

Определение ПНГ-клона у больных апластической анемией на различных этапах течения заболевания и лечения

З.Т. Фидарова¹, Е.А. Михайлова¹, С.А. Луговская², Е.В. Наумова², М.Е. Почтарь², Д.Г. Кисиличина², Е.Н. Паровичникова¹

¹ ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития России; ² Кафедра клинической лабораторной диагностики ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Минздравсоцразвития России

Введение. Апластическая анемия (АА) у 10–15% больных осложнена развитием пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ). С внедрением в практическую медицину методов проточной цитофлуориметрии, позволяющей определить дефицит GPI-белков на мембранах эритроцитов, гранулоцитов и моноцитов, значительно повысились возможности раннего выявления ПНГ-клона у больных АА. Опубликованы первые результаты, свидетельствующие о том, что частота выявления клона при АА может варьировать от 30 до 70%, при этом, наличие минорных ПНГ-клонов у больных АА может оказаться благоприятным прогностическим критерием ответа на иммуносупрессивную терапию (ИСТ). Цель исследования – определение частоты встречаемости ПНГ-клона у больных АА на различных этапах течения заболевания и лечения. Были поставлены задачи выявить наличие или отсутствие ПНГ-клона у больных АА в начале заболевания, на фоне проводимой ИСТ, при рецидивах АА и в период ремиссии.

Материалы и методы. В исследование включены 38 больных АА (18 мужчин и 29 женщин), которые находились на обследовании и лечении в Гематологическом научном центре (ГНЦ) (май 2011 г. – апрель 2012 г.). Медиана возраста у мужчин составила 30,3 года, – у женщин – 34,4 года.

Результаты и обсуждение. Обследование проводили у больных АА на разных этапах течения заболевания и лечения: 1-я группа ($n = 12$) – больные, обследованные до начала терапии; 2-я группа ($n = 10$) – больные, получавшие ИСТ на момент обследования; 3-я группа ($n = 11$) – больные в ремиссии; 4-я группа ($n = 7$) – больные с рецидивом заболевания. Исследовали периферическую кровь, взятую с антикоагулянтом К₂-ЭДТА на проточном цитофлуориметре Cytoomics FC500 ("Beckman Coulter") с использованием гейтирующих антител CD45, CD15, CD64, CD235a, GPI-связывающих ан-

тител CD59, CD14, CD24 и FLAER. В случаях, когда величина клона не превышала 1%, диагностировался минорный ПНГ-клон. Из 38 больных АА ПНГ-клон был выявлен у 25 (64%), из них у 4 больных – минорный клон, у 19 – размер ПНГ-клона более 1%. В 1-й группе больных у 6 из 12 (50%) обнаружен ПНГ-клон. Величина клона среди эритроцитов – от 0,1% до 1,5%, гранулоцитов – от 0,1% до 27,6%, моноцитов от 1,8% до 97,3%. У больных 2-й группы ПНГ-клон определялся у 5 из 10 больных (50%). Размер клона среди эритроцитов от 1,5% до 3,6%, гранулоцитов от 1,6% до 94,6%, моноцитов от 2,5% до 97,6%. У 10 (91%) из 11 больных 3-й группы выявили ПНГ-клон, при этом у 4 больных – минорный ПНГ-клон. Величина клона варьировала среди эритроцитов от 0,1 до 3,6%, гранулоцитов от 0,4% до 81%, моноцитов от 0,1% до 20%. В 4-й группе больных с рецидивом АА ПНГ-клон обнаружен у 6 из 7 (85%). Размер клона среди эритроцитов от 0,2% до 18,7%, гранулоцитов от 0,4% до 98,8%, моноцитов от 0,2% до 97,5%.

Заключение. Выявлена высокая частота встречаемости ПНГ-клона у больных АА на различных этапах течения заболевания и лечения (от 50 до 91%). У большинства больных наличие ПНГ-клона не ассоциировалось с признаками внутрисосудистого гемолиза (повышение ЛДГ, свободного билирубина) Развитие клинически значимого ПНГ-синдрома при сохранении умеренной панцитопении, очаговой гипоплазии костного мозга, было обнаружено у 2 больных. Обращает на себя внимание высокая частота выявления клона у больных АА, обследованных на момент ремиссии. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости тестирования всех больных АА на наличие ПНГ-клона, с целью определения значения этого показателя для оценки течения АА, ответа на лечение, подбора оптимальной тактики терапии этих больных.

Длительность циркуляции антигранулоцитарных антител при нейтропении у детей и инфицированность вирусами герпеса

Н.А. Фиононова¹, Е.А. Мамедова², Т.В. Половцева¹, И.Н. Лаврентьева¹, Н.В. Каражас³, М.Ю. Калугина³, М.Н. Васильева⁴, Т.Н. Рыбалкина³

¹Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздравсоцразвития России, Москва; ²Морозовская детская городская клиническая больница; ³НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Введение. Как самостоятельные заболевания нейтропении по этиологии и патогенезу гетерогенны. Тяжесть клинической картины разнообразна и обусловлена восприимчивостью к инфекционным агентам. В раннем возрасте чаще диагностируются иммунная и хроническая доброкачественная нейтропения детского возраста, которые имеют сходную клинико-гематологическую картину. Преимущественным патогенетическим механизмом иммунных нейтропений является разрушение нейтрофилов антигранулоцитарными антителами (АГАТ). В последние годы возрос интерес к герпетическим инфекциям (ГИ) в связи с их широкой распространенностью, тропностью к клеткам иммунной системы и, как следствие, их возможной триггерной роли в развитии аутоиммунных нарушений, в том числе иммунных нейтропений. Цель работы – выявление взаимосвязи между частотой выявляемости, длительностью циркуляции АГАТ у детей раннего возраста с нейтропениями и их инфицированностью ГИ.

Материалы и методы. Обследованы 63 ребенка в возрасте от 2,5 мес до 3 лет с нейтропенией. У всех пациентов проводили определение показателей периферической крови в динамике, наличие и определение уровня АГАТ (в гранулоцитотоксическом тесте); определение маркеров цитомегаловируса (ЦМВ), вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), вируса герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6), вируса простого герпеса (ВПГ) – методом ИФА определяли в сыворотке крови антитела (АТ) различных классов, для выявления антигена (АГ) возбудителей в лейкоцитах крови применяли непрямую ре-

акцию иммунофлюоресценции (ИРИФ), в том же материале определяли ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Критерием острой ГИ являлось выявление АТ класса IgM, наличие АГ и ДНК герпес-вирусов в лейкоцитах. Анализ данных выполнен с помощью программы Statistica 6.1. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Группу детей с нейтропенией, у которых были выявлены АГАТ в различных титрах (от 1:2 до 1:64) составили 30 пациентов. Среди них маркеры острых ГИ определялись у 23 детей. Группу детей с АГАТ и без маркеров острых ГИ составили 7 больных. Среди детей с нейтропенией, наличием АГАТ и маркерами острых ГИ, маркеры ВЭБ определялись у 4 детей, маркеры ЦМВ-инфекции у 1 человека, маркеры ВГЧ-6 у 6, маркеры ВПГ у 2, микст-инфекции у 10 детей. Группу детей с нейтропенией и без АГАТ составили 33 ребенка. Длительность циркуляции АГАТ среди больных с маркерами ГИ была выше, чем в группе без маркеров ГИ, однако, статистически значимых различий между группами не получено ($p = 0,189$). У 50% пациентов в обеих группах длительность циркуляции АГАТ не превышала 6 мес. При выявлении у пациентов АГАТ более 6 мес, в группе с маркерами ГИ, длительность циркуляции АГАТ была статистически значимо выше ($p = 0,027$), чем в группе без ГИ. Длительность циркуляции АГАТ у детей с маркерами ВГЧ-6 и микст-инфекциями была выше, чем в группах маркерами других ГИ. Наименьшая длительность циркуляции АГАТ была в группе детей с маркерами ВПГ.

Заключение. При оценке полученных данных, значимых различий между наличием АГАТ и частотой инфицированности ГИ не получено, длительность циркуляции АГАТ не зависела от наличия маркеров ГИ при длительности нейтропении менее 6 мес. Однако, при сроке циркуляции АГАТ более 6 мес, длительность

циркуляции АГАТ в группе детей с маркерами ГИ была достоверно выше, чем в группе без маркеров ГИ. Более длительная циркуляция АГАТ отмечена у детей с ВГЧ-6 и микст-герпетическими инфекциями, что может свидетельствовать об их более значимом влиянии на развитие аутоиммунного процесса.

KIR-рецепторы естественных киллерных клеток и их HLA-лиганды у больных некоторыми гемобластозами

Е.Г. Хамаганова, Т.П. Чугреева, Е.Н. Паровичникова

ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития России, Москва

Введение. Естественные киллерные клетки (ЕКК) – эффекторные клетки врожденного иммунитета, способные лизировать трансформированные или инфицированные клетки-мишени без предварительного контакта и развития реакции типа иммунного ответа. Ответ ЕКК на клетки-мишени регулируется взаимодействием между их иммуноглобулинподобными рецепторами – KIR (killer Ig-like receptors) и молекулами главного комплекса гистосовместимости (у человека – HLA) класса I. Отсутствие "своей" молекулы HLA на клетке-мишени ведет к активации ЕКК и лизису мишени. С KIR/HLA взаимодействиями связана толерантность ЕКК к собственным здоровым клеткам и элиминация инфицированных и трансформированных клеток с измененной экспрессией HLA-молекул. Имеются сообщения об ассоциациях определенных KIR и KIR/HLA комбинаций с некоторыми гемобластозами [Naumova et al., 2005; Verheyden et al., 2005; Giebel et al., 2008; Middleton et al., 2009; Zhang et al., 2010; Almalte et al., 2011; Karabon et al., 2011]. Целью настоящего исследования явилось изучение распределения KIR/HLA комбинаций у больных некоторыми гемобластозами и здоровых представителей нашей популяции для установления возможных ассоциаций.

Материалы и методы. Исследованы 69 больных, из которых 31 больной острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ), 15 – миелодиспластическим синдромом (МДС), 23 – острыми лимфобластными лейкозами (ОЛЛ). Контрольная группа состояла из 65 доноров компонентов крови. HLA и

KIR-генотипирование проводили методом PCR-SSP (полимеразной цепной реакции с сиквенс-специфическими праймерами) на наборах праймеров Invitrogen (WI, США). Прямым подсчетом определяли все возможные KIR/HLA комбинации: KIR2DL2/HLA-C1 (HLA-C1 – аллели HLA-C, несущие аспарагин в позиции 80 пептидсвязывающей бороздки), KIR2DL3/HLA-C1; KIR2DL1/HLA-C2 (HLA-C2 – аллели HLA-C, несущие лизин в позиции 80); KIR3DL1/HLA-Bw4 и KIR3DL2/HLA-A3 и A11. Статистическую значимость различий показателей определяли с помощью преобразованного критерия Фишера.

Результаты и обсуждение. Не выявлено статистически значимых различий от контрольной группы в распределении KIR-генов, их HLA-C1 и HLA-C2 лигандов и KIR/HLA-комбинаций у больных ОМЛ и МДС. В группе больных ОЛЛ отсутствовали гомозиготы по HLA-C2 лигандам (C2/C2): 0% против 20% в контрольной группе ($p < 0,001$), также наблюдалась тенденция к снижению частоты встречаемости комбинации KIR2DL1/HLA-C2 (41% против 60% в контрольной группе). У всех больных ОЛЛ в отличие от контрольной группы имелись комбинации KIR с их HLA-C1 лигандами: KIR2DL2/HLA-C1 и/или KIR2DL3/HLA-C1 (100% против 78%; $p < 0,001$).

Заключение. У больных ОЛЛ отмечено изменение профиля KIR/HLA комбинаций, характерного для контрольной группы. Гомозиготность по HLA-C2/C2 может быть фактором, способствующим резистентности к развитию ОЛЛ.

Клеточный биочип для одновременного исследования морфологии и иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови и костного мозга больных лимфопролиферативными заболеваниями В-клеточного происхождения

А.Н. Хвастунова^{1,2}, А.О. Доронина^{1,3}, И.М. Черных¹, О.С. Федянина², С.А. Кузнецова^{1,2,3}, Ф.И. Атауллаханов^{1,2,3}

¹ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздравсоцразвития России; ² Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН;

³ ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития России, Москва

Введение. Основополагающими методами при диагностике онкогематологических заболеваний являются микроскопическое (морфологическое) исследование клеток крови и костного мозга и иммунофенотипирование. Наличие в мазках периферической крови лейкоцитов с патологической морфологией или лейкоцитов, не характерных для нормальной периферической крови, является важнейшей информацией при постановке диагноза. Иммунофенотипирование (определение поверхностных антигенов клеток крови, проводимое обычно с помощью проточной цитофлуориметрии) позволяет обнаружить наличие в образце клеток с редким иммунофенотипом, но не дает возможности морфологического анализа именно той конкретной клетки, которая имеет "подозрительный" иммунофенотип. В настоящий момент успешная диагностика онкогематологических заболеваний базируется на сочетании иммунофенотипирования, морфологического и молекулярно-биологического анализа клеток крови. Однако невозможность проведения анализа поверхностных антигенов и морфологического исследования на одних и тех же клетках может приводить к противоречиям при формулировке диагноза в тех случаях, когда важно определить иммунофенотип клеток, имеющих патологическую или атипичную морфологию.

Материалы и методы. Для решения данной задачи нами разработан клеточный биочип для параллельного

иммунофенотипирования и морфологического исследования лейкоцитов человека. Биочип представляет собой прозрачную подложку размером 22 × 22 мм, на которой иммобилизованы антитела к 35 поверхностным антигенам лейкоцитов. При инкубации биочипа с суспензией лейкоцитов клетки, несущие определенный поверхностный антиген, связываются с иммобилизованными антителами. После отмывки на поверхности биочипа остаются области, покрытые лимфоцитами, несущими тот или иной поверхностный антиген, морфология которых затем исследуется стандартными цитологическими методами. Таким образом, биочип позволяет исследовать морфологию клеток крови, для которых известен один из ее поверхностных CD антигенов.

Результаты и обсуждение. С помощью клеточного биочипа были исследованы периферическая кровь и костный мозг 22 больных хроническим В-клеточным лимфолейкозом (В-ХЛЛ), 11 – волосатоклеточным лейкозом (ВКЛ), 12 – множественной миеломой (ММ), 6 – лимфомой из клеток маргинальной зоны селезенки, 1 – макроглобулинемией Вальденстрема. Мы показали, что иммунофенотип лимфоцитов, связавшихся с биочипом, соответствует данным проточной цитометрии, и морфология опухолевых клеток хорошо согласуется с данными, полученными стандартными методами морфологических исследований. Биочип позволяет определить иммунофенотип опухолевых