

На правах рукописи

Мининкова Анна Игоревна

**ВОЗМОЖНОСТИ СОВРЕМЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ КЛЕТОЧНОГО
АНАЛИЗА В ОЦЕНКЕ ТРОМБОЦИТОВ И ДЕТЕКЦИИ
БЛАСТНЫХ КЛЕТОК**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

Почтарь Маргарита Евгеньевна, кандидат медицинских наук, доцент

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Бондарь Татьяна Петровна - доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинической биохимии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Иванец Татьяна Юрьевна – доктор медицинских наук, заведующая клинико-диагностической лабораторией ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2020 года в __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.073.05 при ФГБУ «НМИЦ Кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 121552 Москва, ул. 3-я Черепковская, д.15. С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, <http://cardioweb.ru/>

Автореферат разослан «_____» _____ 2019 года

Ученый секретарь диссертационного
совета Д 208.073.05
доктор медицинских наук

Ускач Татьяна Марковна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Развитие новых технологий сопровождается внедрением в практическое здравоохранение высокотехнологичных гематологических анализаторов с широким спектром новых параметров, характеризующие различные клеточные популяции, что требует анализа их клинической значимости. Наиболее актуальным вопросом для мониторинга эффективности терапии онкогематологических заболеваний, протекающих с угнетением гемопоэза и бластозом периферической крови, является контроль восстановления общего количества тромбоцитов и оценка элиминации бластных клеток.

Данные об использовании тромбоцитарных параметров для оценки восстановления тромбоцитопоэза малочисленны и противоречивы [Meintker L., 2017, Dusse L.M. et al., 2015]. Сохраняются вопросы по точности определения тромбоцитарных параметров и по влиянию преаналитических факторов на получение достоверных результатов, что особенно важно при принятии клинического решения о необходимости трансфузии тромбоконцентрата с учетом современных тенденций к централизации лабораторных исследований [Кишкун А.А., 2015, Вавилова Т.В., 2018].

Одной из проблем современной лабораторной диагностики остается выявление бластных клеток. Основопологающим методом диагностики онкогематологического заболевания остается морфологическое исследование препаратов крови и костного мозга с целью выявления бластов [CLSI, H20-A2, 2007; Луговская С.А., Почтарь М.Е., 2016]. Однако проведение химиотерапии сопровождается лейкопенией и низким числом бластных клеток в препаратах. Контроль за элиминацией бластов морфологическим методом становится невозможен [Kim A.H., Lee W. et al, 2014]. Высокочувствительным методом детекции бластных клеток является проточная цитометрия, позволяющая не только выявлять бласты, но и определять их иммунофенотип. Однако данный метод дорогостоящий и требует специальной квалификации персонала. Определение абсолютного числа лейкоцитов и подсчет лейкоцитарной формулы являются составной частью одного из самых распространенных исследований в КДЛ - общего анализа крови. В связи с тем, что общий анализ крови часто выполняется без визуальной оценки препарата, необходимо оценить технологические возможности гематологических анализаторов в детекции

бластных клеток и сигнализации об их появлении. В последние годы появился новый подход к расширенному анализу клеточных популяций периферической крови методом проточной цитометрии – технология Cytodiff (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Применение набора моноклональных антител позволяет не только определять основные субпопуляции лейкоцитов, но и выявлять 4 типа бластных клеток (Xt (Т-бласты), Xb (В-бласты), Xn (миелобласты), Xm (монобласты)) [Kahn J. et al, 2015]. Оценка и определение диагностической ценности новых технологических возможностей анализаторов в детекции бластных клеток позволит в будущем сократить количество пункций костного мозга, проводя мониторинг элиминации бластных клеток на фоне химиотерапии по результатам исследований периферической крови.

Степень разработанности темы исследования

Определение количества тромбоцитов - неотъемлемая часть общего анализа крови. Общий анализ крови – комплексное исследование периферической венозной крови человека, включающее определение количества лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, измерение концентрации гемоглобина в крови, а также расчет ряда индексов. Одним из направлений реформирования лабораторной службы является централизация лабораторных, в том числе и гематологических, исследований. Данные об особенностях условий транспортировки пробирок (способах и времени), направляющихся на общий анализ крови в централизованные лаборатории крайне малочисленные и скудные. Так, в ГОСТ Р 53079.4-2008 приведены данные только по концентрации гемоглобина и количеству эритроцитов, в методических рекомендациях по централизации клинико-диагностических лабораторий [Кишкун А.А., Годков М.А., 2013] упоминаются условия транспортировки пробирок, однако не говорится о факторе времени. Рядом авторов было установлено, что стабильность количества тромбоцитов изменяется в зависимости от метода их определения [Daves M. et al, 2015г; Mannuss S., Kohlschein P. et al, 2016]. Также остается открытым вопрос, зависит ли точность определения тромбоцитов от метода, используемого на современных высокотехнологичных гематологических анализаторах. В 2001 г. Международный комитет по стандартизации в гематологии (ICSH) и Международное общество Лабораторной гематологии (ISLH) рекомендовали считать референсным методом подсчета числа тромбоцитов проточную цитометрию с

использованием моноклональных антител к рецепторным маркерам CD41 и CD61. На сегодняшний момент существует три автоматизированных метода определения числа тромбоцитов (импедансный, оптический, иммунологический). Иммунологический метод наиболее близок к референсному, поскольку в его технологии используются моноклональные антитела к антигену CD61 поверхности тромбоцитов [Briggs, 2007, Grimaldi E, Del Vecchio L et al IJLH, 2009, Kim SY, 2010]. Однако основная часть гематологических приборов, которыми оснащены лаборатории, работают по принципам импедансного и/или оптического анализа без использования иммунологического метода. По данным литературы нет точных подтверждений, доказывающих преимущества оптического или импедансного способа подсчета тромбоцитов. Одни авторы говорят о том, что нет разницы между двумя методами [Kim S.Y. с соавт, 2010]. Другие свидетельствуют о том, что в случае тромбоцитопении результаты оптического метода определения количества тромбоцитов лучше коррелируют с методом проточной цитометрии [Tantanate C., Khowawisetsut L., Pattanapanyasat K., 2017, Hummel K., Sachse M., Hoffmann J.J.M.L., van Dun L.P.J.M., 2018].

Одним из новых тромбоцитарных параметров является определение числа ретикулярных (незрелых) тромбоцитов (РТ). Существенный вклад в изучении проблемы агрегации РТ внес Thompson C.B. с группой авторов в 80-е гг XX века. По литературным данным РТ являются функционально активными. До настоящего времени их количество рассматривается в первую очередь как один из маркеров тромбоцитарных осложнений сердечно-сосудистых заболеваний [Hannawi B. et al 2018; Nagareddy P.R. et al., 2018, Murphy S.J.X. et al, 2018]. Данные об использовании РТ для оценки восстановления тромбоцитопоэза малочисленные и противоречивые [Dusse L.M. et al., 2015, Meintker L., 2017].

Современные гематологические анализаторы имеют систему флажирования при обнаружении бластных клеток в периферической крови. В специальной литературе упоминается только использование «флагов» в детекции бластных клеток, но не затрагиваются вопросы мониторинга элиминации бластных клеток при ряде заболеваний, их выявления в зависимости от видовой принадлежности [Depoorter M., Goletti S., Latinne D., Defour J., 2015; Rabizadeh E., Pickholtz I. et al, 2015]. В то же время метод проточной цитометрии позволяет быстро

и надежно определить линейную принадлежность бластов с помощью моноклональных антител к различным антигенам дифференцировки миелоидной и лимфоидной направленности. Технология Cytodiff™ предназначена для дифференциального подсчета лейкоцитов. Данный метод является многообещающим [Kim A.H., Lee W. et al, 2014; Vazquez R., Roussel M. et al, 2018]. Однако статьи, посвященные работе с технологией Cytodiff™, малочисленны и в них не затрагивается вопрос мониторинга бластных клеток в ходе химиотерапии у гематологических больных.

Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования является оценка возможностей новых технологических подходов клеточного анализа тромбоцитов и бластных клеток, используемых в гематологических анализаторах и проточных цитометрах.

Для достижения этой цели поставлены следующие задачи:

1. Изучить стабильность тромбоцитарных параметров и точность подсчета числа тромбоцитов гематологическими анализаторами с использованием различных технологий у практически здоровых людей и при тромбоцитопении.

2. Изучить особенности выявления бластных клеток гематологическим анализатором, использующим оптический и цитохимический методы, а также проточным цитометром с применением технологии Cytodiff™.

3. Определить значимость параметров гематологического анализатора и метода проточной цитометрии с использованием технологии Cytodiff™ для оценки элиминации бластных клеток пациентов с острыми миелоидными лейкозами на фоне химиотерапии.

4. Исследовать возможности применения параметра относительного числа незрелых (ретикулярных) тромбоцитов как маркера восстановления тромбоцитопоэза у пациентов с острыми миелоидными лейкозами на фоне химиотерапии.

Научная новизна работы

- Доказана высокая информативность метода детекции бластных клеток с применением технологии Cytodiff™ при первичной диагностике и мониторинге терапии у пациентов с острым миелоидным лейкозом. Чувствительность метода Cytodiff™ к детекции бласт-

ных клеток на основе параметра %Xn составляет 85%, специфичность 100%. Это позволяет использовать его для мониторинга терапии острых миелобластных лейкозов ($r_s=0,798$ с морфологическим методом). Однако при остром миеломонобластном лейкозе оценку элиминации бластных клеток рекомендуется проводить по совокупности значений %Xn и %моноцитов ($r_s=0,606$ с морфологическим методом).

- Предложен новый критерий оценки эффективности химиотерапии на ранних сроках лечения пациентов с острым миелоидным лейкозом по коэффициенту элиминации бластов. Достоверное снижение этого показателя более чем в два раза на 4-6 день (КЭ 0,5) проведения индукционного курса химиотерапии выявило высокую корреляцию с достижением полной ремиссии ОМЛ, устанавливаемой на основании Национальных клинических рекомендаций 2014 года.
- Предложен и обоснован способ оценки восстановления мегакариопоэза на основе показателя относительного числа ретикулярных тромбоцитов у пациентов с острым миелоидным лейкозом. Результаты исследования установили, что увеличение числа ретикулярных тромбоцитов наблюдается на 7-10 дней раньше увеличения общего количества тромбоцитов ($p<0,01$) после проведения консолидирующего курса химиотерапии ОМЛ.

Практическая значимость работы

Доказанная точность определения количества тромбоцитов оптическим методом при тромбоцитопениях позволит в практической деятельности врачам клинических специальностей сократить количество уточняющих повторных исследований, уменьшить число необоснованных трансфузий. Уточнены временные и температурные факторы, влияющие на стабильность общего количества тромбоцитов, измеренных различными методами, и ряда тромбоцитарных параметров. Применение параметра РТ может иметь диагностическую значимость для оценки тромбоцитопоэза и его восстановления после химиотерапии.

Выявление бластных клеток и мониторинг их элиминации с помощью современных технологий клеточного анализа позволит оценить эффективность проводимой терапии.

Оценка новых технологий в детекции бластных клеток даст возможность сократить количество пункций костного мозга, мониторируя элиминацию бластных клеток на фоне химиотерапии по резуль-

татам исследований периферической, не прибегая к трудоемкому микроскопическому исследованию.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно проведен анализ современной отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационной работы, сформулирована проблема, требующая разрешения, обоснована степень ее разработанности. В результате чего, определен методологический подход, выполнен сбор и анализ клинических и лабораторных данных, проведены лабораторные исследования, посвященные сравнению методов определения тромбоцитов, изучению их стабильности и выявлению бластных клеток, оценены и интерпретированы полученные результаты. Соискателем лично сформирована база данных и проведена статистическая обработка материала, сформулированы положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации, подготовлены публикации по теме выполненной работы.

Внедрение в практику

Предложения по применению оптического метода определения количества тромбоцитов при тромбоцитопениях, показателя РТ в качестве раннего маркера восстановления тромбопоэза, использованию коэффициента элиминации бластных клеток для мониторинга и оценки эффективности лечения острого миелоидного лейкоза внедрены в клиническую практику ГБУЗ ГКБ им С.П.Боткина ДЗМ (акт внедрения от 20.05.2019).

Полученные результаты включены в учебные планы программ подготовки ординаторов, циклов профессиональной переподготовки и повышения квалификации врачей по направлению «Клиническая лабораторная диагностика» на кафедре клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (акт внедрения от 29.10.2018).

Апробация работы

Проведение диссертационного исследования одобрено Комитетом по этике научных исследований, протокол №8 от 25 сентября 2018 года.

Апробация диссертационной работы проведена на расширенном заседании кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО РМАНПО 17 июня 2019 г. (Протокол № 03/19). Материалы дис-

сертации доложены и обсуждены на VII научно-практической конференции «Современные технологии и методы диагностики различных групп заболеваний, лабораторный анализ» 14 мая 2014 г Москва; на IX межрегиональной научно-практической конференции «Современная лабораторная медицина: эффективность, доступность, качество» 24-25 мая 2016 г Москва, на IV Российском конгрессе лабораторной медицины 3-5 октября 2018г Москва.

По теме диссертации автором опубликовано 11 научных работ, из них в научных рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ – 10 работ.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 131 страницах машинописного текста, иллюстрирована 16 таблицами, 36 рисунками. Работа состоит из введения, пяти глав, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Библиографический указатель включает 121 источник, из которых 16 отечественных и 105 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Клиническая характеристика пациентов и методов исследования

Материалом исследования служила цельная венозная кровь, стабилизированная антикоагулянтом К₂-ЭДТА. Образцы крови были получены у практически здоровых людей и пациентов отделения переливания крови (зав., к.м.н., Костин А.И) и 6-ого гематологического отделения (зав. Хуажева Н.К) многопрофильной ГБУЗ ГКБ им С.П.Боткина ДЗМ. Образцы крови исследовались в тот же день, в течение двух часов после взятия. Мониторинг изменения тромбоцитарных параметров проводился при комнатной температуре +20°C - +22°C в течение первого часа после взятия (точка 0 ч), через 1 ч, 2 ч и через 24ч после первого измерения.

В работе проанализировано в общей сложности 117 образцов венозной крови практически здоровых людей (91 мужчина, 26 женщин), обследованных в отделении переливания крови ГБУЗ ГКБ им С.П.Боткина ДЗМ с мая по июль 2015 г. Пробы исследовались в четырех различных аналитических сериях для исключения случайной ошибки. При изучении стабильности тромбоцитарных параметров из 117 образцов - 63 были исследованы в 0 ч, через 1 ч и через сутки, 27 образцов в 0 ч, через 1 ч, через 2 ч, 17 образцов во всех четырех временных интервалах, 10 образцов в 0 ч, через 1 ч.

Число тромбоцитов подсчитывалось тремя методами (импедансным (PLT-I), оптическим (PLT-O) и иммунологическим (ImmPLT)) в 117 образцах венозной крови практически здоровых людей и в 96 пробах от 34 пациентов (15 мужчин, 19 женщин), госпитализированных в ГБУЗ ГКБ им С.П.Боткина ДЗМ в октябре 2016 г и в период с марта 2017 г по декабрь 2017 г с различными гематологическими заболеваниями (множественная миелома, лимфома, хронический лимфолейкоз, миелодиспластический синдром, острый миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз). В 80 образцах количество тромбоцитов было менее $150 \cdot 10^9/\text{л}$ и в 16 образцах количество тромбоцитов соответствовало референтному интервалу ($150\text{-}450 \cdot 10^9/\text{л}$).

С целью выявления и элиминации бластных клеток, оценки применения параметра РТ как маркера восстановления тромбоцитопоэза исследовалась периферическая кровь 58 пациентов (30 мужчин, 28 женщин) с первично выявленным острым миелоидным лейкозом (ОМЛ). Диагноз установлен в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Лечение проводилось в 6-ом гематологическом отделении ГБУЗ ГКБ им С.П. Боткина ДЗМ с февраля 2017 г по август 2018 г.

Критерии включения в клиническую часть исследования:

1. Практически здоровые люди, обследованные в отделении переливания крови;
2. Пациенты с различными гематологическими заболеваниями, которые сопровождаются тромбоцитопенией;
3. Пациенты с первично выявленным ОМЛ, подтвержденными морфологическим, иммунофенотипическим, цитогенетическим или молекулярно-генетическим исследованиями костного мозга/крови, у которых бластные клетки обнаружены в периферической крови;
4. Информированное согласие на участие в исследовании в письменной форме.

Критерии исключения из клинической части исследования:

1. Пациенты с вторичным ОМЛ.
2. Пациенты с острым промиелоцитарным лейкозом
3. Пациенты с не верифицированным диагнозом.
4. Отказ пациента от участия в исследовании.

У 58 пациентов ОМЛ вариант М1/М2 (острый миелобластный лейкоз (ОМБЛЛ)) установлен в 41 случаях, ОМЛ вариант М4/М5 (острый миеломонобластный лейкоз (ОММЛ)) – в 17 случаях по FAB-классификации. При проведении первого индукционного курса пробы проанализированы на 1, 4-6, 7-8, 15-16, 21-23, 28-35 день с начала химиотерапии. При проведении курса консолидации к предыдущим точкам измерения добавлялась еще одна – 36-43 день. Всего было проанализировано 311 проб.

Сравнение методов подсчета числа тромбоцитов, оценка стабильности показателей количества тромбоцитов и относительного числа РТ во времени проводилось на гематологическом анализаторе Cell-Dyn Sapphire (Abbott, США). Особенности выявления бластных клеток были проанализированы на гематологическом анализаторе ADVIA 2120/2120i (Siemens, Германия), проточном цитометре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием набора реагентов Cytodiff™. В качестве «золотого стандарта» обнаружения бластных клеток использовались морфологический и цитохимический (определение миелопероксидазы (МПО)) методы.

Статистический анализ результатов исследования проводился на программе GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., США).

Диагностические характеристики различных методов выявления бластных клеток (чувствительность и специфичность) рассчитывали с помощью четырехпольной таблицы. При расчете использовались следующие формулы:

Чувствительность = доля истинноположительных = ИП/(ИП+ЛО) (1)

Специфичность = доля истинноотрицательных = ИО/(ЛП+ИО) (2)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Аналитические возможности современных гематологических анализаторов в количественной оценке тромбоцитов

Результаты суточного мониторинга показателей общего количества тромбоцитов, измеренных оптическим (PLT-O) и импедансным (PLT-I) методами, средний объем тромбоцитов (MPV) и тромбокрит (PCT) представлены в табл. 1. Через сутки после взятия периферической венозной крови наблюдались достоверные изменения следующих показателей: PLT-O, уменьшилось на 2,7%, MPV увеличился на 3,8%.

Таблица 1. Изменение тромбоцитарных параметров в течение первого часа после взятия (точка 0 ч), через 1 ч и через сутки.

Наименование параметра, N=80	Время после взятия крови, ч							
	0		1			24		
	Mean (SD)	95% ДИ	Mean (SD)	95%ДИ	p	Mean (SD)	95%ДИ	p
PLT-O, $\times 10^9/\text{л}$	260 (58)	247-273	256 (56)	244-269	p<0,05	253 (59)	239-266	p<0,0001
PLT- I, $\times 10^9/\text{л}$	252 (60)	239-266	253 (56)	240-265	NS	257 (56)	245-270	NS
MPV, фл	7,8 (0,8)	7,6-8,0	7,8 (0,9)	7,6-8,0	NS	8,1 (0,9)	7,8-8,3	p<0,0001
PCT, %	2,00 (0,35)	1,92-2,08	1,98 (0,34)	1,90-2,06	NS	2,02 (0,4)	1,93-2,11	NS

Результаты мониторинга параметра анизозитоза тромбоцитов (PDW) и относительного количества PT в течение суток представлены в табл. 2.

Таблица 2. Динамика изменения PDW и относительного количества PT в течение первого часа после взятия (точка 0 ч), через 1 ч, 2 ч и через сутки.

Наименование параметра	Время после взятия крови, ч							
	0 (N=117)		1 (N=117)		2 (N=44)		24 (N=80)	
	Me (P ₁₀ -P ₉₀)	Me (P ₁₀ -P ₉₀)	p	Me (P ₁₀ -P ₉₀)	p	Me (P ₁₀ -P ₉₀)	p	
PDW, %	16,1 (15,4-17,2)	16,2 (15,3-17,1)	NS	16,3 (15,2-17,6)	NS	15,8 (15,0-16,8)	NS	
PT, %	2,97 (1,60-6,28)	2,93 (1,17-5,38)	0,026	2,39 (1,20-5,13)	NS	3,22 (1,24-5,57)	NS	

По результатам исследования выявлено, что PDW не изменялся в течение суток, в то время как в течение первых двух часов после взятия крови произошли статистически достоверные изменения относительного числа PT ($p=0,026$). В дальнейшем изменений не наблюдалось. Колебания показателя в начальный период времени составило 1,4%.

Суммируя полученные данные, можно заключить, что хранение проб в вакуумных пробирках с K₂-ЭДТА при комнатной температуре +20°C - +22°C в течение суток не влияет на величину PLT-I, PCT, PDW, а также на показатель PT. В то же время, PLT-O, имеет тенденцию к уменьшению, а MPV - к увеличению. Согласно данным Ricos C, Westgard J, общая допустимая аналитическая ошибка при измерении количества тромбоцитов и MPV составляет 13,4% и 5,84% соответственно, что выше зафиксированных колебаний [<https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>]. Следовательно, значи-

мых изменений данных параметров не было выявлено, они оставались в пределах своих референтных интервалов.

Анализ результатов подсчета общего количества тромбоцитов тремя методами (PLT-O, PLT-I, ImmPLT) в пределах референтного интервала(150-450x10⁹/л)

Результаты статистического анализа общего числа тромбоцитов представлены на рис. 1.

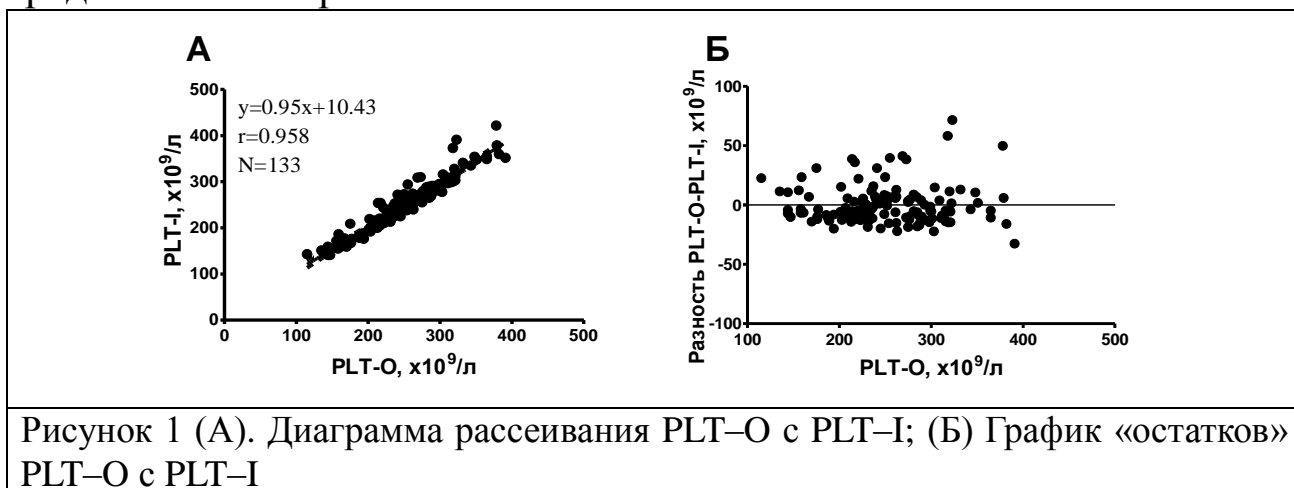


Рисунок 1 (А). Диаграмма рассеивания PLT–О с PLT–I; (Б) График «остатков» PLT–О с PLT–I

Анализ выборки 133 парных значений PLT-O и PLT-I показал, что результаты не отличались друг от друга ($p=0,3611$). Средние значения общего количества тромбоцитов и их стандартное отклонение (σ) равнялось $251 \times 10^9/\text{л}$ ($\sigma=57 \times 10^9/\text{л}$) и $249 \times 10^9/\text{л}$ ($\sigma=60 \times 10^9/\text{л}$) соответственно для PLT-O и PLT-I.

Статистический анализ выборки из 16 парных значений числа тромбоцитов, измеренных одновременно тремя методами, проводился непараметрическими методами в связи с небольшим объемом группы. Парные результаты групп (PLT-O, PLT-I, ImmPLT) достоверно не отличались друг от друга. Оба метода (PLT-O, PLT-I) показали хорошую корреляцию с ImmPLT, $r_s=0,982$ и $r_s=0,993$ соответственно. Результаты представлены на рис. 2.

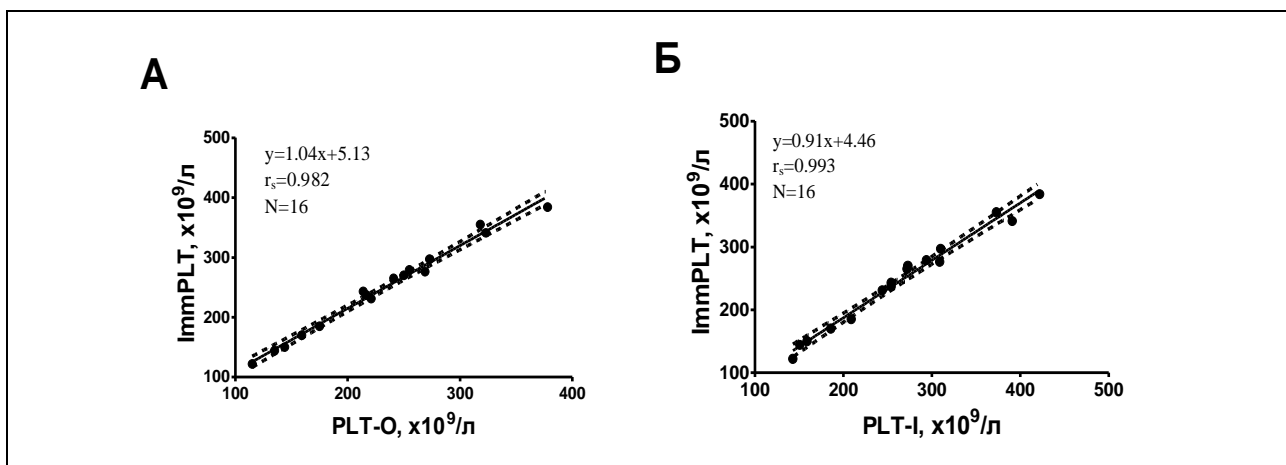


Рисунок 2 (А, Б). Диаграммы рассеивания PLT–О с ImmPLT и PLT–I с ImmPLT.

Таким образом, в пределах референтного интервала ($150-450 \times 10^9/\text{л}$), как оптический, так и импедансный методы измерения количества тромбоцитов равнозначны в своем применении.

Анализ результатов подсчета общего количества тромбоцитов тремя методами (PLT-O, PLT-I, ImmPLT) при тромбоцитопении ($<150 \times 10^9/\text{л}$)

Результаты статистического анализа полученных данных приведены в табл. 3 и на рис. 3. Количество тромбоцитов, измеренные оптическим (PLT-O), импедансным (PLT-I) и иммунологическим (ImmPLT) методами, достоверно отличаются друг от друга. Статистический анализ методом линейной регрессии показал, что коэффициент корреляции и угловой коэффициент линии регрессии PLT-O – ImmPLT ($r_s=0,977; k=1,03$) выше, чем эти показатели PLT-I-ImmPLT ($r_s=0,877; k=0,88$).

Таблица 3. Общее количество тромбоцитов, измеренное одновременно оптическим, импедансным и иммунологическим методами.

Результаты измерения, $\times 10^9/\text{л}$ N=80	PLT-O	PLT-I	ImmPLT
Me ($P_{10} - P_{90}$)	33 (15-83)	46 (24-96)	38 (17-89)

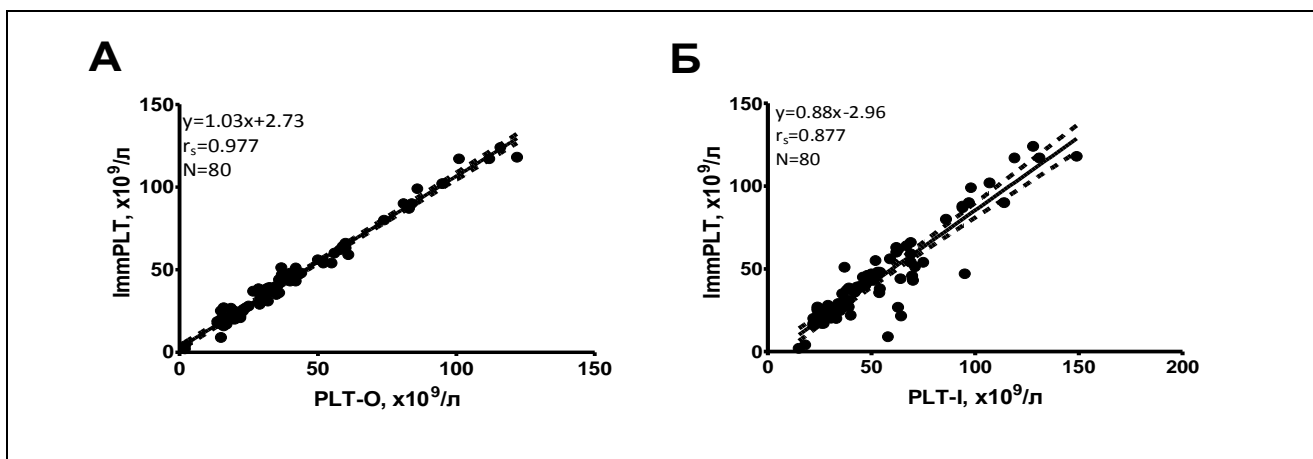


Рисунок 3 (А, Б). Диаграммы рассеивания PLT – О с ImmPLT и PLT – I с ImmPLT.

Ложнозавышенное количество тромбоцитов, измеренное импедансным методом, может привести к увеличению риска возникновения кровотечений вследствие отказа от переливания необходимого количества тромбоконцентрата (рис 4).

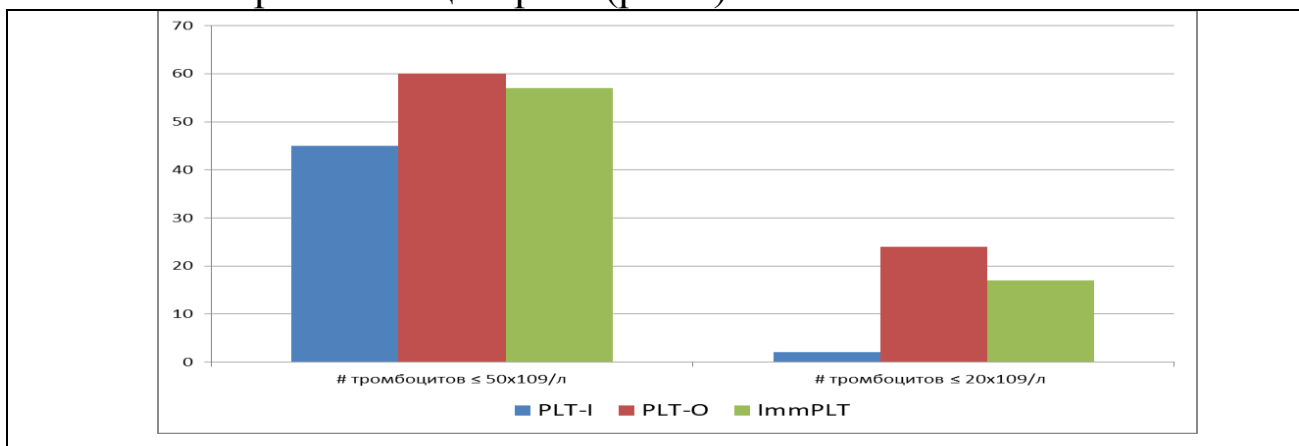


Рисунок 4. Число переливаний тромбоконцентрата в зависимости от метода определения абсолютного числа тромбоцитов на разных уровнях клинической значимости.

Таким образом, в условиях тромбоцитопении ($<150 \times 10^9/\text{л}$) оптический метод подсчета тромбоцитов является предпочтительным.

Аналитические возможности современных технологий в детекции бластных клеток

Сравнительный анализ результатов детекции бластных клеток морфологическим методом и с помощью гематологического анализатора ADVIA 2120/2120i

Идентификация бластных клеток по обнаружению в них миелопероксидазы (МПО – положительные) была проведена у 58 пациентам с ОМЛ. Поскольку распределение клеток по популяциям гематологическим анализатором ADVIA 2120/2120i основано на интенсив-

ности МПО, все пациенты были разделены на три группы в зависимости от числа МПО-позитивных клеток. Распределение пациентов с ОМЛ на группы представлены в табл. 4.

Таблица 4. Распределение пациентов с ОМЛ на группы в зависимости от числа МПО-позитивных бластов.

№№ групп пациентов	Число МПО – позитивных бластов (цитохим. метод), %	Количество пациентов	Число исследованных образцов крови на гем.анализаторе ADVIA 2120/2120i
Группа I	0-29	33	91
Группа II	30-65	10	43
Группа III	>65	15	46

Анализ полученных данных показал, что бластные клетки у пациентов располагаются в разных регионах на скатерограмме гематологического анализатора ADVIA 2120/ 2120i, в зависимости от числа МПО-позитивных бластных клеток (рис. 5). Если число МПО-позитивных бластов было менее 30% (группа I), то бластные клетки регистрировались прибором в зоне крупных неокрашенных миелопероксидазой клеток (LUC) (рис. 5 А). При увеличении числа МПО-позитивных бластов зона их расположения смещалась в регион моноцитов (группа II, рис. 5 Б), и даже в область нейтрофилов (группа III, рис. 5В).

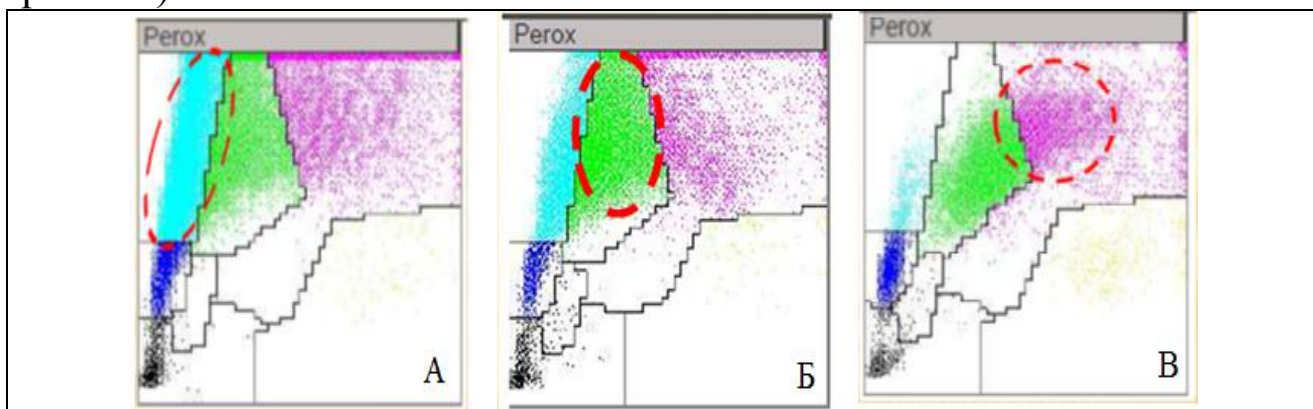


Рисунок 5 (А, Б, В). Скатерограммы распределения бластных клеток на гематологическом анализаторе ADVIA 2120/2120i у пациентов с ОМЛ из первой (А), второй (Б) и третьей (В) группы. Пунктиром обозначены зоны расположения бластных клеток.

Полученные данные и результаты их статистической обработки приведены на рис. 6.

В качестве референсного метода использовался морфологический анализ с подсчетом бластных клеток в окрашенных мазках крови. При изучении распределения бластных клеток на скатерограмме

гематологического анализатора ADVIA 2120/2120i в I группе пациентов выявлена наибольшая корреляция % бластов, подсчитанных визуально, с параметром %LUC ($r_s=0,718$) (рис. 6А).

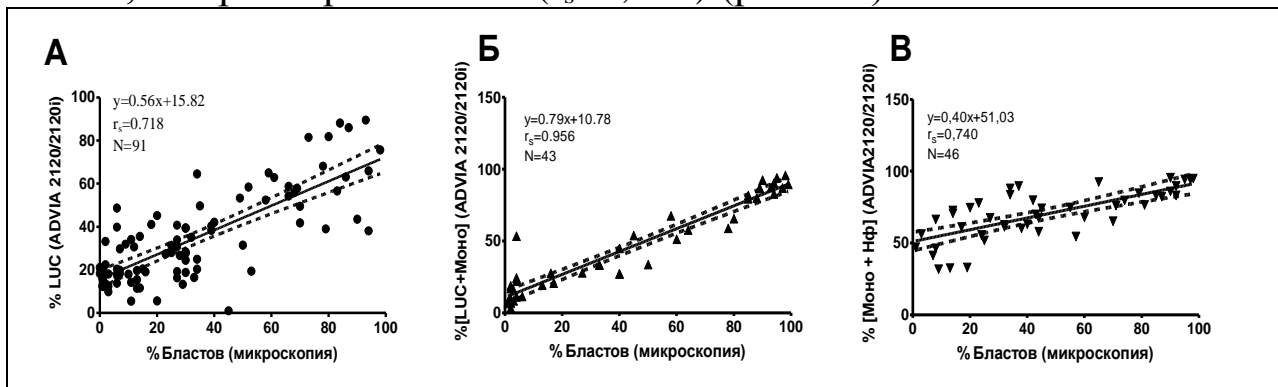


Рисунок 6. Диаграмма рассеивания зависимости процента бластных клеток от (А) параметра % LUC в группе I. (Б) от параметра %[LUC+моноциты] в группе II. (В) от параметра %[моноциты+Нф] в группе III.

Во II группе наибольший коэффициент корреляции микроскопического метода выявления бластных клеток наблюдался с суммарной областью, включающей LUC и моноциты, и составил 0,956 (рис. 6Б). При анализе III группы больных выявлено, что бластные клетки не попадают в область LUC ($r_s=0,029$), а распределяются суммарно в область моноцитов и нейтрофилов ($r_s=0,740$) (рис. 6В).

Суммируя полученные данные, можно заключить, что с увеличением количества МПО-позитивных бластных клеток, они локализуются на скатерограмме не в LUC-области (МПО+/-), а попадают в регион моноцитов (МПО++) и/или нейтрофилов (МПО+++). В ходе мониторинга терапии ОМЛ у пациентов с числом МПО-позитивных бластов ниже 30% возможно использование параметра LUC для оценки снижения числа бластных клеток. В группе больных с количеством МПО-позитивных бластов более 65% контроль за восстановлением нейтрофилов на гематологическом анализаторе ADVIA 2120/2120i невозможен без дополнительного морфологического исследования крови.

Сравнительный анализ результатов детекции бластных клеток морфологическим методом и на проточном цитометре с применением технологии Cytodiff™

В зависимости от варианта ОМЛ в соответствии с Fab-классификацией, выделены две группы пациентов. Первую группу составили 23 пациента с ОМЛ M1/M2 вариантом (ОМБлЛ) (69 исследованных образцов крови), вторую – 11 пациентов с ОМЛ M4/M5 вариантом (ОММЛ) (28 исследованных образцов крови). У всех паци-

ентов с ОМБЛЛ бластные клетки регистрировались в области Xn-бластов (миелобластов) (рис.7).

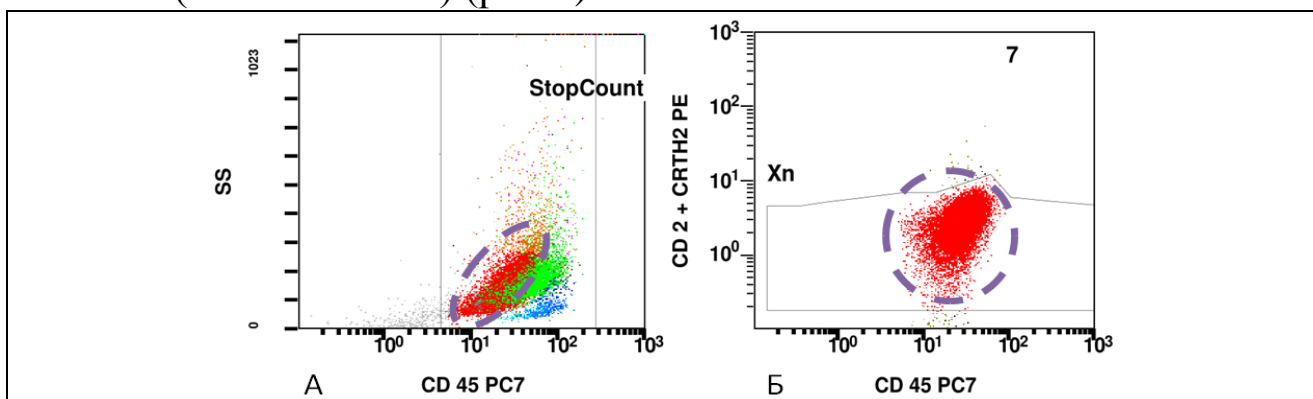


Рисунок 7 (А, Б). Скатерограммы расположения бластных клеток пациентов с ОМБЛЛ, выявленных с использованием технологии Cytodiff™ на проточном цитометре Cytomics FC500. Пунктиром обозначены зоны расположения бластных клеток.

При ОММЛ бласты распределялись между регионом Xn-бластов (миелобластов) и областью моноцитов (рис. 8). При этом морфологическое исследование мазков крови показало, что число моноцитов оставалось в пределах нормы, в то время как количество моноцитов при дифференциальном подсчете лейкоцитов с использованием технологии Cytodiff™ было увеличено.

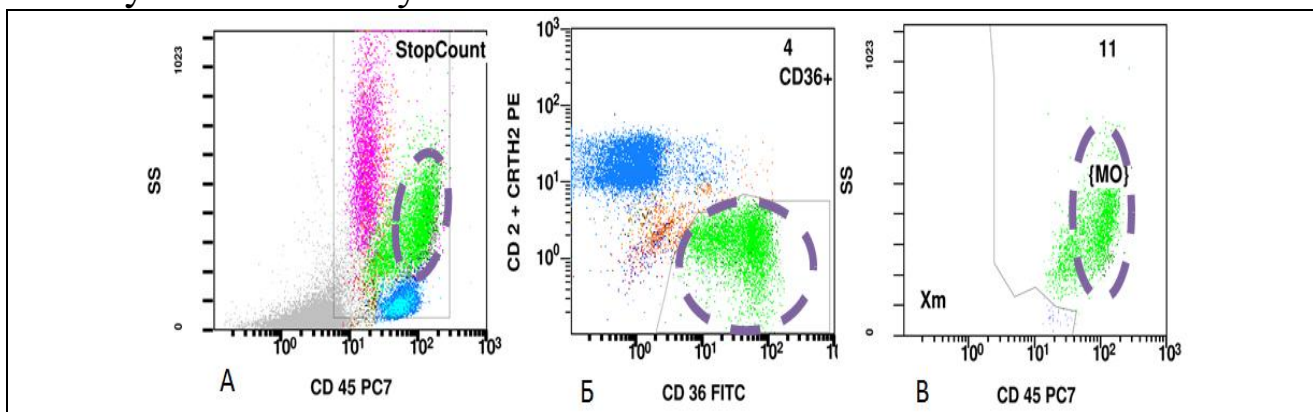


Рисунок 8 (А, Б, В). Скатерограммы расположения бластных клеток пациентов с ОММЛ при использовании технологии Cytodiff™ на проточном цитометре Cytomics FC500. Пунктиром обозначены зоны расположения бластных клеток.

В качестве референсного метода выявления бластов использовался морфологический подсчет бластных клеток в световом микроскопе. В первой группе наибольшую корреляцию с бластами (%), подсчитанными морфологическим методом, показал параметр %Xn ($r_s=0,798$) (рис. 9А). Во второй группе пациентов бластные клетки не попадали в область как Xn-бластов ($r_s=0,089$), так и Xm-бластов($r_s=0,019$). Наибольшая корреляция наблюдалась с суммарной

областью, включающей Хп-бласты и моноциты, и составила 0,606 (рис. 9Б).

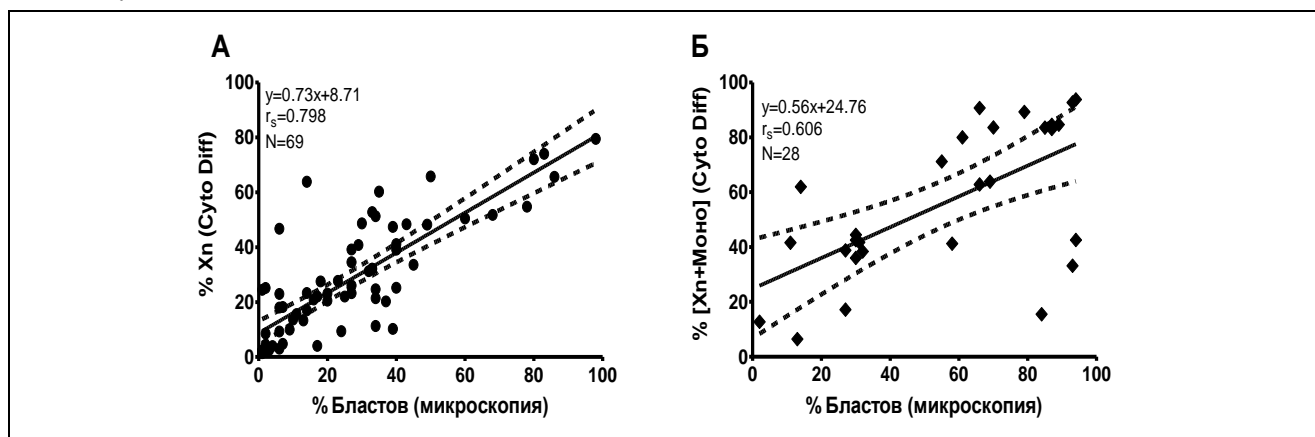


Рисунок 9. Диаграмма рассеивания зависимости процента бластных клеток (А) от параметра %Хп в группе 1. (Б) от параметра %[Хп+Моно] в группе 2.

Таким образом, при ОМБЛ исследование периферической крови с использованием технологии Cytodiff™ позволяет подсчитывать число бластных клеток по параметру Хп. При ОММЛ оценку числа бластных клеток надо проводить, используя сумму значений как Хп-бластов, так и моноцитов. Кроме того, при увеличении Хп-бластов и моноцитов, у пациентов с ОМЛ можно предположить наличие ОММЛ.

Вычисление чувствительности и специфичности для методов выявления бластных клеток путем измерения числа LUC и количества Хп-бластов приведено в табл. 5 и 6 соответственно.

Таблица 5. Четырехпольная таблица для вычисления чувствительности и специфичности метода выявления бластных клеток по показателю %LUC.

морфолог. метод \ %LUC	%LUC		Общее кол-во исследований
	ПОЗИТИВ	НЕГАТИВ	
ПОЗИТИВ	ИП=23	ЛО=21	44
НЕГАТИВ	ЛП=9	ИО=8	17
Общее кол-во исследований	32	29	61

Примечание - ИП- истинноположительные результаты, ЛП – ложноположительные результаты, ЛО – ложноотрицательные результаты, ИО – истинноотрицательные результаты тестов

Таблица 6. Четырехпольная таблица для вычисления чувствительности и специфичности метода выявления бластных клеток по показателю %Xn.

морфолог. метод \ %Xn	позитив	негатив	Общее кол-во исследований
позитив	ИП=28	ЛО=5	33
негатив	ЛП=0	ИО=10	10
Общее кол-во исследований	28	15	43
Примечание - ИП- истинноположительные результаты, ЛП – ложноположительные результаты, ЛО – ложноотрицательные результаты, ИО – истинноотрицательные результаты тестов			

Чувствительность метода детекции бластных клеток на основе параметра %LUC гематологического анализатора ADVIA 2120/2120i составляет 52%, специфичность 47%. Чувствительность метода Cytodiff™ к детекции бластных клеток на основе параметра %Xn составляет 85%, специфичность 100%, что позволяет рекомендовать его для мониторинга выявления бластных клеток в практике ЛПУ.

Мониторинг элиминации бластных клеток и оценка количества ретикулярных тромбоцитов у пациентов ОМЛ

В процессе терапии 58 пациентов ОМЛ распределились на несколько групп. Без проведения специфической терапии скончалось 8 пациентов. 5 пациентов уехали лечиться по месту жительства. 45 пациентов получали терапию согласно Национальным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению ОМЛ взрослых. Ранняя смерть, в период индукционной терапии, констатирована у 9 пациентов (4 женщин, 5 мужчин, в возрасте от 52 до 81 лет). По результатам ответа на первый курс химиотерапии (цикл индукции) пациенты были разделены на две группы. Первую группу составили 17 пациентов (11 женщин и 6 мужчин в возрасте от 24 до 73), у которых была достигнута полная ремиссия (102 исследованных образцов крови). Вторую группу составили 19 пациентов (8 женщин, 11 мужчин, возраст от 37 до 82 лет), у которых констатировали резистентную форму ОМЛ (114 исследованных образцов крови). Оценку эффективности терапии проводили на 21-28 день после начала химиотерапии. Критериями полной клинико-гематологической ремиссии были: обнаружение в пунктате костного мозга <5% бластных клеток; абсолютное ко-

личество нейтрофилов в периферической крови $>1,0 \times 10^9/\text{л}$, абсолютное количество тромбоцитов $\geq 100 \times 10^9/\text{л}$.

Мониторинг элиминации бластных клеток

В зависимости от количества МПО-позитивных бластов пациенты I и II группы были разделены на две подгруппы с числом МПО-позитивных бластов менее 30% (подгруппа А) и более 30% (подгруппа Б). Относительное количество клеток в области LUC имело обратную зависимость с числом МПО-позитивных бластов на момент начала терапии. Изменения параметра LUC в процессе химиотерапии в I и II группах представлены на рис.10.

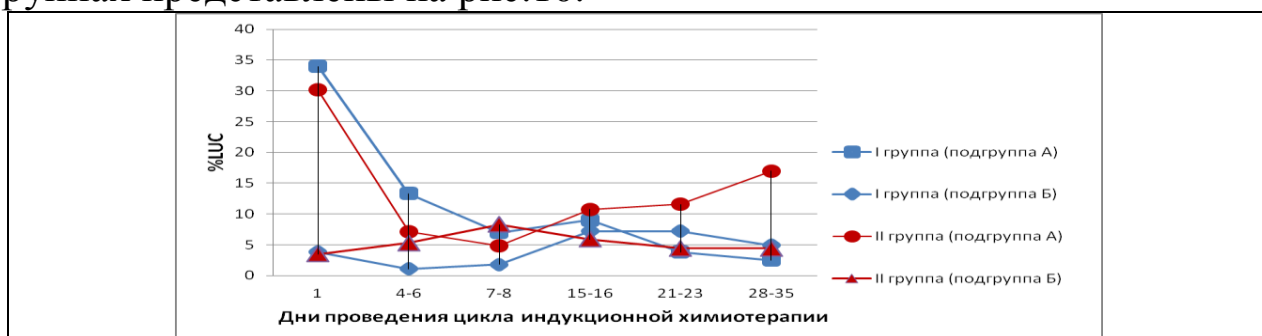


Рисунок 10. Динамика изменения относительного числа LUC в I и II группах в процессе химиотерапии в зависимости от количества МПО-позитивных бластов. На графике отложены медианы значений.

При исследовании изменений абсолютного числа нейтрофилов пациенты I и II группы были разделены на две подгруппы с числом МПО-позитивных бластов менее 30% (подгруппа А) и более 65% (подгруппа Б). Изменения абсолютного числа нейтрофилов в процессе химиотерапии в I и II группах представлены на рис.11.

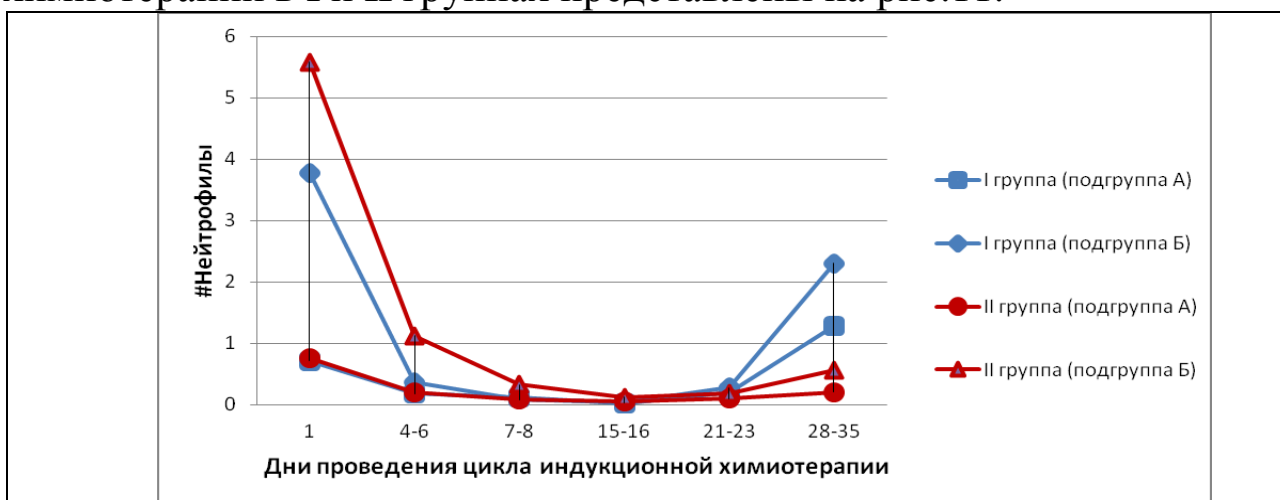


Рисунок 11. Динамика изменения абсолютного числа нейтрофилов в I и II группах в процессе химиотерапии в зависимости от количества МПО-позитивных бластов. На графике отложены медианы значений.

При оценке динамики параметра %Xn в I группе отмечалось достоверное снижение показателя уже на 7-8 день проведения химиотерапии ($p < 0,05$) по сравнению с исходным уровнем. Во II группе %Xn достоверно не изменился и остался на уровне 44,6% на 4-6 день и 15,7% - на 28-35 день проведения первого курса химиотерапии (цикла индукции). Для интерпретации результатов был предложен коэффициент элиминации (КЭ) бластов в каждой точке исследования. Формула расчета КЭ бластов представлена ниже:

$$\text{Коэффициент элиминации бластов} = \frac{\% X_n \text{ m-го дня цикла химиотерапии}}{\% X_n \text{ первого дня цикла химиотерапии}} \quad (3),$$

где m – день цикла химиотерапии.

График оценки скорости элиминации бластов на основе КЭ представлен на рис 12. КЭ в первый день химиотерапии равнялся 1,0.

Скорость снижения числа бластов изучалась относительно первого дня химиотерапии. Были отмечены дни, когда происходило уменьшение бластов в два раза, то есть КЭ составил 0,5. Достоверное снижение бластных клеток в два раза и более на 4-6 день проведения индукционного курса химиотерапии выявило высокую корреляцию с достижением полной ремиссии ОМЛ, устанавливаемой на основании Национальных клинических рекомендаций 2014 года. В то же время во II группе пациентов снижение бластных клеток в два раза и более наблюдалось на 7-8 день с начала химиотерапии.

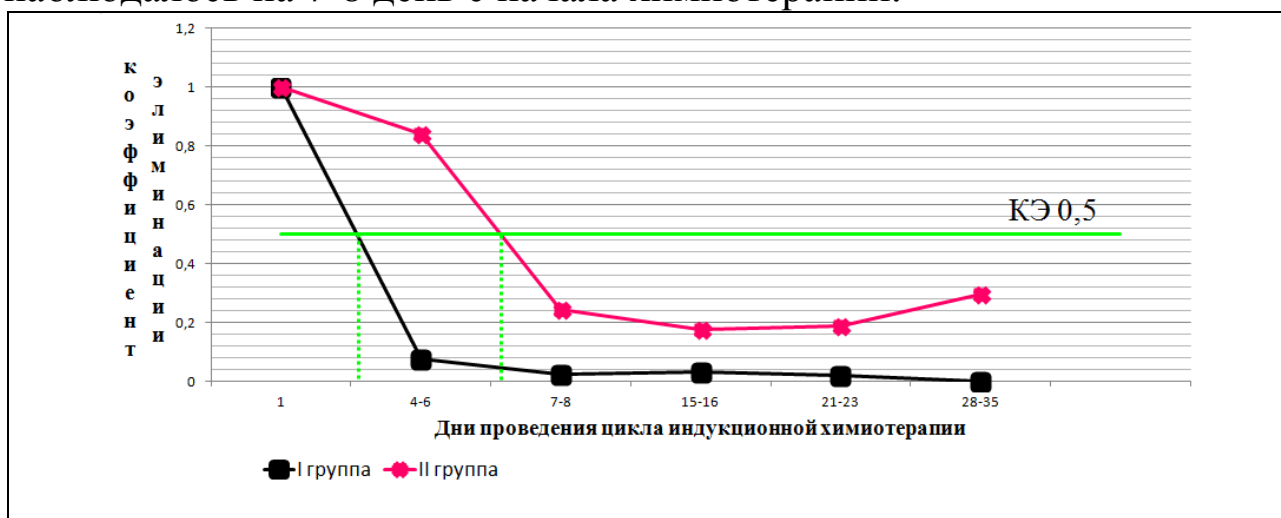


Рисунок 12. Скорость элиминации бластов по коэффициенту элиминации (КЭ). На рисунке приведены графики динамики коэффициента элиминации в I и II группе, отмечены точки аппроксимации показателя КЭ=0,5.

Также на фоне химиотерапии наблюдалось снижение лейкоцитов на 7-8 день ($p < 0,001$), достигая своего минимума на 15-16 сутки с последующим постепенным увеличением. На 28-35 день лейкоциты

восстановились до нормальных значений только в I группе. В процессе проведения пациентам I группы дальнейшего цикла высокодозной, поддерживающей химиотерапии (цикл консолидации) достоверное восстановление лейкоцитов до нормальных значений у этих пациентов отмечено на 36-48 день.

Таким образом, с помощью предложенной нами формулы на основе параметра %Хп уже на 4-6 день проведения индукционного курса химиотерапии возможно прогнозировать ответ пациента на химиотерапию. Снижение КЭ более чем в два раза свидетельствует об эффективности лечения.

Мониторинг общего числа тромбоцитов и количества РТ у пациентов ОМЛ в восстановительный период

Изменение общего числа тромбоцитов на фоне химиотерапии совпадало с колебаниями уровня лейкоцитов во всех группах пациентов. Мониторинг параметров общего числа тромбоцитов и РТ при проведении цикла индукции и консолидации химиотерапии представлены на рис. 13 и 14.

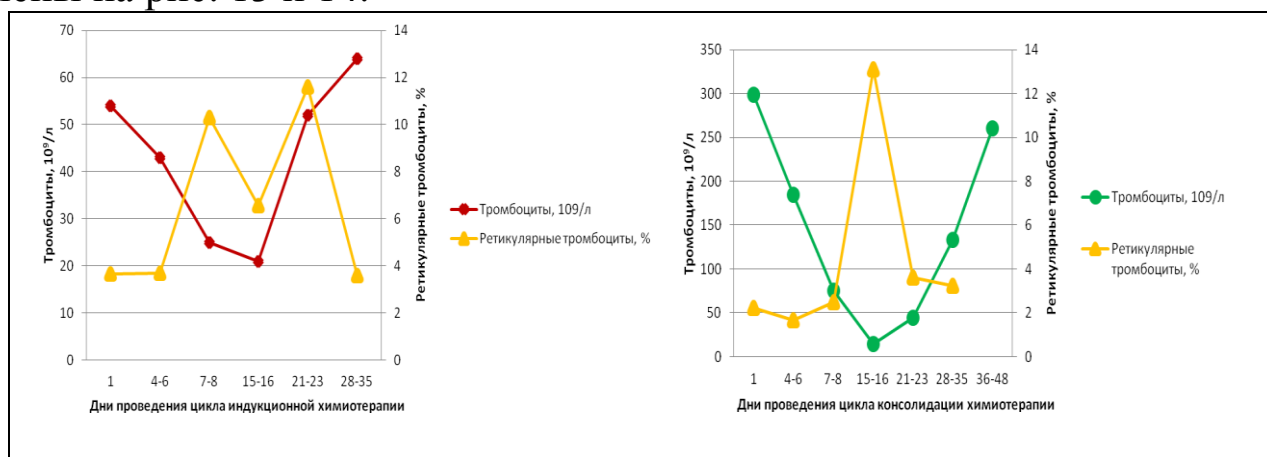


Рисунок 13 и 14. Динамика изменения тромбоцитов и относительного числа ретикулярных тромбоцитов в процессе индукции и консолидации химиотерапии. На графике отложены медианы значений.

Результаты исследования образцов периферической крови установили, что при проведении цикла индукции параметр %РТ колебался выше базовых значений, достоверно не изменяясь. При проведении консолидирующего курса химиотерапии увеличение числа РТ наблюдалось на 7-10 дней раньше увеличения общего количества тромбоцитов ($p < 0,01$). Таким образом, параметр РТ может служить маркером восстановления мегакариоцитопоэза в костном мозге после проведенного цикла консолидации.

ВЫВОДЫ

1. Нахождение проб крови при комнатной температуре $+20^{\circ}\text{C}$ - $+22^{\circ}\text{C}$ в течение суток не влияет в значимых пределах (95% доверительный интервал) на общее число тромбоцитов, измеренное на гематологических анализаторах, как с оптическим, так и с импедансным методами исследования, на MPV, PCT, PDW, относительное количество PT.
2. Доказано, что с эталонным иммунологическим методом на уровне референтных значений ($150-450 \times 10^9/\text{л}$) сопоставимы как оптический ($r=0,982$), так и импедансный ($r=0,993$) методы измерения общего количества тромбоцитов. Однако в условиях тромбоцитопении ($<150 \times 10^9/\text{л}$) оптический метод измерения тромбоцитов является предпочтительным ($r=0,977$) по сравнению с импедансным ($r=0,877$).
3. Показано, что метод детекции бластных клеток гематологическим анализатором ADVIA 2120/2120i с помощью параметра %LUC обладает низкой чувствительностью (52%) и специфичностью (47%), являясь зависимым от количества МПО-позитивных бластных клеток. Ориентировочно оценить динамику элиминации бластов возможно только у пациентов с числом МПО-позитивных бластных клеток менее 30% ($r_s=0,718$).
4. Установлено, что метод детекции бластных клеток набором реагентов CytodiffTM с использованием параметра %Xn (миелобласты), обладает высокой чувствительностью (85%) и специфичностью (100%), являясь независимым от числа МПО-позитивных бластов. Это позволяет использовать его для мониторинга терапии острых миелобластных лейкозов ($r_s=0,798$). Однако при остром миеломонобластном лейкозе оценку элиминации бластных клеток рекомендуется проводить по совокупности значений %Xn и %моноцитов ($r_s=0,606$).
5. Впервые предложен новый показатель - коэффициент элиминации (КЭ) бластных клеток, рассчитываемый на основе параметра %Xn. Достоверное снижение этого показателя более чем в два раза на 4-6 день (КЭ 0,5) проведения индукционного курса химиотерапии выявило высокую корреляцию с достижением полной ремиссии острого миелоидного лейкоза, устанавливаемой на основании Национальных клинических рекомендаций 2014 года.
6. Доказано, что увеличение числа PT опережает на 7-10 дней увеличение общего количества тромбоцитов после проведения консолидирующего курса химиотерапии ОМЛ ($p<0,01$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Образцы венозной крови, стабилизированные антикоагулянтом К₂-ЭДТА, можно хранить в течение суток при комнатной температуре +20°C - +22°C.
2. В клинико-диагностической лаборатории могут быть использованы современные гематологические анализаторы как с оптическим, так и импедансным методами измерения общего числа тромбоцитов. Однако в случае тромбоцитопении преимущества имеют оптический метод измерения.
3. Метод детекции бластных клеток с помощью набора Cytodiff™ может быть рекомендован для выявления и мониторинга числа бластных клеток в практике лечебно-профилактического учреждения.
4. Оценка абсолютного числа нейтрофилов на гематологическом анализаторе ADVIA 2120/2120i не является достоверной при наличии МПО-позитивных бластов более 65%, в связи с чем, необходимо проводить дополнительное микроскопическое исследование. Только при наличии МПО-позитивных бластов менее 30% можно достоверно определить абсолютное число нейтрофилов на гематологическом анализаторе ADVIA 2120/2120i.
5. Включить в современные схемы обследования пациентов ОМЛ подсчет коэффициента элиминации, позволяющего оценить ответ на проводимую химиотерапию.
6. У пациентов ОМЛ параметр РТ может быть рекомендован в качестве раннего маркера восстановления тромбопоэза в костном мозге на фоне проводимой химиотерапии.

Работы, опубликованные по теме диссертации

1. Мининкова А.И. Структура и функции тромбоцитов (обзор литературы). I часть // Клиническая лабораторная диагностика. - 2010. - № 11. - С. 21-26. – 6 п.с.
2. Мининкова А.И. Исследование тромбоцитов методом проточной цитофлюориметрии (обзор литературы). II часть // Клиническая лабораторная диагностика. - 2011. - №4. - С. 25-30. – 5,5 п.с.
3. Мининкова А.И. Аналитические возможности гематологических анализаторов в оценке тромбоцитов (обзор литературы) // Клиническая лабораторная диагностика. - 2012. - № 3. - С.27-34. – 8 п.с.

4. Мининкова А.И. Развитие методов подсчета количества тромбоцитов. Их аналитическая оценка // Медицинский алфавит. - 2014. - №22. - С. 22-26. – 4 п.с.

5. Мининкова А.И., Костин А.И., Луговская С.А., Почтарь М.Е. Оценка количества тромбоцитов и тромбоцитарных параметров, измеряемых гематологическим анализатором CELL-DYN Sapphire (Abbott Laboratories S.A., США) // Клиническая лабораторная диагностика. - 2015. - № 9 (6). - С. 110-111. – 0,5 п.с.

6. Мининкова А.И., Луговская С.А., Почтарь М.Е. Сравнение подсчета числа тромбоцитов и их параметров тремя различными анализаторами (ADVIA 2120 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, США), CELL-DYN Sapphire (Abbott Laboratories S.A., США), UniCel® DxH 800 Coulter®) // Клиническая лабораторная диагностика. - 2015. - № 9 (6). - С. 111. – 0,5 п.с.

7. Мининкова А.И. Что дает знание метода подсчета лейкоцитарной формулы на гематологических анализаторах // Лабораторная служба. - 2017. - №1. - С. 43-44. – 2 п.с.

8. Мининкова А.И., Луговская С.А., Почтарь М.Е., Хуажева Н.К., Тлевцежева А.А., Воробьев В.И., Лаврентьев И.С., Емельянова Э.Б., Долгов В.В. Диагностический скрининг острых лейкозов с использованием новых технологий автоматизированного анализа крови // Клиническая лабораторная диагностика. - 2018. - №63(4). - С. 228-233. – 7,5 п.с.

9. Мининкова А.И., Луговская С.А., Почтарь М.Е., Хуажева Н.К., Воробьев В.И., Гаджиева О.А., Долгов В.В. Динамика изменения параметров гемограммы у больных с острыми миелоидными лейкозами в ходе химиотерапии с использованием новых технологий автоматизированного анализа крови // Лабораторная служба. - 2018. - Т. 7. - №3. - С. 32-41.- 9 п.с.

10. Мининкова А.И., Луговская С.А., Почтарь М.Е., Хуажева Н.К., Воробьев В.И., Гаджиева О.А., Долгов В.В. Динамика изменения параметров гемограммы у больных с острыми миелоидными лейкозами в ходе химиотерапии с использованием новых технологий автоматизированного анализа крови. (тезисы научного доклада) Материалы IV Российского конгресса лабораторной медицины // Лабораторная служба. – 2018. – Т. 7. - №3. - С. 20. – 0,5 п.с.

11. Мининкова А.И., Долгов В.В., Вавилова Т.В., Свирин П.В. Обеспечение лабораторного исследования системы гемостаза [Текст] / В.В.Долгов, Т.В.Вавилова, П.В.Спирин // Лабораторная диагностика нарушений гемостаза: учеб. пособие - М. - Тверь: ООО «Изд-во «Триада», 2019. - с. 118-181. – 64 п.с

Список сокращений

ДИ- доверительный интервал

ИО – истинноотрицательные результаты

ИП – истинноположительные результаты

КЭ –коэффициент элиминации

ЛО – ложноотрицательные результаты

ЛП – ложноположительные результаты

Моно - моноциты

Нф – нейтрофилы

ОМБЛЛ – острый миелобластный лейкоз

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз

ОММЛ – острый миеломонобластный лейкоз

РТ – ретикулярные (незрелые) тромбоциты

ImmPLT – общее количество тромбоцитов, измеренное иммунологическим методом

LUC (large unstained cells) – большие неокрашенные клетки

Me – медиана

Mean – среднее значение

MPV – средний объем тромбоцитов

N – объем выборки

NS – отличия статистически незначимы

p – уровень значимости отличий с 0 ч

P₁₀ – 10% процентиль

P₉₀ – 90% процентиль

PCT – тромбокрит

PDW – ширина распределения тромбоцитов

PLT-I – общее количество тромбоцитов, измеренное импедансным методом

PLT-O – общее количество тромбоцитов, измеренное оптическим методом

SD – стандартное отклонение

X_n – миелобласты