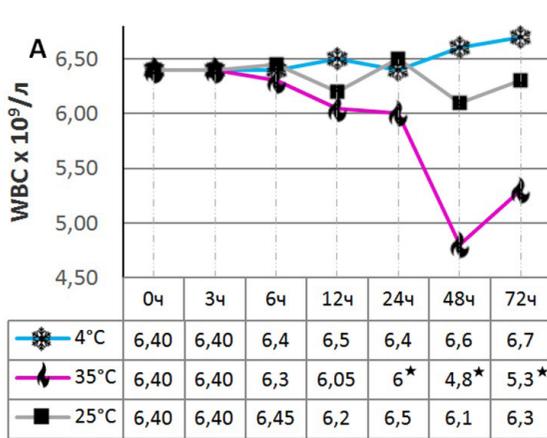
Показатель	Медиана; (межквартильный интервал); p в сравнении с исходным образцом (0 ч):						
	0 ч	3 ч	6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
WBC, x10 <sup>9</sup> /л	6,4 (5,20-7,10)	6,4 (5,10-6,90) p=0,7568	6,30 (5,10-6,80) p=0,8385	6,05 (4,90-6,70) p=0,1262	<b>6,00</b> <b>(4,80-6,60)</b> p=0,0355	<b>4,80</b> <b>(4,40-6,30)</b> p=0,0002	<b>5,30</b> <b>(4,80-6,40)</b> p=0,0308
NE%	54,34 (51,70-61,07)	54,35 (52,05-60,98) p=0,9232	53,88 (52,01-60,63) p=0,4748	55,26 (52,23-62,75) p=0,8800	<b>62,40</b> <b>(59,46-70,45)</b> p<0,0001	<b>80,61</b> <b>(75,22-83,93)</b> p<0,0001	<b>84,69</b> <b>(54,86-89,75)</b> p<0,0001
LY%	31,51 (23,78-35,14)	31,48 (23,57-34,85) p=0,2761	31,88 (24,64-35,20) p=0,4417	30,68 (24,45-35,72) p=0,1221	<b>28,06</b> <b>(21,32-31,30)</b> p=0,0072	<b>10,14</b> <b>(6,61-15,63)</b> p<0,0001	<b>5,19</b> <b>(3,27-14,86)</b> p<0,0001
MO%	9,54 (7,12-10,91)	9,51 (7,61-10,91) p=0,4243	9,40 (7,40-10,91) p=0,3479	<b>7,10</b> <b>(5,85-9,41)</b> p<0,0001	<b>4,56</b> <b>(2,97-5,95)</b> p<0,0001	<b>2,93</b> <b>(2,28-4,56)</b> p<0,0001	<b>3,75</b> <b>(0,94-9,87)</b> p<0,0001
EO%	1,74 (1,30-3,19)	1,71 (1,18-2,88) p=0,7533	1,73 (1,30-3,49) p=0,9325	<b>1,91</b> <b>(1,40-3,19)</b> p=0,0002	<b>2,08</b> <b>(1,59-3,25)</b> p<0,0001	<b>3,85</b> <b>(2,50-6,77)</b> p<0,0001	<b>6,26</b> <b>(2,48-10,24)</b> p<0,0001
BA%	0,68 (0,53-0,89)	0,71 (0,58-0,85) p=0,3106	<b>0,82</b> <b>(0,61-1,11)</b> p<0,0001	<b>0,87</b> <b>(0,69-1,21)</b> p<0,0001	<b>0,93</b> <b>(0,68-1,46)</b> p<0,0001	<b>0,48</b> <b>(0,34-0,87)</b> p=0,0005	<b>0,47</b> <b>(0,25-0,64)</b> p=0,0216
NRBC/100 лейкоцитов	0,11 (0,06-0,16)	<b>0,22</b> <b>(0,15-0,31)</b> p<0,0001	<b>0,28</b> <b>(0,20-0,40)</b> p<0,0001	<b>0,37</b> <b>(0,26-0,57)</b> p<0,0001	<b>0,61</b> <b>(0,41-2,16)</b> p<0,0001	<b>48,57</b> <b>(31,24-63,09)</b> p<0,0001	<b>78,25</b> <b>(50,0-175,1)</b> p<0,0001
NE#	3,45 (2,81-4,43)	3,35 (2,78-4,34) p=0,8373	3,31 (2,72-4,25) p=0,9914	3,31 (2,59-4,23) p=0,7293	3,38 (2,89-4,55) p=0,0506	<b>3,70</b> <b>(3,19-5,17)</b> p=0,0094	<b>4,81</b> <b>(1,95-5,52)</b> p<0,0001
LY#	1,69 (1,52-2,25)	1,68 (1,47-2,28) p=0,7918	1,68 (1,50-2,19) p=0,7601	1,66 (1,48-2,09) p=0,6863	<b>1,39</b> <b>(1,21-1,80)</b> p=0,0028	<b>0,49</b> <b>(0,36-0,74)</b> p<0,0001	<b>0,38</b> <b>(0,21-0,84)</b> p<0,0001
MO#	0,55 (0,49-0,63)	0,57 (0,48-0,64) p=0,6825	0,54 (0,46-0,62) p=0,3454	<b>0,42</b> <b>(0,34-0,51)</b> p<0,0001	<b>0,23</b> <b>(0,17-0,33)</b> p<0,0001	<b>0,18</b> <b>(0,12-0,24)</b> p<0,0001	<b>0,21</b> <b>(0,06-0,57)</b> p=0,0003
EO#	0,11 (0,07-0,25)	0,10 (0,07-0,23) p=0,8128	0,10 (0,08-0,24) p=0,8971	0,11 (0,08-0,25) p=0,9278	0,11 (0,08-0,23) p=0,6402	<b>0,22</b> <b>(0,14-0,38)</b> p<0,0001	<b>0,44</b> <b>(0,16-0,84)</b> p<0,0001
BA#	0,041 (0,03-0,05)	0,044 (0,04-0,05) p=0,3832	<b>0,052</b> <b>(0,04-0,06)</b> p=0,0002	<b>0,057</b> <b>(0,04-0,07)</b> p=0,0001	<b>0,058</b> <b>(0,04-0,09)</b> p=0,0001	<b>0,027</b> <b>(0,02-0,04)</b> p=0,0047	<b>0,031</b> <b>(0,02-0,05)</b> p=0,0400
NRBC#	0,007 (0,004-0,01)	<b>0,013</b> <b>(0,01-0,02)</b> p<0,0001	<b>0,015</b> <b>(0,01-0,03)</b> p<0,0001	<b>0,023</b> <b>(0,01-0,04)</b> p<0,0001	<b>0,036</b> <b>(0,02-0,12)</b> p<0,0001	<b>2,296</b> <b>(1,63-3,08)</b> p<0,0001	<b>4,401</b> <b>(2,38-10,12)</b> p<0,0001

В этой работе также отмечался прирост концентрации нейтрофилов и значительное нарастание количества базофилов. Однако содержание лимфоцитов и моноцитов — в противоположность нашим данным — увеличивалось, а содержание эозинофилов оставалось стабильным на протяжении всего эксперимента.

G.L. Gulati и соавт. [16] также исследовали стабильность 40 образцов крови с ЭДТА в течение одной недели при комнатной температуре с использованием Beckman Coulter GenS. Они обнаружили, что согласуется с нашими выводами, увеличение количества нейтрофилов и эозинофилов, прогрессивное снижение числа моноцитов. Однако они не наблюдали такого же увеличения содержания базофилов, которые оставались без статистически значимых сдвигов, и концентрация лимфоци-

тов в их работе возрастала.

Еще раньше В.А. Warner и D.M. Reardon [17] проанализировали 25 образцов крови здоровых людей, используя анализатор Beckman Coulter STKS, который наряду с Beckman Coulter GenS и DxH 800 использует технологию VCS, т.е. комбинацию измерений импеданса/объема, проводимости и светорассеяния для дифференциального подсчета лейкоцитов. В отличие от обнаруженного нами увеличения числа нейтрофилов, эозинофилов и снижения содержания лимфоцитов, В.А. Warner и D.M. Reardon, используя Beckman Coulter STKS, напротив, отметили статистически значимые снижение числа нейтрофилов и эозинофилов, прирост лимфоцитов. В этой работе также, как и в наших исследованиях, были зафиксированы увеличение количества



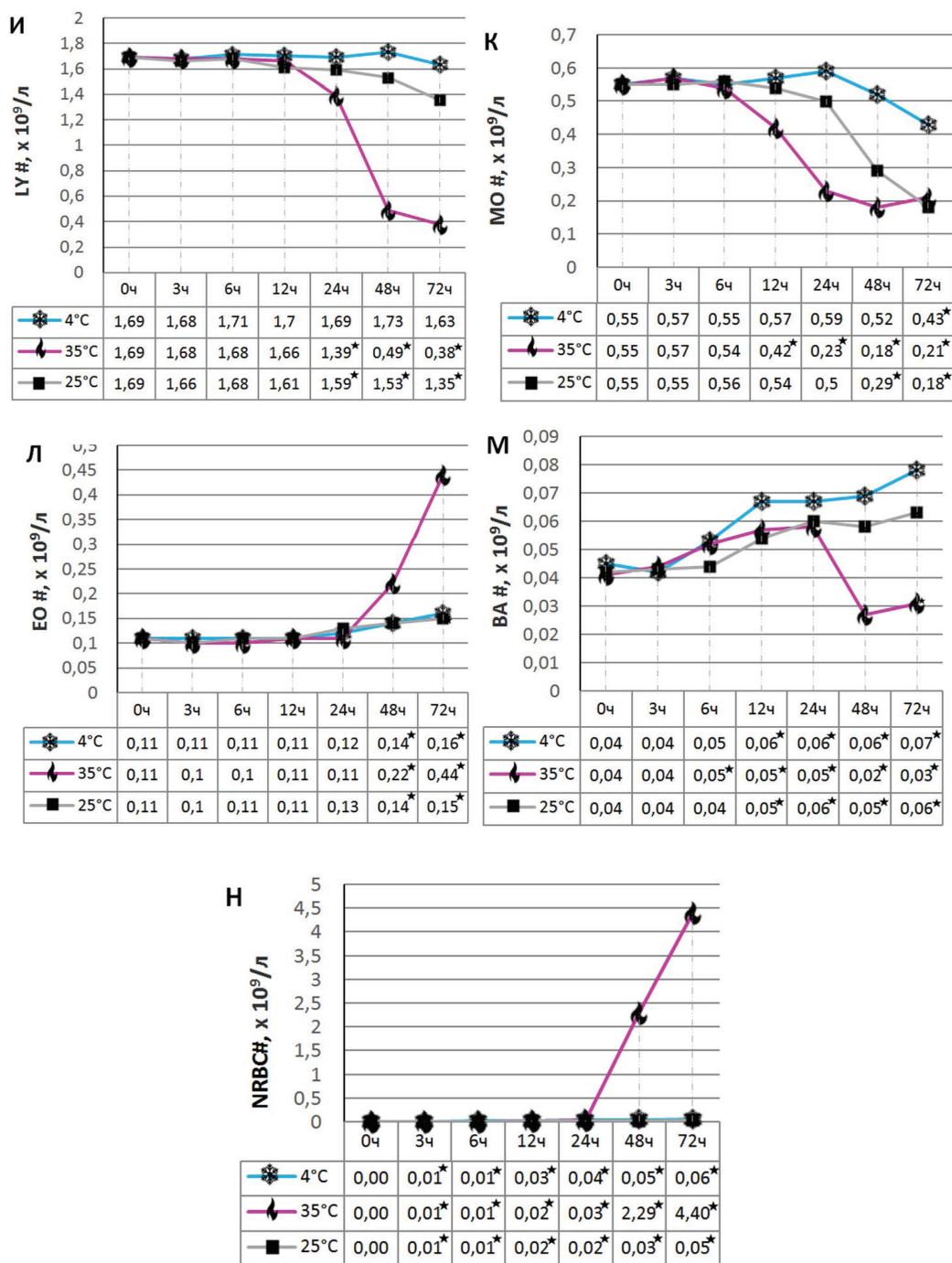


Рис. 1. Сравнение медианных значений лейкоцитарных показателей между исходным образцом (0 ч) и образцами, хранившимися 3, 6, 12, 24, 48 и 72 часа при различных режимах: комнатная температура 25 °С (серая кривая), нагревание до 35 °С (красная кривая) и охлаждение до температуры 4 °С (синяя кривая).

★ — статистически значимая разница,  $p < 0,05$  (тест совпадающих пар Уилкоксона).

базофилов и снижение содержания моноцитов с течением времени.

Исследования, проведенные с использованием линейки приборов фирмы Sysmex, частично подтверждают выводы из нашего эксперимента. Изменения, наблюдавшиеся нами в количественных и качественных характеристиках нейтрофилов и моноцитов согласуются с теми, о которых сообщали E. Monica de Vasca и соавт. [18], используя Sysmex ХЕ-2100 с выдержкой

образцов в течение 4 дней при комнатной температуре. Однако концентрация и относительное количество лимфоцитов в этой работе оставались без статистически значимых изменений. Содержание эозинофилов, базофилов, относительное и абсолютное число нормобластов показали наименьшую степень изменения в течение всего периода исследования.

Сходные с нашими выводами результаты получены в работе A. Joshi и соавт. [7], проведенной на анализа-

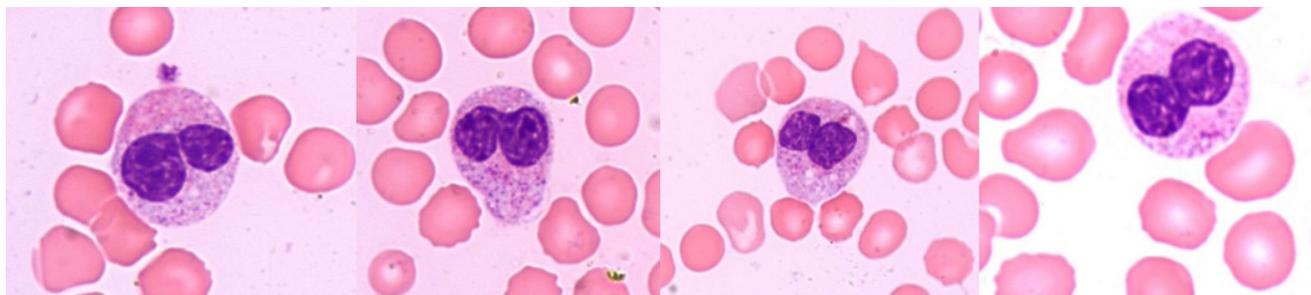


Рис. 2. «Псевдопельгеризация» нейтрофилов.  
Здесь и на рис. 3-10: окраска по Романовскому – Гимзе. Ув. x1000.

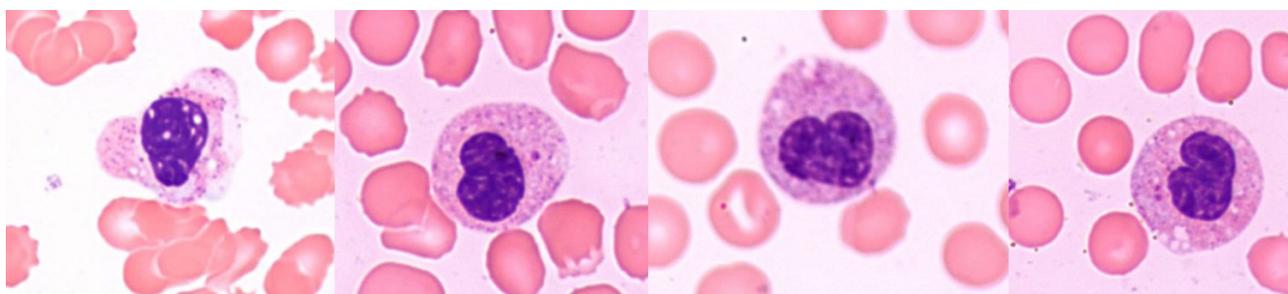


Рис. 3. «Псевдомолодые» формы нейтрофилов.

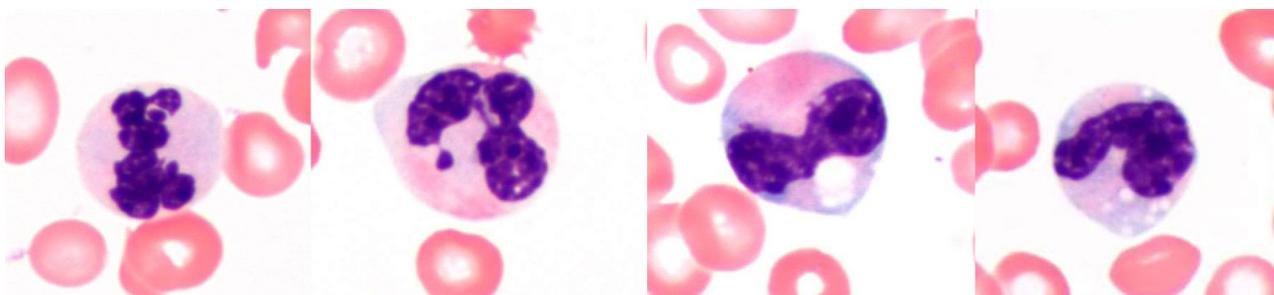


Рис. 4. Дегрануляция и вакуолизация нейтрофилов.

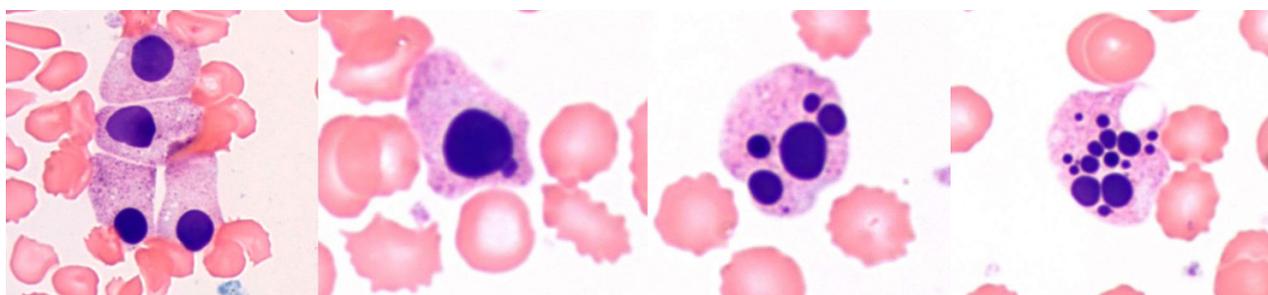


Рис. 5. Кариопикноз и кариорексис нейтрофилов.

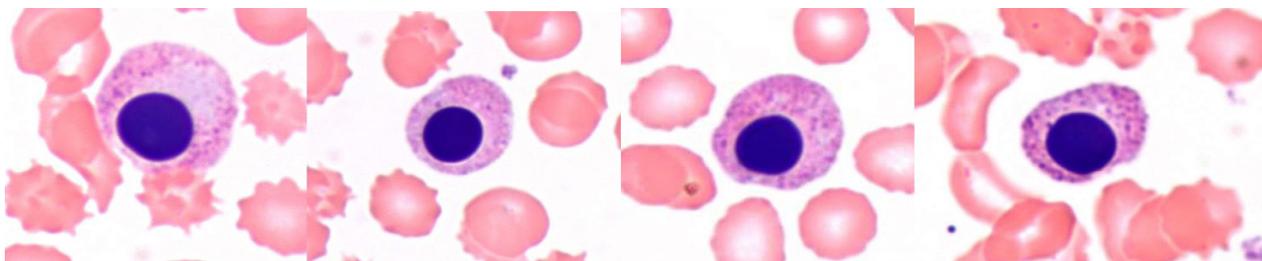


Рис. 6. NRBC-подобные клетки нейтрофильного происхождения. Заметны остатки нейтрофильной цитоплазматической гранулярности.

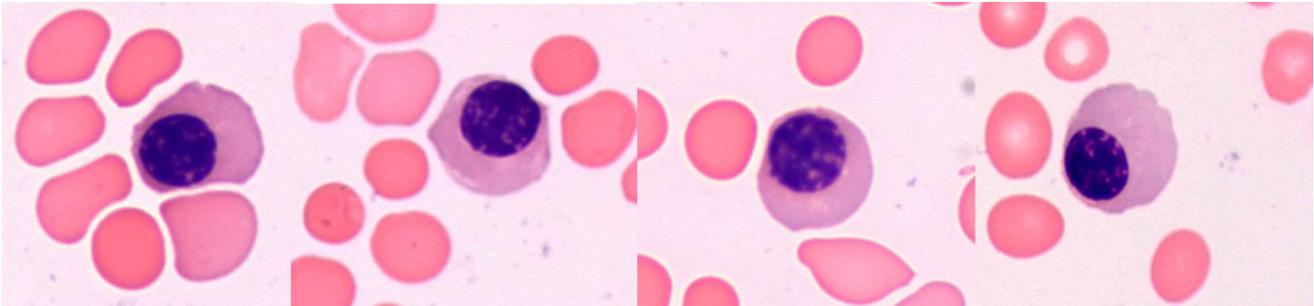


Рис. 7. Оксифильные нормобласты.

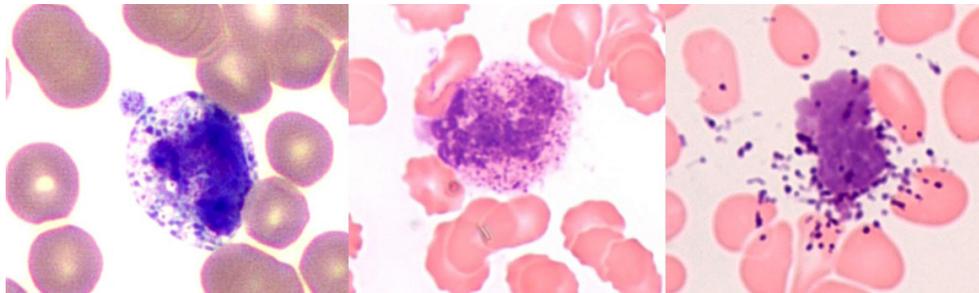


Рис. 8. Дегенерация базофилов: дегрануляция, разрушение плазмолеммы, цитоллиз.

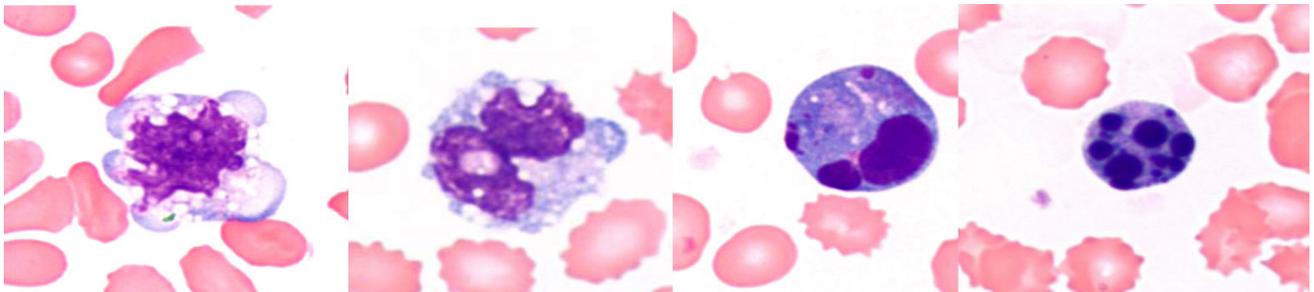


Рис. 9. Разные стадии дегенеративных изменений моноцитов: вакуолизация, усиленная ядерная лобуляция, дезинтеграции ядер, кариопикноз и кариорексис.

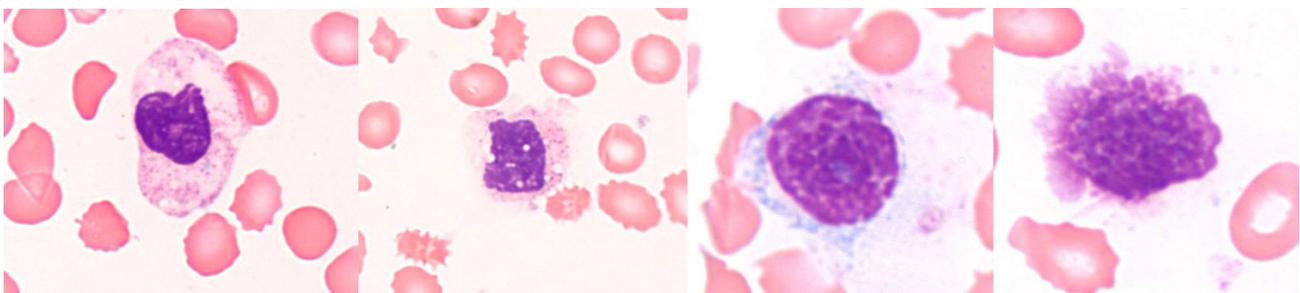


Рис. 10. Неклассифицированные клетки и клетки-тени.

торе SYSMEX XE-5000. Данные автоматизированных дифференциальных лейкоцитарных параметров были стабильными до 72 ч в условиях хранения образцов при 4 °С в холодильнике, тогда как стабильность лейкоцитарных показателей при комнатной температуре хранения (25 °С) до 72 ч была приемлемой только для эозинофилов и базофилов. После 24 часов выдержки образцов при 25 °С А. Joshi и соавт. наблюдали прогрессивное снижение количества моноцитов и лимфо-

цитов, на фоне чего содержание нейтрофилов неуклонно росло. Количество ядросодержащих эритроцитов (NRBC) оставалось стабильным с течением времени вне зависимости от условий хранения.

D. Gunawardena и соавт. [19], используя Sysmex XS-500i, определили, что при температуре  $23 \pm 2$  °С количество нейтрофилов, лимфоцитов и эозинофилов оставалось стабильным вплоть до окончания эксперимента (48 часов). Было показано снижение количества

моноцитов, которое не было статистически значимым ( $p > 0,05$ ). Статистически значимое увеличение было обнаружено лишь в количестве базофилов после 24 ч хранения в условиях комнатной температуры. При температуре хранения  $32 \pm 2$  °C достоверное снижение количества моноцитов и увеличение эозинофилов начались через 24 ч хранения, тогда как содержание базофилов возросло через 6 часов.

S. Buogo и соавт. [20] исследовали 10 нормальных и 40 аномальных образцов крови с выполнением измерений на Sysmex XN-9000 через 2, 4, 6, 8, 24, 36 и 48 часов, храня пробирки при комнатной температуре (25 °C) и при 4 °C. Они обнаружили, что исходные значения количества лейкоцитов и параметры лейкоцитарной формулы не демонстрировали статистически значимых изменений в течение всего периода исследования в подгруппе нормальных образцов. В группе аномальных образцов статистический анализ выявил значимое увеличение содержания эозинофилов после 8 ч хранения при 4 °C.

При анализе научной литературы были приняты во внимание несколько исследований, в которых применялись приборы Cell-Dyn корпорации Abbott Diagnostics. В работе O.S. Unalli и соавт. [2] с использованием Cell-Dyn 3700 указывается, что количество нейтрофилов и эозинофилов уменьшилось, а содержание лимфоцитов и базофилов увеличилось после 12 ч хранения при 23 °C. При этом концентрация в крови лейкоцитов, моноцитов, лимфоцитов, базофилов и эозинофилов была стабильна в течение 48 часов, если образцы крови хранились при 4 °C или 10 °C.

Ранее В.L. Wood и соавт. [21], используя Cell-Dyn 3500, также отметили снижение количества нейтрофилов и увеличение лимфоцитов и базофилов через 24 ч хранения при комнатной температуре.

Довольно высокие результаты стабильности показателей лейкоцитарной формулы получены в другой работе при использовании анализатора BC-6800 фирмы Mindray. Авторами установлено, что при хранении образцов в условиях комнатной температуры (25 °C) статистически значимые изменения регистрировались лишь для количества эозинофилов через 8 ч и концентрации моноцитов в 48-часовой временной точке [20].

Как видно, при сравнении результатов, приведенных в указанных выше статьях, обнаруживаются многочисленные расхождения. Это может объясняться различиями в используемых технологиях гемцитометрии, размере выборки и/или типе выборки – (собирались нормальные и/или патологические образцы), а также отличиями преаналитических процедур в разных исследованиях. В анализаторах Mindray BC-6800 и Sysmex XN-2000 используются флуоресценция и светорассеяние, а в анализаторе Beckman Coulter LH750 – импеданс, электропроводность и светорассеяние. Аналогично O. Cierpela и соавт. [22] показали, что результаты подсчета лейкоцитов плохо согласуются между тремя гематологическими анализаторами: Mindray BC-6800, Sysmex XN-2000 и Beckman Coulter LH750. Также в этой работе подсчет моноцитов не показал удовлетворительного согласия между тремя исследованными анализаторами, а корреляция между гемцитометрами по количеству базофилов была низкой. Исходя из этого, напрашивается вывод о том, что образцы

от одного пациента в динамике должны анализироваться в одной и той же лаборатории с измерением на том же оборудовании.

**Заключение.** На основании полученных результатов гемограммы и, в частности, дифференцировки анализатором лейкоцитов на популяции, врачом-лаборантом принимается решение о проведении ручного микроскопического анализа периферической крови. Таким образом, информация, полученная с гематологического анализатора, не должна оставлять сомнений, поскольку ручная проверка полученного результата трудоемка и занимает много времени.

Поэтому задача современных гематологических лабораторий состоит в том, чтобы оптимизировать отбор образцов, для которых необходим дальнейший микроскопический анализ мазка, причем количество ложноположительных результатов должно быть минимальным.

Следует подчеркнуть, что получение образцов «с истекшим сроком хранения» встречается относительно часто в практике централизованной лаборатории, что может показывать ненадежные результаты, которые зачастую не отражают фактического состояния здоровья человека и могут поставить под сомнение клинические решения.

На основании результатов данного исследования можно сделать заключение, что при использовании технологии VCS даже через 12 ч образец может дать недостоверный результат дифференциального анализа лейкоцитов, если образец хранился при 25 °C или 4 °C. В условиях хранения пробирок при 35 °C стабильность отдельных параметров теряется уже через 6 часов.

Информация о стандартизации сбора, хранения и передачи образцов крови в лабораторию для гематологических исследований была опубликована ICSH еще в 2002 году [23]. В ней говорится, что поскольку морфологические изменения клеток в образцах крови с антикоагуляцией начинаются в течение 30 мин после взятия, то анализы должны быть выполнены в течение максимум 4-х часов, если кровь хранится при комнатной температуре (18-25 °C), и в течение 6 ч, если образец хранится при 4 °C. В данной работе мы подкрепляем эти рекомендации экспериментальными исследованиями влияния продолжительности хранения крови на показатели, и полученные нами результаты являются аргументом в пользу установления ограничений, необходимых для транспортировки образцов крови.

Из результатов нашего исследования вытекает ряд практических советов для лабораторий, использующих гематологические анализаторы с технологией VCS для дифференциального анализа лейкоцитов:

- на этапе приема и регистрации пробирок сотрудники лаборатории могут принять решение о выбраковке отдельных «старых» образцов;
- для образцов, взятых более 24 часов, которые не маркируются флагом с анализатора «Aged sample», в отчете по результатам ОАК с лейкоцитарной формулой можно сообщать только значения стабильных параметров. В этом случае вместо результатов нестабильных параметров может быть помещен комментарий типа «образец хранился \_\_ часов/дней, результаты \_\_ тестов могут быть недостоверны» или «не удалось получить достоверные результаты по \_\_ параметрам/тестам из-за того, что забор образца был \_\_ часов/дней назад»;
- для образцов, которые флагируются сигнальным

сообщением с анализатора «Aged sample» целесообразно выдавать результат только клинического анализа крови «СВС» без лейкоцитарной формулы. Исходя из результатов данного эксперимента и опыта нашей лаборатории, во всех подобных образцах при микроскопии определяется разрушение и дегенерация подавляющего числа лейкоцитов. При неопытности врача обнаружение «псевдомолодых» апоптотически измененных лейкоцитов и псевдопельгеризация гранулоцитов при микроскопии могут быть расценены как сдвиг лейкоцитарной формулы влево до палочкоядерных или более молодых форм;

- взятие образцов крови от гематологических пациентов необходимо осуществлять в пункте забора медицинской организации, в лаборатории которой и будет выполняться общий анализ крови. Должны быть исключены хранение и транспортировка в централизованную лабораторию таких проб. В первую очередь, это касается пациентов с подозрением на МДС;

- так, как наши результаты доказывают, что хранение крови при 4 °С продлевают стабильность образца для всех показателей лейкоцитарной формулы, то необходимо использовать системы охлаждения при транспортировке пробирок, в особенности из отдаленных мест и, тем более, в летний сезон;

- в продолжение данного эксперимента возможно формулирование и исследование новых количественных коэффициентов, отражающих возраст образцов и, соответственно, достоверность результатов ОАК;

- для настоящего исследования мы отбирали только здоровых пациентов. В патологических образцах, вероятно, разрушение клеток наступает раньше и выражено в большей степени, что является предметом дальнейшего научного поиска.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Doelman M.J., Esseveld A., Huisman A., de Roock S., Tiel Groenestege W.M. Stability and comparison of complete blood count parameters between capillary and venous blood samples. *International journal of laboratory hematology* [Internet]. 2023 May 2; 45(5):659–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/ijlh.14080>.
- Unalli O., Ozarda Y. Stability of hematological analytes during 48 hours storage at three temperatures using Cell-Dyn hematology analyzer. *Journal of medical biochemistry* [Internet]. 2021; 40(3):252–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.5937/jomb0-27945>.
- Kadam P., Patil N., Mane V.P. Study of refrigerated storage of blood at 4°C on automated hematological parameters and morphological changes in peripheral blood smear: A prospective study. *Indian journal of pathology and oncology* [internet]. 2023 Mar 15; 10(1):9–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.18231/j.ijpo.2023.003>.
- Kayadibi H., Acar I.A., Cam S. Stability of complete blood count parameters depends on the storage temperature, storage time, transport position and selected stability criterion. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* [internet]. 2020 Jun 28; 80(6):470–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/00365513.2020.1783570>.
- Tak T., Tesselaar K., Pillay J., Borghans J.A., Koenderman L. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *Journal of leukocyte biology* [internet]. 2013 Oct 1; 94(4):595–601. Available from: <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.1112571>.
- Squier M.K., Sehnert A.J., Cohen J.J. Apoptosis in leukocytes. *Journal of leukocyte biology* [internet]. 1995 Jan 1; 57(1):2–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jlb.57.1.2>.
- Joshi A., McVicker W., Segalla R., Favaloro E., Luu V., Vanniasinkam T. Determining the stability of complete blood count parameters in stored blood samples using the SYSMEX XE5000 automated haematology analyser. *International journal of laboratory hematology* [internet]. 2015 Jun 6; 37(5):705–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/ijlh.12389>.
- Imeri F., Herklotz R., Risch L., Arbeitsleitner C., Zerlauth M., Risch G.M. et al. Stability of hematological analytes depends on the hematology analyser used: A stability study with Bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100. *Clinica chimica acta* [internet]. 2008 Nov; 397(1–2):68–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2008.07.018>.
- Kennedy J.B., Machara K.T., Baker A.M. Cell and platelet stability in disodium and tripotassium EDTA. *American Journal of Medical Technology*. 1981 Feb; 47(2):89–93. PMID: 6784575.
- Vives Corrons J., Briggs C., Simon Lopez R., Albareda S., de la Salle B., Flegar Meatrii Z. et al. Effect of EDTA anticoagulated whole blood storage on cell morphology examination. A need for standardization. *International journal of laboratory hematology* [internet]. 2013 Dec 12; 36(2):222–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/ijlh.12170>.
- Lestari A.A., Karyana I.P., Wande I.N. Difference in sodium and potassium reading by blood gas analyzer and electrolyte analyzer at Sanglah Hospital Denpasar, Bali, Indonesia. *Journal of global pharmaceutical technology*. 2018; 10(7):44–48.
- Saraste A. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular research* [internet]. 2000 Feb; 45(3):528–37. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00384-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00384-3).
- WHO classification: tumours of the haematopoietic and lymphoid tissues (2008). *Postgraduate haematology* [internet]. 2015 Nov 6; 885–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118853771.ch51>.
- Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Thiele J. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (revised 4th edition). *IARC, Lyon: International agency for research on cancer*, 2017. 585 c.
- Oztas B. Leukocyte stability in hemogram samples waiting at room temperature. *International journal of medical biochemistry* [internet]. 2020. Available from: <http://dx.doi.org/10.14744/ijmb.2020.14622>.
- Gulati G.L., Hyland L.J., Kocher W., Schwarting R. Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. *Archives of pathology and laboratory medicine* [internet]. 2002 Mar 1; 126(3):336–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.5858/2002-126-0336-ciabc>.
- Warner B.A., Reardon D.M. A Field Evaluation of the Coulter STKS®. *American journal of clinical pathology* [internet]. 1991 Feb 1; 95(2):207–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/95.2.207>.
- Baca M.E. de, Gulati G., Kocher W., Schwarting R. Effects of storage of blood at room temperature on hematologic parameters measured on Sysmex XE-2100. *Laboratory medicine* [internet]. 2006 Jan 1; 37(1):28–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1309/1eer-k1m0-2qfj-rx6p>.
- Gunawardena D., Jayaweera S., Madhubhashini G., Lokumarakkala D.D., Senanayake S.J. Reliability of parameters of complete blood count with different storage conditions. *Journal of clinical laboratory analysis* [internet]. 2016 Aug 27; 31(2):e22042. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.22042>.
- Buoro S., Mecca T., Seghezzi M., Manenti B., Cerutti L., Dominoni P. et al. Assessment of blood sample stability for complete blood count using the Sysmex XN-9000 and Mindray BC-6800 analyzers. *Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia* [internet]. 2016 Jul; 38(3):225–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.05.010>.
- Wood B.L., Andrews J., Miller S., Sabath D.E. Refrigerated storage improves the stability of the complete blood cell count and automated differential. *American journal of clinical pathology* [internet]. 1999 Nov 1; 112(5):687–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/112.5.687>.
- Ciepiela O., Kotuła I., Kierat S., Sieczkowska S., Podsiadłowska A., Jenczelewska A. et al. A comparison of Mindray BC6800, Sysmex XN2000, and Beckman Coulter LH750 automated hematology analyzers: a pediatric study. *Journal of clinical laboratory analysis* [internet]. 2016 May 17; 30(6):1128–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.21992>.
- Tatsumi N., Miwa S., Lewis S.M. Specimen collection, storage, and transmission to the laboratory for hematological tests. *International journal of hematology* [internet]. 2002 Apr; 75(3):261–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/bf02982039>.