

острый лимфобластный лейкоз. Причем заболеваемость гемобластозами практически была одинаковой среди детей армянской и русской этнических групп. Дети украинской национальности чаще болели лимфомой Ходжкина, чем острым лимфобластным лейкозом и неходжкинской лимфомой.

Обсуждение

На основании проведенной ретроспективной оценки эпидемиологии гемобластозов в Краснодарском крае можно сделать вывод, что заболеваемость злокачественными новообразованиями лимфоидной, кроветвор-

ной и родственных им тканей в течение 30 лет практически не изменилась, но выросла в абсолютных числах в связи с увеличением детского населения в крае.

ЛИТЕРАТУРА

1. Румянцева А. Г., Самочатовой Е. В. Гематология/онкология детского возраста: Практическое руководство по детским болезням. – М., 2004. – IV том. – 751 с.
2. Pediatric oncology / Third edition Philip A. Pizzo, David G. Poplack. – New-York, 1997. – 836 p.

Поступила 06.11.2012

О. Е. МУРАШКИНА, С. Н. ДИДЕНКО, В. В. ЛЕБЕДЕВ, Р. Е. СКЛЯРОВА

ВОЗМОЖНОСТИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И МОНИТОРИРОВАНИЯ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗОВ У ДЕТЕЙ В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ

*Клинико-диагностическая лаборатория ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» МЗ КК,
Россия, 350007, г. Краснодар, пл. Победы, 1,
тел. 89184602250. E-mail: krasnmur@mail.ru*

Средняя заболеваемость острым лейкозом у детей в Краснодарском крае составила 8,3. В статье авторами дается анализ использования метода проточной цитофлюориметрии для идентификации иммунофенотипа бластных клеток.

Установлено, что В-острые лейкозы составили 113 случаев, Т-острые лейкозы – 17, острые миелоидные – 29 за 5 лет с момента внедрения метода.

При мониторинге минимальной остаточной болезни на 85-й день проточная цитометрия дает точные разграничения между нормально регенерирующими предшественниками и лейкоэмическими бластами, а также в отличие от общепринятых рутинных методик морфологического исследования позволяет использовать иммунологические критерии детекции остаточной болезни в процессе химиотерапии, что существенно сказывается на результатах лечения.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, проточная цитофлюориметрия, минимальная остаточная болезнь.

O. E. MURASHKINA, S. N. DIDENKO, V. V. LEBEDEV, R. E. SKLYAROVA

OPPORTUNITIES FLOW CYTOMETRY IN THE DIAGNOSIS AND MONITORING OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA AT CHILDREN IN THE KRASNODAR REGION

*Clinical diagnostic laboratory State budget office of health «Children's regional clinical hospital»
Ministry of health of the Krasnodar territory,
Russia, 350007, Krasnodar, square Pobedy, 1, tel. 89184602250. E-mail: krasnmur@mail.ru*

Average disease of acute leukemia at children in Krasnodar territory has made 8,3. In the article authors give the analysis of use of a method of flow cytofluorometry for identifications immune phenotypes of blast cells. It is established, that B-acute leukemia have made 113 cases, T-acute leukemia 17, acute myeloid 29 for 5 years since the moment of method introductions. At monitoring of the minimal residual diseases for 85 day flow cytometry gives exact differentiations between normally recycling predecessors and leukemia blasts, and also unlike generally accepted routine techniques of morphological research flow cytometry allows to use immunologic criteria of detection of residual diseases in the course of chemotherapy, that essentially affects results of treatment.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, flow cytofluorometry, minimal residual diseases.

Введение

Проблема заболеваемости гемобластомами в Краснодарском крае не теряет своей актуальности в связи с отсутствием тенденции к ее снижению.

Ежегодные показатели заболеваемости детей злокачественными новообразованиями в Российской Федерации составляют от 3000–4500 случа-

ев, при этом на долю гемобластозов приходится до 50%.

Среднестатистические показатели заболеваемости детей злокачественными новообразованиями, по данным детского ракового регистра, в Краснодарском крае составляют 15 детей на 100 000 детского населения, в нозологической структуре относительный показатель

заболеваемости лейкозом в течение последних пяти лет находится на уровне 8,3, что сопоставимо с эпидемиологическими показателями других субъектов РФ.

Важным аспектом оказания эффективной специализированной гематологической помощи является точная идентификация иммунофенотипа бластных клеток, что напрямую влияет на тактику выбора лечебных мероприятий, а также мониторинг минимальной остаточной болезни (МОБ), позволяющий оценить эффективность проведенного лечения и определиться в его необходимой длительности, от чего напрямую зависит прогноз выживаемости.

Иммунофенотип бластных клеток можно определить разными способами, прежде всего проточной цитофлуориметрией, иммуноцитохимическим или иммуногистохимическим исследованием.

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на базе ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» департамента здравоохранения Краснодарского края в период 2008–2012 гг. Под нашим наблюдением находилось 130 детей, больных острыми гемобластозами, в возрасте от 15 суток до 17 лет. Средний возраст пациентов составил $6,8 \pm 2,3$ года, из них мальчиков было 78 человек (60%), девочек – 52 (40%). Распределение больных по нозологическим формам было представлено лейкозами В-линейной направленности в 113 случаях и в 17 случаях – Т-линейной направленности.

Идентификация варианта гемобластоза проводилась методом проточной цитофлуориметрии на аппарате «FACSCantoll» («Becton & Dickinson», США – BD) с использованием программного обеспечения «FACSDiva». Исследуемый клеточный материал окрашивали моноклональными антителами (МАТ) с 5- и 6-цветными флуоресцентными метками («Becton & Dickinson», США; «Beckman Coulter», США).

Результаты исследования

Проточная цитофлуориметрия является наиболее перспективным методом, который применяется в ГБУЗ ДККБ с 2008 года. В основе проточной цитофлуориметрии лежит проведение фотометрических и флуоресцентных измерений отдельных клеток, пересекающих

одна за другой вместе с потоком жидкости лазерный луч монохроматического света.

Фотометрические каналы используются для оценки размеров клеток и внутриклеточных структур. Частицы, отличающиеся по размерам, по-разному рассеивают свет, при этом характер рассеивания зависит от соотношения длины волны света и диаметра частиц. При одновременной регистрации бокового и прямого светорассеяния возможно выделить все клеточные популяции лейкоцитов. В этом случае удастся определить физические свойства любой неокрашенной клетки (размер, гранулярность) и таким образом разделить анализируемую клеточную популяцию на отдельные субпопуляции [1].

Флуоресцентный канал применяется для изучения клеточных маркеров, для чего используют МАТ, меченные различными флюорохромными красителями, к мембранным и внутриклеточным компонентам клеток (белкам, ДНК, РНК). После окрашивания клеток МАТ происходят специфическое связывание последних с клеточными структурами и регистрация флуоресценции, индуцированной излучением лазера [1].

Открытие гематологического отделения в ДККБ поставило перед лабораторией задачу: идентификация иммунологических вариантов острых лимфобластных лейкозов в соответствии с EGIL-классификацией, а также острых миелоидных лейкозов с вариантами минимальной миелоидной (M0), эритроидной (M6) и мегакариоцитарной (M7) дифференцировки бластных клеток.

EGIL 1995 – классификация, разработанная Европейской группой по иммунологической характеристике лейкемии (European group for the immunological characterization of leukemias). Согласно предложению EGIL все острые лимфобластные лейкозы разделяют на две большие группы: В- и Т-линейной дифференцировки, которые, в свою очередь, подразделяются на подтипы [5].

Острые В-линейные лейкозы

Вариант В-I: бластные клетки имеют иммунологический фенотип предшественников В-лимфоцитов костного мозга. Они экспрессируют CD19+CD22+CD79a+CD34+/-TdT+.

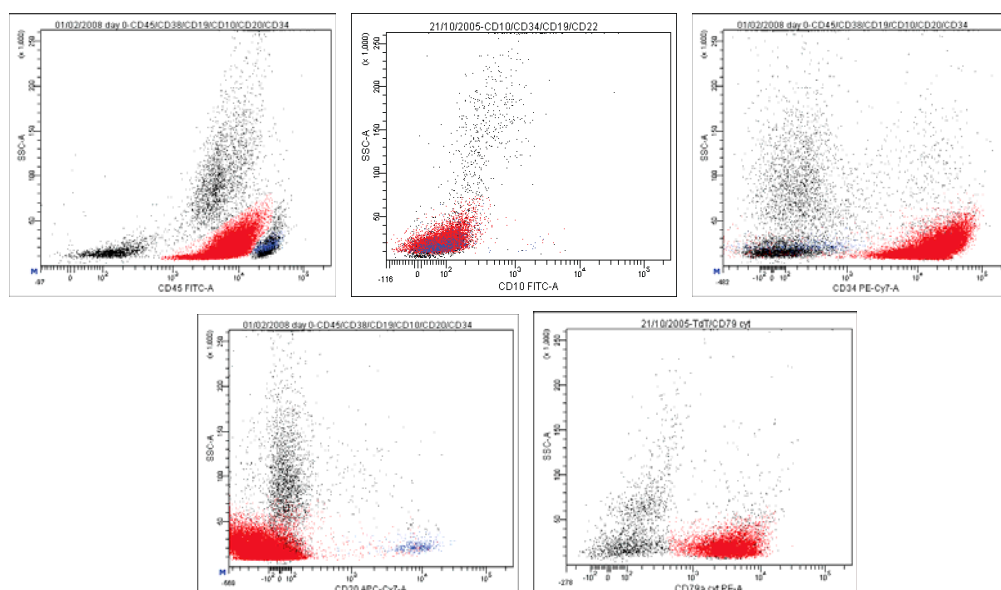


Рис. 1. Вариант В-I острого лимфобластного лейкоза

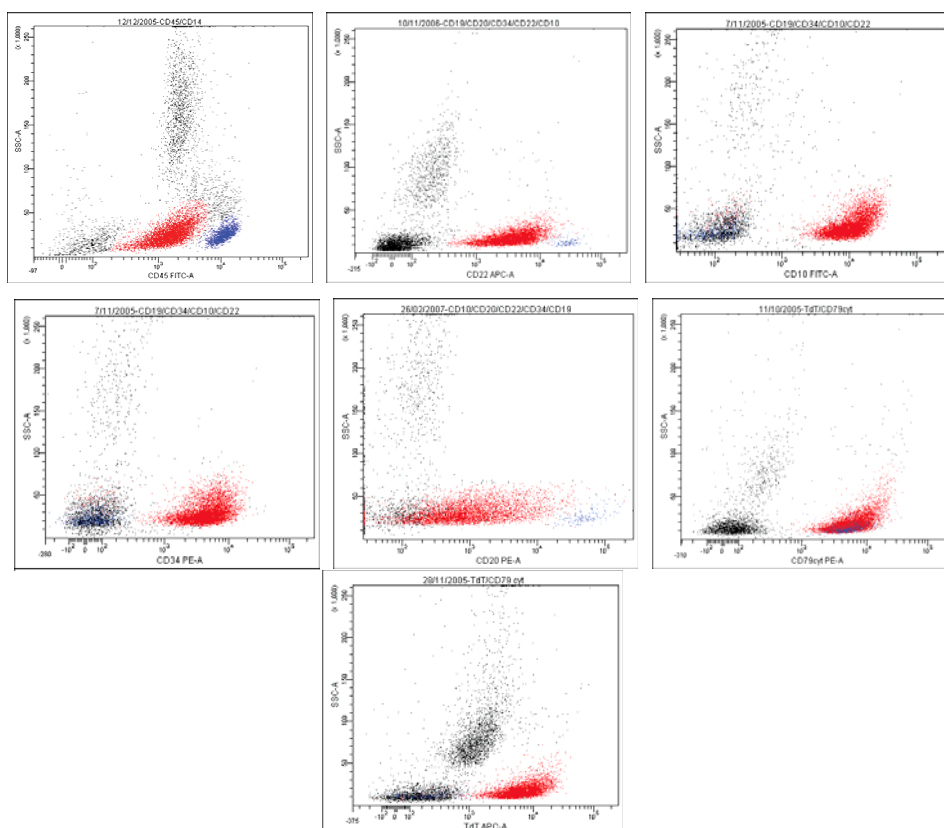


Рис. 2. Вариант В-II острого лимфобластного лейкоза

Вариант В-II (common): по своей встречаемости у детей составляет до 70% всех острых лейкозов. Выявляется следующий фенотип: CD19+CD22cyt+CD79a+CD10+CD34+/-CD20+TdT+.

Вариант В-III: определяющим в иммунофенотипе бластных клеток этого варианта ОЛЛ является наличие цитоплазматической тяжелой цепи М при отсутствии поверхностных иммуноглобулинов.

Вариант В-IV: регистрируется в 2–4% случаев ОЛЛ у детей и рассматривается как эквивалент лимфомы Беркитта в фазе лейкемизации. Бластные клетки имеют морфологические характеристики L-3 варианта в соответствии с ФАБ-классификацией, выявляется следующий иммунофенотип: CD19+CD22cyt+CD20+CD34-IgM+Kappa/Lambda+ на мембране бластов.

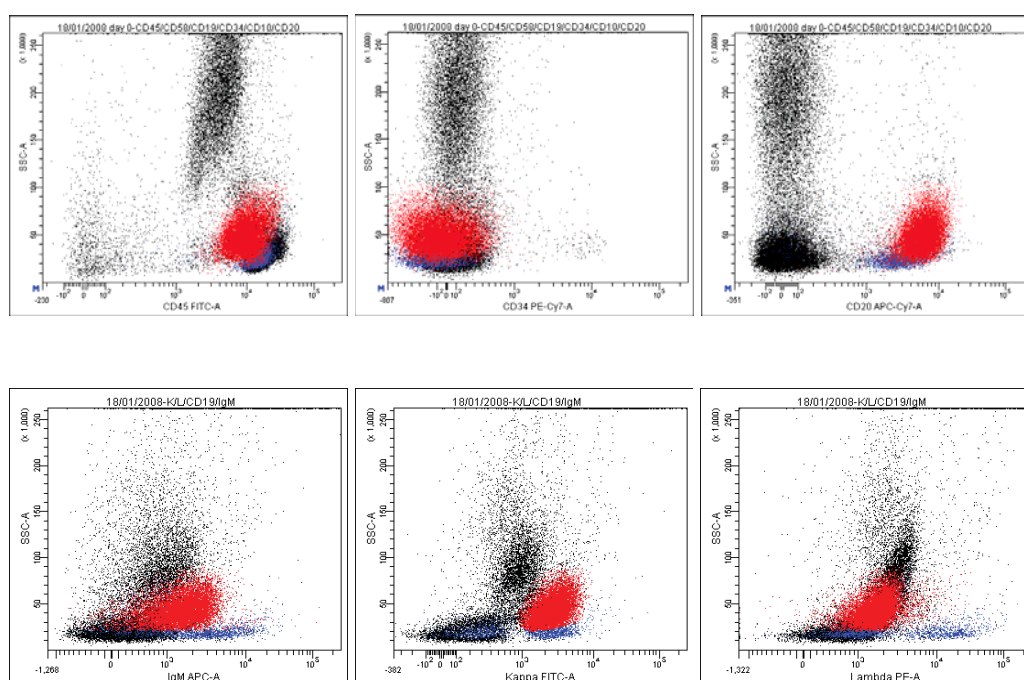


Рис. 3. Вариант В-IV острого лимфобластного лейкоза

Острые Т-линейные лейкозы

Для Т-линейных ОЛЛ специфическим маркером является экспрессия цитоплазматического CD3. По степени дифференровки Т-линейные ОЛ также подразделяются на 4 варианта.

Т-I – бластные клетки соответствуют ранним тимоцитам и характеризуются экспрессией общего Т-антигена CD7.

Т-II вариант острого лимфобластного лейкоза определяется по экспрессии антигенов CD7+CD2+и/или CD5+.

сти. Диагноз выставляется чаще всего в день доставки материала (которым является костный мозг), что позволяет врачу-онкогематологу по установленному иммунофенотипу бластных клеток выбрать оптимальную программу полихимиотерапии и в более ранние сроки начать терапию. Также от иммуноварианта лейкоза зависят группа риска заболевания и его прогноз.

На 15, 33 и 85-й дни индукционной химиотерапии проводится мониторинг минимальной остаточной болезни.

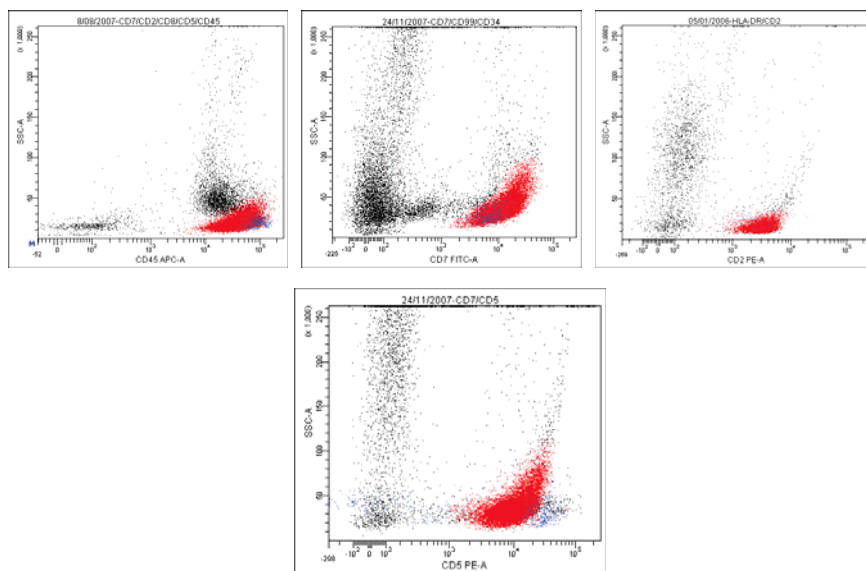


Рис. 4. Вариант Т-II острого лимфобластного лейкоза

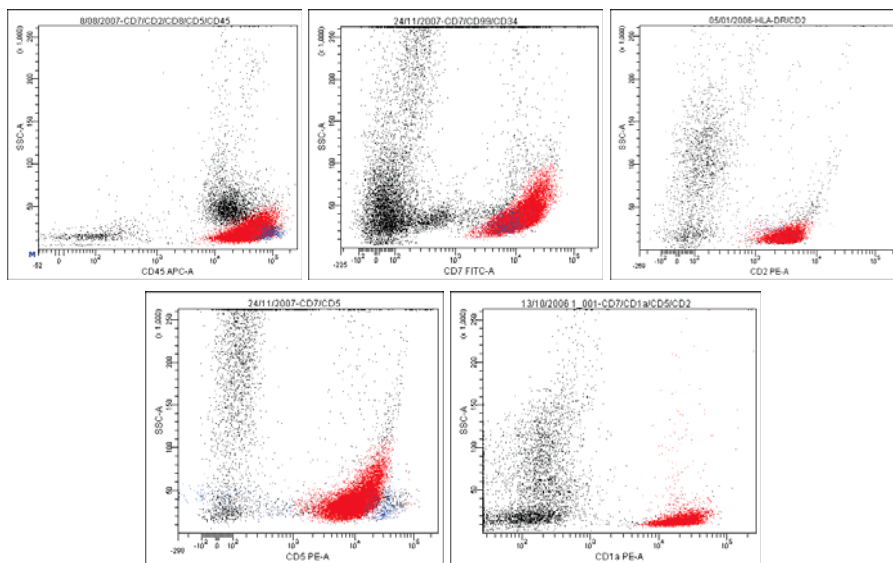


Рис. 5. Вариант Т-III острого лимфобластного лейкоза

Т-III – бластные клетки имеют фенотип кортикальных тимоцитов. Данный тип Т-ОЛ устанавливается по экспрессии на поверхности бластных клеток CD1a+. Иммунофенотип: CD3cyt+CD7+CD2+CD5+CD1a+CD4+/-CD8+/-.

Вариант Т-IV острого лимфобластного лейкоза (зрелый) характеризуется мембранной экспрессией CD3 и отсутствием CD1a.

С 2008 г. и до настоящего момента было установлено 130 диагнозов острого лимфобластного лейкоза, из них 113 – В-линейной и 17 – Т-линейной направленно-

сти. На основании данных группы BFM-AIEOP четко определены критерии детекции МОБ при остром лимфобластном лейкозе методом проточной цитофлуориметрии [3, 6]. Выделяют три группы пациентов:

группа стандартного риска – бластных клеток в костном мозге с соответствующим иммунофенотипом менее 0,1%;

группа среднего риска – бластных клеток от 0,1–1,0%;

группа высокого риска – бластных клеток более 1,0%.

Обсуждение

Представляется возможность редукции интенсивности химиотерапии у детей с острыми лимфобластными лейкозами, поскольку серьезной проблемой является токсичность данных препаратов, значительно ухудшающая качество жизни больных (инфекционные осложнения на фоне аплазии кроветворения; кровотечения различной степени; нарушения со стороны сердечно-сосудистой системы – токсические кардиомиопатии; нарушения со стороны ЦНС – полинейропатии, энцефалопатии; со стороны ЖКТ – энтероколиты, мукозиты и т. д.).

Также по результатам МОБ пациент может быть переведен в более высокую группу риска заболевания, в результате чего изменяется программа терапии и рассматривается вопрос о трансплантации костного мозга в первой линии ремиссии.

При мониторинге минимальной остаточной болезни на 85-й день проточная цитометрия дает точные разграничения между нормально регенерирующими предшественниками и лейкоэмическими бластами, характеризующимися асинхронностью экспрессии мембранных антигенов и aberrантным иммунофенотипом.

В отличие от общепринятых рутинных методик морфологического исследования проточная цитометрия позволяет использовать иммунологические критерии детекции остаточной болезни в процессе химиотерапии и лишена лабораторных погрешностей морфологического метода, что существенно сказывается на результатах лечения.

Таким образом, метод проточной цитофлуориметрии имеет ряд преимуществ, дающих возможность

существенно повысить качество диагностики острых лейкозов у детей.

Также внедрение таких высоких технологичных методов диагностики в условиях ДККБ позволило значительно оптимизировать подход к химиотерапии указанных состояний в детском возрасте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Луговская С. А., Почтарь М. Е., Тупицын Н. Н. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов. – М. – Тверь: Трида, 2005. – 168 с.
2. Острые лейкозы (метод. рекомен. для врачей-лаборантов и гематологов). – М.: из-во «ЮНИМЕД-пресс», 2003. – 24 с.
3. Гривцова Л. Ю., Попа А. В., Купрышина Н. А., Серебрякова И. Н., Божьева М. Г., Тупицын Н. Н. Оценка минимальной резидуальной болезни при острых лимфобластных лейкозах из В-линейных предшественников у детей методом трехцветной проточной цитометрии: Периодическое научное издание. – М., 2006. – С. 10–21.
4. Воробьева А. А., Быкова А. С., Караулова А. В. Иммунология и аллергология (цветной атлас): Учебное пособие для медицинских вузов. – М.: Практическая медицина, 2006. – 288 с.
5. Байдун Л. В. Комплексный анализ инициальных бластных клеток при остром лимфобластном лейкозе у детей: Пособие для научных работников в области гематологии. – М., 1996. – 29 с.
6. Giuseppe Basso, Marinella Veltroni, Michael N. Dworzak et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow // Journal of clinical oncology. – 2009. – Vol. 26. № 5. – P. 87–97.

Поступила 10.11.2012

**Ю. Б. ПОНОМАРЕНКО¹, Е. И. КОНДРАТЬЕВА¹,
В. В. ЛЕБЕДЕВ², Е. И. КЛЕЩЕНКО²**

ОСОБЕННОСТИ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ У ДЕТЕЙ С ГЕМОБЛАСТОЗАМИ

¹Кафедра педиатрии с курсом неонатологии ФПК и ППС ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4;

²ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» МЗ КК, Россия, 350007, г. Краснодар, пл. Победы, 1, тел. 8-861-262-90-19. E-mail: troickaya@rambler.ru

Исследование факторов ремоделирования костной ткани у детей с гемобластомами продемонстрировало нарушение процессов ремоделирования, которое нарастает с увеличением давности заболевания, зависит от нозологии, возраста и не зависит от пола. Для детей с онкогематологическими заболеваниями характерен высокий уровень С-концевых телопептидов и паратгормона, характеризующих процессы резорбции костной ткани. Процессы формирования костной ткани более активно протекают при Т-иммуноварианте с достоверно значимой разницей за счет увеличения уровня щелочной фосфатазы. Снижение BMD и значения Z score менее -2,0 выявлено при усилении процессов резорбции костной ткани. Максимум активности процессов ремоделирования костной ткани у детей приходится на 12–15 лет, что связано со вступлением в пубертат.

Ключевые слова: гемобластоzy, остеопороз, педиатрия.

J. B. PONOMARENKO¹, E. I. KONDRATIEV¹, V. V. LEBEDEV², E. I. KLESHENKO²

REMODELING OF BONE TISSUE IN CHILDREN WITH HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

¹Pediatrics chair with a course of a neonatology of FPK and PPS GBOU VPO to KUBGMU Minzdrava of Russia, Russia, 350063, Krasnodar, Sedina str., 4;

²Children's diagnostic center GBUZ «Children's regional clinical hospital» of MZ KK, Russia, 350007, Krasnodar, Pobedy square, 1, tel. 8-861-262-90-19. E-mail: troickaya@rambler.ru