

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

**Учреждение образования
«Международный государственный экологический институт имени
А.Д. Сахарова»
Белорусского государственного университета**

ФАКУЛЬТЕТ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КАФЕДРА ИММУНОЛОГИИ И ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИИ

**ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ В-ЛИНЕЙ-
НЫХ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗОВ У ДЕТЕЙ**

Дипломная работа

Специальность 1-80 02 01 Медико-биологическое дело

Исполнитель:

студент 5 курса 42061 группы
дневной формы обучения

_____ Шилак Оксана Владимировна

Научный руководитель:

Зав лабораторией иммунологических
Исследований РНПЦ ДОГИ
канд.биол.наук

_____ Шман Татьяна Викторовна

К защите допущена:

Заведующий кафедрой иммунологии
и экологической эпидемиологии
доктор мед. наук, доцент

_____ Зафранская Марина Михайловна

МИНСК 2019

РЕФЕРАТ

Дипломная работа: Иммунофенотипические особенности В-линейных лимфобластных лейкозов у детей: 50 страниц, 4 таблицы, 19 рисунков, 40 источников.

Дети, острый лимфобластный лейкоз, иммунофенотип, аберрантная экспрессия, pro-b лейкоз, common-b лейкоз, pre-b лейкоз, проточная цитофлуориметрия.

Цель работы: Оценка особенностей иммунофенотипа опухолевых клеток у детей с острым лимфобластным лейкозом из предшественников В-лимфоцитов (ВП ОЛЛ), включающих асинхронную экспрессию дифференцировочных маркеров, аберрантную экспрессию миелоидных и Т-линейных маркеров.

Методы исследований: общее исследование крови, метод проточной цитофлуориметрии.

Полученные результаты и их новизна. В работе было проведено исследование иммунофенотипа бластных клеток 319 пациентов с ВП ОЛЛ, диагностированным в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии. В ходе исследования установлено, что лейкоэмические бласты при ОЛЛ из предшественников В-лимфоцитов (ВП ОЛЛ) демонстрируют многочисленные иммунофенотипические aberrации. На опухолевых клетках более чем в 50 % случаев встречается асинхронная экспрессия дифференцировочных антигенов, так же во многих случаях ВП ОЛЛ наблюдается aberrантная экспрессия миелоидных маркеров, меньше встречается экспрессия Т-линейных маркеров при ВП ОЛЛ. Так же, используя общее исследование крови, было установлено, что для пациентов с ВП ОЛЛ характерно достоверное снижение уровня Hb и лейкоцитоз. Полученные результаты имеют важное значение в диагностике лейкоза, в частности, в установлении иммунологического варианта ОЛ с целью выбора адекватной терапии, а также для дальнейшей оценки уровня остаточных опухолевых клеток на этапах лечения.

Степень использования: Материалы, изложенные в работе, могут использоваться для ознакомления с иммунофенотипом клеток, включая aberrантную экспрессию, при ВП ОЛЛ для дальнейшей дифференциальной диагностики и постановки диагноза.

Область применения: Медицина, иммунология, образование.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа: Імунафенатыпічныя асаблівасці В-лінейных лімфабластных лейкозаў у дзяцей: 50 старонак, 4 табліцы, 19 малюнкаў, 40 крыніц.

Дзеці, востры лімфабластны лейкоз, імунафенатып, аберантавая экспрэсія, pro-b лейкоз, common-b лейкоз, pre-b лейкоз, працёкавая цытафлуарыметрыя.

Мэта работы: Ацэнка асаблівасцяў імунафенатыпу ракавых клетак у дзяцей з вострым лімфабластным лейкозам з папярэднікаў В-лімфацытаў (ВП ОЛЛ), якія ўключаюць асінхронную экспрэсію дыферэнцыявальных маркераў, аберантавую экспрэсію міялоідных і Т-лінейных маркераў.

Метады даследаванняў: агульнае даследаванне крыві, метады працёкавай цытафлуарыметрыі.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: У працы было праведзена даследаванне імунафенатыпу бластных клетак 319 пацыентаў з ВП ОЛЛ, дыягнаставаным у Рэспубліканскім навукова-практычным цэнтры дзіцячай анкалогіі, гематалогіі і імуналогіі. Падчас даследавання ўстаноўлена, што лейкемічныя бласты пры ОЛЛ з папярэднікаў В-лімфацытаў (ВП ОЛЛ) дэманструюць шматлікія імунафенатыпічныя аберацыі. На ракавых клетках больш чым у 50 % выпадкаў сустракаецца асінхронная экспрэсія дыферэнцыявальных антыгенаў, гэтак жа ў многіх выпадках ВП ОЛЛ назіраецца аберантавая экспрэсія міялоідных маркераў, менш сустракаецца экспрэсія Т-лінейных маркераў пры ВП ОЛЛ. Гэтак жа, скарыстаючы агульнае даследаванне крыві, было ўсталявана, што для пацыентаў з ВП ОЛЛ характэрна верагоднае зніжэнне узроўня Hb і лейкацытоз. Атрыманыя вынікі маюць важнае значэнне ў дыягностыцы лейкозу, у прыватнасці, ва ўсталяванні імуналагічнага варыянту ОЛ дзеля выбару адэкватнай тэрапіі, а таксама для далейшай ацэнкі узроўня рэшткавых пухлінавых клетак на этапах лячэння.

Ступень выкарыстання: Матэрыялы, выкладзеныя ў працы, могуць выкарыстоўвацца для азнакамлення з імунафенатыпам клетак, якія ўключаюць аберантавую экспрэсію, пры ВП ОЛЛ для далейшай дыферэнцыяльнай дыягностыкі і пастаноўкі дыягназу.

Вобласць ужывання. Медыцына, імуналогія, адукацыя.

ABSTRACT

Graduate work: Immunophenotypic features of B-linear lymphoblastic leukemia in children: 50 pages, 4 tables, 19 figures, 40 sources.

Children, acute lymphoblastic leukemia, immunofenotype, aberrant expression, pro-b leukemia, common-b leukemia, pre-b leukemia, flow cytometry.

The aim of the work: To evaluate the features of the immunophenotype of tumor cells in children with acute lymphoblastic leukemia from precursors of B lymphocytes (B ALL), including asynchronous expression of differentiation markers, aberrant expression of myeloid and T-linear markers.

Research methods: a general blood test, a method of flow cytofluorimetry.

Results and their novelty: An immunophenotype study of blast cells of 319 patients with B-cell precursors ALL diagnosed in the Republican Scientific and Practical Center of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology was conducted. In the course of the study, it was established that leukemic blasts in ALL of the precursors of B-lymphocytes (BCP ALL) demonstrate numerous immunophenotypic aberrations. In as many as 50% of cases, asynchronous expression of differentiating antigens is found on tumor cells, as well as in many cases of ALL, there is an aberrant expression of myeloid markers, less expression of T-linear markers is observed in BCP of ALL. Also, using a general blood test, it was found that a significant decrease in Hb levels and leukocytosis is characteristic of patients with BCP ALL. The results obtained are important in the diagnosis of leukemia, in particular, in establishing the immunological variant of AL in order to select adequate therapy, as well as to further assess the level of residual tumor cells during the treatment stages.

Degree of use: The materials presented in the work can be used to familiarize with the immunophenotype of cells, including aberrant expression, in case of HL ALL for further differential diagnosis and diagnosis.

Application area: Medicine, immunology, education.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Острый лейкоз	- ОЛ
Острый лимфобластный лейкоз	- ОЛЛ
Острый лимфобластный лейкоз из предшественников В-лимфоцитов	- ВП-ОЛЛ
Иммунофенотипирование	- ИФТ
Т-лимфотропный ретровирус человека (Human T-lymphotropic virus)	- HTLV-1
Гемопоэтические стволовые клетки	- ГСК
Периферическая кровь	- ПК
Полипотентные стволовые клетки	- ПСК
Моноклональные антитела	- МКА
Костный мозг	- КМ
Иммуноглобулин (immunoglobulins)	- Ig
Кластер дифференцировки (cluster of differentiation)	- CD
Натуральные киллеры (Natural killer)	- NK
Интерлейкин	- ИЛ
Колонистимулирующие факторы	- КСФ
Факторы некроза опухолей	- ФНО
ИНФ	- Интерферон
Общий антиген лейкоцитов (leukocyte common antigen)	- LCA
Общий антиген ОЛЛ (Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen)	- CALLA
Антигенпрезентирующие клетки (Antigen-presenting cell)	- APC
Общий анализ крови	- ОАК
Средняя интенсивность флуорисценции	- СИФ
Лейкоз-ассоциированный иммунофенотип	- ЛАИФ
Гемоглобин (Hemoglobin)	- Hb
Человеческий лейкоцитарный антиген (Human leukocyte antigen)	- HLA
Тромбоциты (Platelet)	- PLT
Лейкоциты (White blood cell)	- WBC
Фосфатно-солевой буфер	- ФСБ

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1 ЭТИОЛОГИЯ, ПАТОГЕНЕЗ И ДИАГНОСТИКА ОЛЛ	10
1.1 Характеристика этиологии и патогенеза ОЛЛ	10
1.2 Гемопоз	12
1.2.1 Лимфопоз.....	14
1.3 Лейкогенез.....	16
1.3.1 Апоптоз.....	19
1.4 Методы диагностики ОЛЛ	21
1.4.1 Гемограмма	21
1.4.2 Цитоморфологическое и цитохимическое исследование	21
1.4.4 Иммунофенотипирование лейкозных клеток методом проточной цитофлуориметрии	23
1.4.5 Аберрантность иммунофенотипа.....	26
1.5 Основные маркёры ВП ОЛЛ	27
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	30
2.1 Материал исследования.....	30
2.2 Методы исследования	30
2.2.1 Забор крови	30
2.2.2 Получение и интерпретация результатов ОАК.....	30
2.2.3 Получение аспирата костного мозга.....	31
2.2.4 Получение мононуклеаров из аспирата КМ.....	31
2.2.5 Иммунофенотипирование бластных клеток с помощью проточной цитометрии.....	32
2.2.6 Интерпретация результатов иммунофенотипирования	33
2.3 Статистические методы исследования	34

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ..	35
3.1 Изучение разнонаправленных изменений исследуемых показателей ОАК.....	35
3.2 Результаты ИФТ	42
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	46
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	47

ВВЕДЕНИЕ

Острые лейкозы (ОЛ), по данным Детского канцер-субрегистра Республики Беларусь, составляют около 26,5% от всех злокачественных новообразований в детском возрасте. У детей на долю острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) приходится 80%. Частота ОЛ в Беларуси составляет $4,10 \pm 0,4$ случаев на 100000 детского населения в возрасте до 15 лет [8, 10].

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) из предшественников В-лимфоцитов (ВП ОЛЛ) – наиболее часто встречаемая в детском возрасте опухоль, морфологическим субстратом которой являются незрелые клетки, коммитированные в В-линейном направлении. Злокачественные клоны экспрессируют на своей поверхности антигены, выявляющиеся на различных стадиях дифференцировки лимфоидных предшественников. При этом на common-B вариант приходится – 80%, pre-B занимает около 14%, а на долю pro-B приходится 6% [8]. На сегодняшний день благодаря привлечению новейших диагностических средств и использованию современных протоколов лечения общая 5-летняя выживаемость пациентов составляет более 75 % [21].

Для выявления данной опухоли необходимо провести ряд анализов, которые смогут подтвердить принадлежность злокачественного клона к В-лимфоцитарному ряду. Наиболее точным является метод иммунофенотипирования или же проточной цитофлуориметрии, который предусматривает использование маркеров, характерных для В-клеток.

Клетки нормального лимфопоэза, сходные по антигенному профилю с опухолевыми бластами, могут серьезно осложнить процесс диагностики ОЛЛ. Генетические нарушения, приводящие к образованию опухолевого клона, способствуют формированию иммунофенотипа, отличающегося от нормальных клеток. Аберрантная экспрессия маркеров, определяемая исключительно на бластных клетках, формирует лейкоз-ассоциированный иммунофенотип (ЛАИФ). Определение ЛАИФ методом многоцветной проточной цитометрии позволяет четко отличать нормальные и лейкозные-клетки предшественницы. Однако для проведения такого анализа необходима хорошо продуманная и отработанная панель моноклональных антител, поскольку проводится анализ большого количества маркеров, присутствующих на одних и тех же клетках.

Иммунофенотипирование бластных клеток является определяющим моментом в диагностике ОЛ, их классификации в соответствии с линейной принадлежностью и стадией дифференцировки лейкоимических клеток, а также выделении прогностически важных подтипов и выборе методов рациональной терапии.

Таким образом, целью данного исследования является изучение и систематизация литературных данных по особенностям иммунофенотипа опухолевых клеток при ВП ОЛЛ у детей. Оценка особенностей лейкоз-ассоциированного иммунофенотипа опухолевых клеток у детей с ВП ОЛЛ, включая аберрантную экспрессию. Сравнение результатов интерпретации полученных данных иммунофенотипирования (ИФТ) ОЛЛ с литературными данными.

Для достижения данной цели были выдвинуты следующие задачи:

1. Анализ и систематизация литературных данных по исследуемой тематике;
2. Изучить разнонаправленные изменения показателей ОАК для выявления ОЛ;
3. Оценить аберрантную экспрессию маркеров;
4. Провести сравнительный анализ результатов данных ИФТ с литературными источниками.

ГЛАВА 1 ЭТИОЛОГИЯ, ПАТОГЕНЕЗ И ДИАГНОСТИКА ОЛЛ

1.1 Характеристика этиологии и патогенеза ОЛЛ.

Острые лейкозы – опухолевые клональные заболевания гемопоэтической ткани, при которых лейкемическая трансформация генетического аппарата происходит на уровне мультилинейной стволовой или коммитированной клетки-предшественницы. Для них характерно первичное поражение костного мозга (КМ) морфологически незрелыми клетками с вытеснением ими нормальных элементов и инфильтрацией различных органов и тканей (рисунок 1) [29].

Большинство ОЛЛ составляют В-клеточные, приблизительно 85%, и Т-клеточные, они составляют около 15%. НК-клеточные опухоли встречаются крайне редко (рисунок 1) [5].

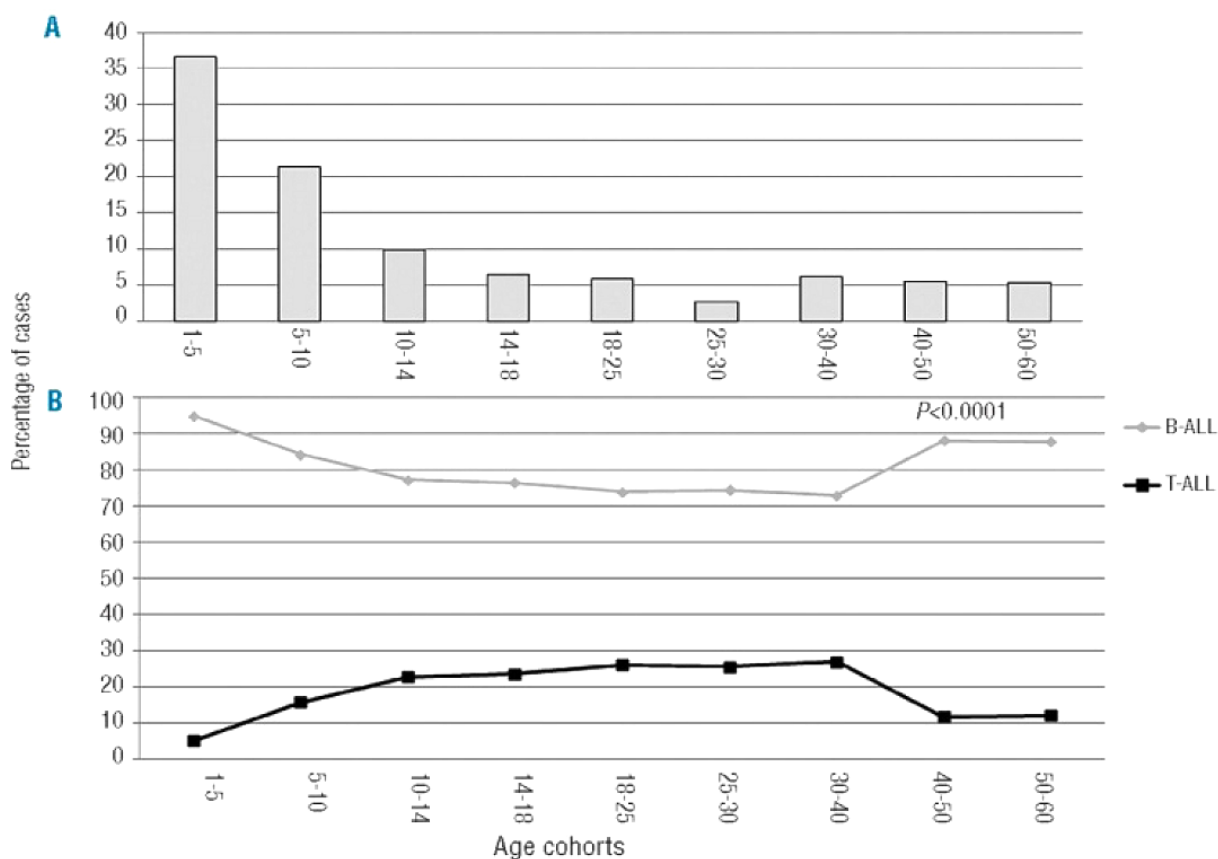


Рисунок 1 – А-распределение случаев ОЛЛ в разных возрастных группах. В-распределение случаев ОЛЛ в разных возрастных группах в зависимости от Т или В-линии [13]

В зависимости от того, предшественник какого ряда гемопоэза подвергается опухолевой трансформации, наблюдаются различия в особенностях гематологической картины, клиническом течении и прогнозе у больных ОЛ [3].

Частота возникновения лейкозов у детей определяется исключительно частотой их острых форм. Хронические миелоидные лейкозы являются редкими заболеваниями. Стоит так же отметить, что ОЛ детей отличаются от ОЛ взрослых. Если ОЛ встречается у детей в 80% случаев, то у взрослых - 15-20% [24].

Риск развития ОЛЛ у детей ассоциирован с рядом факторов, наиболее значимыми из которых являются: мужской пол; возраст от 2 до 5 лет; внутриутробная экспозиция к рентгеновскому облучению (диагностическому); лучевая терапия; нейрофиброматоз I типа; генетические заболевания; большая масса тела при рождении; естественное вскармливание [20].

В патогенезе ОЛЛ основным является прогрессирующее накопление лимфобластов в КМ, что снижает потенциал дифференцировки и созревания. Для популяции лейкемических лимфобластов характерна остановка дифференцировки трансформированных лимфопоэтических клеток на специфической стадии, что снижает уровень апоптоза.

Причинами, способными вызвать ОЛЛ, являются:

- Ионизирующая радиация. При воздействии ионизирующей радиации обнаруживается учащение случаев острого лимфобластного лейкоза - в группе от 2 до 19 лет. Дозовую зависимость демонстрирует большая частота этих лейкозов у лиц, находившихся на расстоянии до 1500 м от эпицентра взрыва.
- Химические мутагены. Возможность увеличения частоты лейкозов среди лиц, которые подверглись воздействию бензола, известна давно. Вполне логично, что и другие химические факторы являются мутагенами и индуцируют развитие лейкозов.
- Вирусы. Установлено, что Т-лимфотропный ретровирус человека (HTLV-1) имеет значение в возникновении Т-клеточного лейкоза, а вирус Эпштейн-Барра имеет значение в онкогенезе при В-ОЛЛ, лимфомах Беркитта и лимфомах, ассоциированных с ВИЧ.
- Генетическая предрасположенность. Некоторые аллельные варианты генов ассоциированы с повышенным риском развития ОЛЛ. Также риск развития ОЛЛ резко повышен у больных синдромом Дауна — примерно в 40 раз у детей в возрасте до четырёх лет.

Стоит отметить, что при некоторых генетически детерминированных нарушениях (синдром Блума, анемия Фанкони, агаммаглобулинемия) так же увеличивается риск развития ОЛЛ [7].

1.2 Гемопоз

Кроветворение – сложный процесс, включающий в себя много стадий клеточных дифференцировок, итогом которых является выход в кровеносное русло таких форменных элементов, как лейкоциты, эритроциты и тромбоциты [7]. Изучение кроветворения может помочь ученым и врачам лучше понять процессы, лежащие в основе расстройства кроветворения и рака. Кроме того, гемопозитические стволовые клетки (ГСК), могут быть использованы в качестве модельной системы для понимания стволовых клеток тканей и их роли в старении и онкогенезе [35].

Признанной современной схемой кроветворения является схема И.Л.Черткова и А.И.Воробьева. Она унитарна. Существуют полипотентные клетки – предшественницы для всех ростков, которые морфологически не отличаются от зрелых лимфоцитов. Их называют стволовыми клетками и основной их признак – способность пролиферировать и дифференцироваться в различных направлениях, в результате чего появляются нормальные клетки периферической крови (ПК) (рисунок 2).

Как стало известно в последнее десятилетие, истинными родоначальниками клетками гемопоза являются эмбриональные полипотентные стволовые клетки (ПСК), которые закладываются в период формирования плода в желточном мешке. ПСК не имеют признаков линейной дифференцировки и способны образовывать клоны клеток всех гемопозитических линий [29].

Число ПСК незначительно и у человека составляет около 40000. Их характеристика базируется на данных иммунологического фенотипирования (ИФТ) с помощью моноклональных антител (МКА). На мембранах клеток постепенно появляются различные белковые молекулы, определяемые МКА. ПСК не имеют признаков линейной дифференцировки.

Индукцию пролиферации стволовых клеток осуществляет, в основном, система микроокружения, а также ряд ростовых факторов, вырабатываемых стромальными клетками.

Пул полипотентных предшественников составляет очень небольшую часть всех ядродержащих элементов КМ (0,01%). Однако его пролиферативной способности достаточно для того, чтобы обеспечить необходимую потребность системы. В КМ человека в день продуцируется 2^{10} клеток, что составляет 300 грамм, эту потребность обеспечивает 5% ПСК, находящихся в митотическом цикле, в то время как все остальные находятся в фазе покоя (Go).

ПСК обеспечивают две потребности системы: постоянство исходного пула и уход из него части клеток в созревающую фракцию. Предполагается, что направление развития избирается клеткой случайно, стохастически.

Модель гемопоэза предполагает выделения на первом этапе дифференцировки ПСК клеток-предшественников миелоидного и лимфоидного ряда, пути развития которых рознятся. Клетки миелоидного ряда пролиферируют и дифференцируются в КМ до зрелых форм. Клетки лимфопоэза же разделяются на Т-, В- и NK-линии [36].

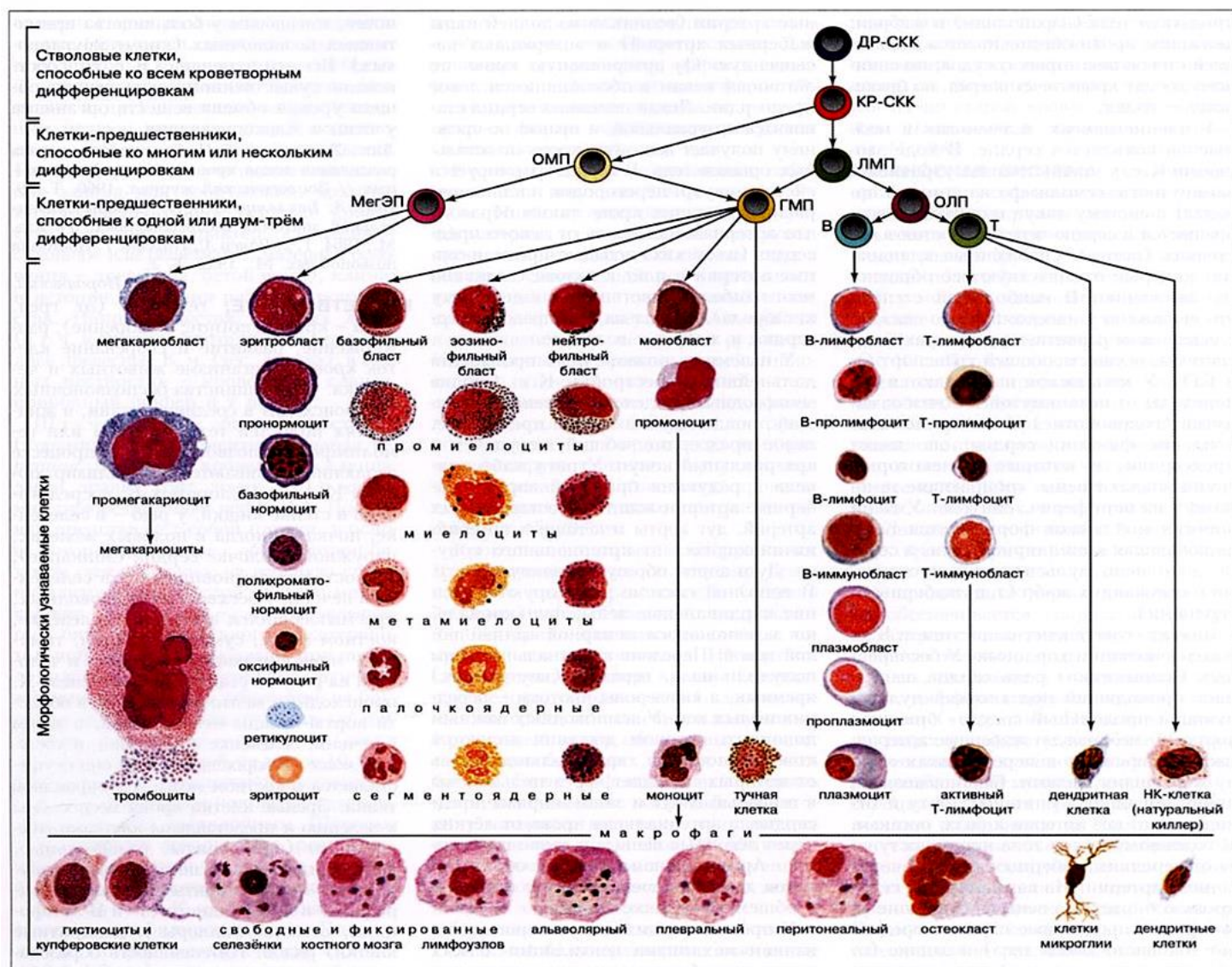


Схема кроветворения: СКК – стволовые кроветворные клетки, ДР – длительно репопулирующие, КР – коротко репопулирующие, ОМП – общий миелоидный предшественник, МегЭП – мегакариоцитарно-эритроидный предшественник, ЛМП – лимфомиелоидный предшественник, ГМП – гранулоцитарно-макрофагальный предшественник, ОЛП – общий лимфоидный предшественник, В – клетка-предшественник В-лимфоцитов, Т – клетка-предшественник Т-лимфоцитов.

Рисунок 2 – Схема гемопоэза [29]

1.2.1 Лимфопоэз

Как говорилось ранее, лимфоидный росток гемопоэза представляет собой Т-, В- и NK-линии.

Ранние В-предшественники проходят ряд этапов развития в КМ, они так же проходят там и антигеннезависимую стадию дифференцировки. При этом происходит реаранжировка генов иммуноглобулинов, расположенных на хромосомах 2, 22, 14. Отдельные этапы дифференцировки характеризуются появлением специфических макромолекул, определяющих ИФТ клеток.

Развитие В-клеток зависит от ряда специфических цитокинов и контакта с микроокружением.

Дифференцировка В-клеток от ОЛП регулируется несколькими факторами, такими как транскрипционный фактор E2A (E-box binding protein 2A), ранний фактор В-клеток-1 (EBF1), PU.1 (purine box factor 1), ген Ikaros, белок PAX5.юимеющий спаренный домен (paired domain protein) и CXCL₁₂. Эти факторы являются результатом взаимодействия интерлейкина-7 (IL-7) и их рецептора CD127 (IL-7R α), присутствующего в В-лимфоците. Вместе эти факторы играют одну из ведущих ролей при определении приверженности гемопоэтических клеток-предшественников к В-линейному ряду и перестройки генов тяжелой цепи иммуноглобулинов.

Первой клеткой в В-лимфоидном ряду является про-В-клетка. Присутствие стромальных клеток и IL-7 способствует нормальной дифференцировке В-лимфоцитов. Про-В-клетки экспрессируют CD45^{dim} (dim содержит клетки с низким уровнем экспрессии целевого маркера), CD22, CD34, терминальную дезоксирибонуклеотидил трансферазу (TdT) и CD38^{high}. Фактор PAX5 активирует экспрессию CD19, одного из самых преждевременных антигенов В-лимфоцитов. На следующем этапе дифференцировки эти клетки экспрессируют CD10^{high}, CD34, CD79a, CD38^{high}, TdT и называются Pro-BI. Именно на этом этапе начинается рекомбинация гена иммуноглобулина (Ig) в локусе тяжелой цепи. Ген тяжелой цепи присутствует в сегментах, которые кодируют переменную (V), разнообразную (D), соединяющую (J) и постоянную (C) области. Генная рекомбинация инициируется рекомбиназой, активирующей генные белки RAG1 и RAG2; эти белки обладают способностью связывать и расщеплять ДНК в определенных сигнальных последовательностях рекомбинации, называемых RSS (recombination signal sequences) [8].

Эти RSS окружают каждый генный сегмент V, D и J. Во время рекомбинации сегменты гена D и J сближаются – этот сегмент DJ соединяется с V-образным перестроенным экзоном V-сегмента. Клетки Pre-BI также экспрессируют TdT, который ответственен за катализ случайного добавления

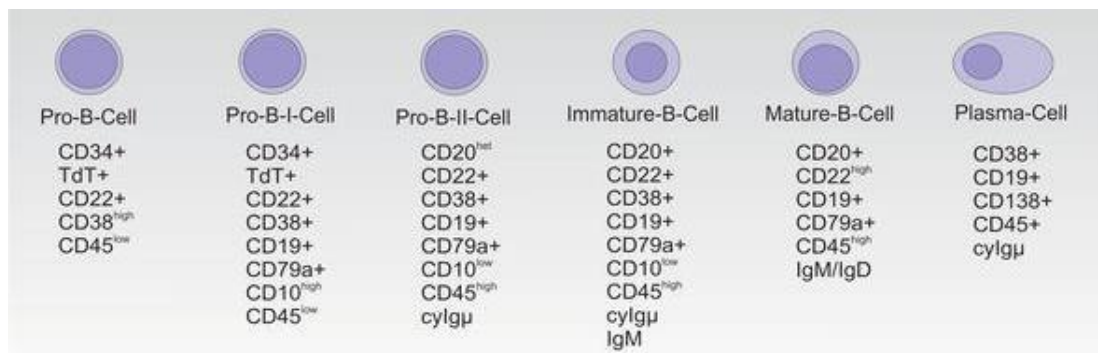
соединительных (N) нуклеотидов. Перестройка VDJ в настоящее время соседствует с константной областью $C\mu$ и создает активный ген, который кодирует тяжелую цепь, синтез которой является источником внутрицитоплазматической цепи (IgM), и с этого момента эти клетки стали называться pre-B II.

У pre-B II клеток гетерогенная экспрессия CD20 и уже отсутствует экспрессия CD34 и TdT. Кроме того, В-лимфоцит экспрессирует комплекс, известный как рецептор пре-В-клеток (пре-BCR), который образован тяжелой цепью μ (Ig μ), связанной с легкой цепью (λ_5 и пре-BV), присоединенной к гетеродимеру Ig α (CD79a) и Ig β (CD79b). Если пре-BCR способен связываться с микроокружением костного мозга, *immune-receptor tyrosine-based activation motif* (ITAMs) домены Ig α и Ig β фосфорилируются, и их передача сигналов спасает эти клетки от апоптоза. Этот положительный отбор подтверждает, что сгенерированная цепь Ig μ является функциональной, а клетки pre-B II, обнаруженные с нефункциональным Ig μ , удаляются. Сигналы, генерируемые пре-BCR, также стимулируют дифференцировку pre-B II и ответственны за их пролиферацию в костном мозге, ингибируя рекомбинацию тяжелых цепей и стимулируя рекомбинацию легких цепей. Перегруппировка легкой цепи включает в себя соединение V с J-сегментом, образующим VJ-экзон, связанный с Ig μ -цепью. Эта ассоциация активирует трансляцию каппа и лямбда белков, что приводит к образованию полной молекулы IgM. В-клетка, которая экспрессирует молекулу IgM на клеточной мембране, называется незрелой В-клеткой (immature-B-cell).

Незрелые В-лимфоциты начинают экспрессировать некоторые иммунофенотипические маркеры еще наивных, но зрелых В-лимфоцитов: экспрессия CD20, повышенную экспрессию CD45, CD10^{dim} и CD38^{high}, низкую экспрессию CD21, CD5 (гомогенную) и высокие уровни CD81.

Эти клетки подвергаются положительному и отрицательному процессу отбора до завершения их созревания и получения статуса зрелой клетки. Во время этого процесса В-лимфоциты, которые успешно завершили программу перегруппировки генов, позитивно отобраны, далее происходит выключение генов RAG, и эти клетки получают сигналы выживания для продолжения процесса созревания. Тем не менее, когда В-лимфоцит распознает аутоантигены, их рецептор модифицируется, гены RAG реактивируются, и начинается другая перестройка в легкой цепи V-J, позволяющая В-клетке развить нереактивный BCR. Однако, если эта перегруппировка не удалась, эта клетка подвергается апоптозу в процессе, известном как отрицательная селекция. Положительно отобранные клетки покидают костный мозг и завершают свое созревание во вторичных лимфоидных органах [34].

Зрелые В-лимфоциты лишены CD10 и CD38 и экспрессируют IgD и IgM на своей мембране. Экспрессия IgD происходит, когда сегмент VDJ транскрибируется экзоном C δ вместо C μ . Дифференцировка В-лимфоцитов в костном мозге неоднородна и проходит несколько стадий созревания, которые можно наблюдать с помощью анализа иммунофенотипических характеристик (рисунок 3).



Pro-B-Cell	Pro-B-I-Cell	Pro-B-II-Cell	Immature-B-Cell	Mature-B-Cell	Plasma-Cell
CD34+	CD34+	CD20 ^{int}	CD20+	CD20+	CD38+
TdT+	TdT+	CD22+	CD22+	CD22 ^{high}	CD19+
CD22+	CD22+	CD38+	CD38+	CD19+	CD138+
CD38 ^{high}	CD38+	CD19+	CD19+	CD79a+	CD45+
CD45 ^{low}	CD19+	CD79a+	CD79a+	CD45 ^{high}	cyIgμ
	CD79a+	CD10 ^{low}	CD10 ^{low}	IgM/IgD	
	CD10 ^{high}	CD45 ^{high}	CD45 ^{high}		
	CD45 ^{low}	cyIgμ	cyIgμ		
			IgM		

Рисунок 3 – Созревание В-лимфоцитов [34]

1.3 Лейкогенез

Изучение механизмов развития и прогрессии ОЛЛ с последующей разработкой диагностических и терапевтических подходов является приоритетным направлением детской онкогематологии и патофизиологии.

В настоящее время можно считать доказанным, что возникновение, темпы роста, гистогенез и прогрессия клеток гемопоэтической системы при гемобластозах обусловлены изменениями структурных элементов генома клетки [29]. Для лейкозных клеток характерны нарушения клеточного гомеостаза с дестабилизацией структуры генома и дисбалансом процессов пролиферации/апоптоза [26]. Подобные изменения могут быть закреплены в геноме и наследоваться, либо появляться *de novo* в клетке и стимулировать развитие опухолевого процесса.

К генетическим детерминантам клетки, вовлеченным в канцерогенез, относятся:

- Протоонкогены – нормальные клеточные гены, участвующие в регуляции транскрипции, роста, клеточного цикла, передачи сигналов. В случаях их структурных изменений или гиперэкспрессии нарушается

контроль нормального роста и дифференцировки. Активированные протоонкогены называются онкогенами.

- Гены-супрессоры (антионкогены) – гены, кодирующие ключевые рецепторные белки, потеря которых ведет к нарушению процесса пролиферации.
- Гены-модуляторы – гены, не отвечающие за злокачественную трансформацию опухоли, но способствующие её распространению [29].

Всего известно немногим более 100 протоонкогенов. Изменения их структуры или гиперэкспрессия приводят к продукции дефектных онкобелков, что ведет к нарушению взаимосвязи с белками-партнерами и в конечном итоге – к трансформации клетки.

Существуют три основных механизма активации протоонкогенов:

- Мутации в первичной структуре протоонкогена. В генезе гемобластозов важной является мутации генов семейства RAS, так как белки, ими кодируемые, работают в качестве внутриклеточных переносчиков сигналов регуляции роста от рецепторов, находящихся на поверхности клетки, к внутриклеточным мишеням [19].
- Амплификация протоонкогенов. В результате этого процесса наблюдается аномально высокая продукция кодирующих белков в клетках. Активация гена MYB (p75 MYB) необходима для нормальной пролиферации, однако его экспрессия нарушена (повышена) при ОЛЛ. [6]
- Перестройка ДНК клетки, затрагивающая структуру протоонкогена. Превращение протоонкогена в активированный онкоген может быть следствием структурных перестроек геном, часто путём реципрокной транслокации, но и не исключая потерю участков ДНК.

Предрасположенность к развитию злокачественных новообразований и опухолевая прогрессия модифицируются аллельными вариантами генов, контролирующих деление, апоптоз клеток и эксцизионную репарацию ДНК. В их число включаются однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) dupl6 bp (11951-11966), G12141C и G13494A гена *p53*, deB2bp (794-825) гена *CCR5*, G28152A гена *XRCC1* и A35931C гена *XPB*. Исследованию названных полиморфизмов при остром лимфолейкозе у детей посвящены единичные работы зарубежных авторов [26].

Наиболее значимым из них является ген *p53*, который кодирует фактор транскрипции и обеспечивает продукцию и функционирование белков контроля клеточного деления. Инактивация этого гена дает клеткам большие селективные преимущества в пролиферации, тем самым стимулируя опухолевый процесс [29].

Практически у 90% больных ОЛЛ находят генетические поломки, характеризующиеся различными дефектами хромосом. На основании результатов цитогенетических исследований ОЛ в настоящее время классифицированы, выявлены их отдельные формы. Частичная информация об ассоциации различных цитогенетических аномалий с подтипами ОЛ представлена в таблице 1.

При ОЛЛ принципиальным является обнаружение транслокации (9;22) или (4;11) как фактора резко неблагоприятного прогноза и гиперплоидии, характерной для вариантов ОЛЛ с благоприятным течением (наиболее часто встречается при ОЛЛ у детей). Транслокация (9;22) определяется у 1-2 % детей, а среди взрослых пациентов — у 25-30 %. К транслокациям, обуславливающим плохие результаты терапии ОЛЛ, относятся (8; 14) и (8;22) [17]. Стоит так же отметить, что делеции в гене IKZF1 являются маркёрами неблагоприятного прогноза ВП-ОЛЛ у детей [39].

Таблица 1 – Характерные aberrации при различных вариантах ВП-ОЛЛ

Наиболее характерные изменения кариотипа	Вариант ОЛЛ
T(1;19)(q23;p13.3)	Пре-В-клеточный
Трисомия 4 или 10	Пре-В-клеточный
T(7;12)(q11;p12) T(8;14)(q23;q32) T(8;22)(q24;q12) T(9;22)(q34;q11.2) T(12;221)(p13;q22)	В-клеточный

У детей, страдающих ОЛЛ, на этапе первичной диагностики заболевания необходимо проводить молекулярно-генетический анализ полиморфизмов *dup 16 bp* (интрон 3), G12141 (экзон 4) и G13494A (интрон 6) гена *p.53* для уточнения прогностического риска рецидива заболевания [26].

Следует так же обратить внимание на широкую группу цитокинов (белковых молекул, образуемых и секретируемых клетками иммунной системы), участвующих в процессах онкогенеза. На сегодняшний день среди них можно выделить интегрины, интерлейкины (ИЛ), колониестимулирующие факторы (КСФ), факторы некроза опухолей (ФНО) и интерфероны (ИНФ) [33]. Из интерлейкинов наиболее выраженным противоопухолевым потенциалом обладает ИЛ-2, который способен активировать все виды цитотоксических клеток. ИЛ-1 обладает способностью увеличивать дифференцировку пре-В- и В-

лимфоцитов и цитотоксических клеток; регулировать синтез ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО и КСФ; усиливать функциональную активность макрофагов с модуляцией их противоопухолевого действия; активировать НК [28].

Также известна роль ИЛ-1 в нейроиммунных взаимоотношениях: ИЛ-1 повышает уровень глюкокортикоидных гормонов в крови. Противоопухолевый потенциал ИЛ-1, ИЛ-2 и ИЛ-6 отмечается и другими авторами: ИЛ-1 активирует CD3⁺клетки, ИЛ-2 активирует НК и индуцирует апоптоз, ИЛ-6 вызывает созревание CD3⁺ и CD19⁺клеток [25, 1]. КСФ, являясь гликопротеином, регулирует продукцию нейтрофилов и моноцитов, участвующих в процессах естественного иммунитета [19]. ФНО выделяются макрофагами и обладают прямым разрушающим действием на опухолевые клетки, действуя в синергизме с ИНФ. Была выявлена достоверная положительная корреляция между уровнем ФНО и абсолютным содержанием лейкозных клеток в периферической крови, закономерная связь показателя концентрации ФНО с ранним ответом на терапию [1].

1.3.1 Апоптоз

Как говорилось ранее, в основе механизмов трансформации клетки лежит изменение контроля пролиферации или апоптоза.

Апоптоз – генетически запрограммированный путь клеточной смерти, участвующий в поддержании тканевого гомеостаза. Этот механизм может быть вызван различными сигналами: нехваткой факторов роста, повреждением ДНК и нарушениями в структуре цитоскелета, связыванием с рецепторами специфических киллерных лигандов и другими факторами [29].

Одной из особенностей лейкозной клетки является её способность избегать уничтожения либо за счет увеличения продолжительности жизни, либо за счет увеличения пролиферативного потенциала. Клетка теряет способность воспринимать физиологические сигналы о необходимости прекращения функции, о необходимости к переходу в другое состояние для обеспечения поддержания нормального гомеостаза организма. Необычно высокая экспрессия белков гиперсемейства генов, контролирующих клеточную гибель, вызывает изменения срока жизни клетки, популяции и влияет на эффективность отдельных видов химиотерапии [12].

В канцерогенезе апоптозу отводится одна из ключевых ролей. Известно, что высокая степень апоптоза в опухолях с высокой степенью злокачественности является фактором неблагоприятного прогноза. Хотя в опухолях нарушается баланс между пролиферацией и гибелью клеток в пользу пролиферации, в опухолях наиболее важную роль играет снижение гибели клеток.

Активация онкогенов тесно связана с пролиферацией и апоптозом. И хотя, согласно основному принципу, пролиферация должна превалировать над гибелью, важной приобретенной особенностью опухолевых клеток является супрессия апоптоза [15]. Апоптоз клеток опухоли:

- Стимулирует периферический ответ незлокачественных клеток компонента микроокружения опухоли, в частности тумор-ассоциированных макрофагов, что лимитирует гибель и активирует пролиферацию;
- Подает иммуносупрессивные сигналы, что подавляет противоопухолевый иммунитет;
- Вызывает автономную продукцию факторов, которые вызывают рост клеточной популяции.

Наиболее значимым является апоптоз, опосредованный физиологическими индукторами, действие которых реализуется через клеточные рецепторы, специально предназначенные для включения программы апоптоза. Этот путь передачи сигнала апоптоза можно изобразить следующим образом: индукторы - рецепторы - адаптеры - иницирующие каспазы - регуляторы - эффекторные каспазы. Рецептор, обозначаемый FAS (CD95⁺), взаимодействуя с соответствующим лигандом, активируется и запускает программу смерти клетки, инфицированной вирусом. Взаимодействие рецептора и лиганда приводит к образованию кластеров рецепторных молекул и связыванию их внутриклеточных участков с адаптерами. Адаптер, связавшись с рецептором, вступает во взаимодействие с эффекторами - неактивными предшественниками протеаз из семейства иницирующих каспаз [33, 29].

Существует 3 растворимые формы CD95-антигена [15]. Этот растворимый белок конкурирует с локализованным на мембране рецептором CD95 в связывании лиганда и может ингибировать CD95- опосредованный апоптоз *in vitro*. Повышение сывороточного уровня растворимого CD95-рецептора обнаружено при определённых В- и Т-клеточных лейкозах [37].

1.4 Методы диагностики ОЛЛ

Диагностика ОЛЛ базируется на результатах как общеклинических (гемограмма, биохимический анализ крови), так и специальных методов исследования (цитоморфологическое и цитохимическое исследование бластных клеток, цитогенетический анализ, иммунофенотипирование лейкозных клеток методом проточной цитофлуорометрии, по показаниям – молекулярно-биологические исследования методом ПЦР).

1.4.1 Гемограмма

На первом этапе проводится общий анализ крови (в динамике). Повторные исследования необходимы для исключения ошибки.

В анализе крови у больных наблюдается: угнетение миелоидного ростка кроветворения (эритроцитопения, тромбоцитопения), повышение СОЭ, лейкоцитоз (не во всех случаях), изменения ЦП, появление в ПК бластных клеток. Анемия является не постоянным признаком [29, 16].

В целом же для точной постановки диагноза необходимо использовать специальные методы исследования, что является вторым этапом для подтверждения диагноза ОЛ.

1.4.2 Цитоморфологическое и цитохимическое исследование

Цитоморфологическое исследование выполняется методом световой микроскопии при увеличении в 700-1000 раз мазков аспиратов КМ и/или ПК, окрашенных по Романовскому-Гимзе. Морфологические и цитохимические признаки, позволяющие установить варианты ОЛ, основаны на критериях FAB-классификации. Среди цитохимических реакций окраска на фосфолипиды суданом черным является одним из наиболее достоверных критериев дифференциальной диагностики. При ОЛЛ реакция отрицательная.

Лимфобласты дают отрицательную окраску на миелопероксидазу. Для бластных клеток при ОЛЛ окрашивание на неспецифическую эстеразу – гранулярное. Реакция на гликоген (ШИК-реакция) положительна.

Реакция на кислую фосфатазу является одной из наиболее чувствительных и позволяет определить принадлежность лимфобластов к Т-линейному ОЛЛ (положительная реакция) или В-линейному ОЛЛ (отрицательная реакция) [27].

1.4.3 Характеристика лейкозных клеток при ВП-ОЛЛ

Основным в анализе ОЛЛ является определение того, к какой популяции лимфоидных клеток принадлежит данный лейкоз, степень дифференцировки опухолевых клеток и соотношение разных линейно-специфических маркеров между собой.

Большинство ОЛЛ составляют В-клеточные (около 85%) и Т-клеточные (около 15%). НК-клеточные опухоли встречаются крайне редко.

ОЛЛ делят на Т- и В-клеточные, а внутри каждой группы — еще на 4 варианта, различающихся по степени созревания В- и Т-клеток. Согласно классификации EGIL-95 ВП-ОЛЛ в зависимости от наличия или отсутствия на поверхности опухолевых клеток специфических маркеров разделяются на 3 подтипа: про-В-ОЛЛ, Common В-ОЛЛ и пре-В-ОЛЛ.

Различие между В- и Т-клеточными ОЛЛ производится на основании выделения популяции пролиферирующих клеток (коэкспрессия CD79a/Ki-67 для В-ОЛЛ и CD3/Ki-67 для Т-ОЛЛ). Наборы антигенов для дифференциальной диагностики В-ОЛЛ приведены в таблице 2.

Ki67 – маркер пролиферации. Позволяет оценить уровень пролиферативной активности в случаях зрелоклеточных опухолей и дополнительно подтвердить правильность определения фенотипа бластных клеток при ОЛ [5].

Все В-ОЛЛ несут на себе CD19, цитоплазматические CD22 и CD79a, а также активационный маркер HLA-DR. По уровню дифференцировки В-ОЛЛ подразделяют на 4 группы: острый лейкоз из В-предшественника (про-В-клеточный), пре-пре-В-клеточный или обычный вариант (англ. — common), пре-В-клеточный и зрелый В-клеточный ОЛЛ.

Иммунофенотипический диагноз ВП-ОЛЛ ставится при экспрессии лейкоимическими клетками 2 и более специфичных В-линейных маркеров: CD19, Cd22, Cd79a, кроме того на лимфобластах часто присутствует МНСII класса – HLA-DR и TdT [21].

Иммунофенотипической особенностью про-В-ОЛЛ является отсутствие на поверхности опухолевых клеток экспрессии CD10 и цитоплазматического (су)IgM; основные линейно-специфические маркеры определяются.

Клетки при common-В лейкозе, в большинстве случаев экспрессируют CD34 и TdT, а также CD10 (при условии отсутствия суIgM), являющийся ключевым, для постановки этого диагноза. Имеют в цитоплазме μ -цепи иммуноглобулина, но не несут их на поверхности. Однако многие антитела к IgM могут давать неспецифические положительные реакции, поэтому к анализу этих проб надо относиться с осторожностью. Определение клеток, положительных по окраске на IgM, проводить на основании стандартного негативного

контроля нельзя. Хорошим негативным контролем может служить уровень IgM, определяемый в той же пробе на поверхности нейтрофилов, которые его никогда не экспрессируют [5].

Для pre-B-ОЛЛ обязательным является выявление су IgM.

Таблица 2 – Клеточные антигены – маркёры В-ОЛЛ

Антиген	Вариант В-ОЛЛ				
	про-В	common	пре-В	зрелый	лимфома Беркитта
CD10	-	+	-/+	-/+	+
CD19	+	+	+	+	+
CD20	-	-/+	+/-	+	+
CD22	-	+/-	+	+	+
CD34	+	+/-	-	-	-
CD79a	+	+	+	+	+
CD22 (cyt)	+	+	+	+	+
CD79a (cyt)	+	+	+	+	+
HLA-DR	+	+/-	+/-	+/-	Нет данных
TdT	+	+	+/-	-	-
IgM	-	-	-/+	+	+
IgM (cyt)	-	-	+	-/+	+
κ или λ	-	-	-	+/-*	+

Примечание. *В отсутствие κ- и λ-цепей на поверхности клеток целесообразно проверить их наличие в цитоплазме.

1.4.4 Иммунофенотипирование лейкозных клеток методом проточной цитофлуориметрии

Внедрение в диагностику моноклональных антител (МКАт) позволило охарактеризовать структуру и функцию линейно-ассоциированных и дифференцировочных антигенов, а затем и антигенов, экспрессия которых обусловлена активацией и пролиферативной активностью клеток.

Иммунодиагностика гемобластозов основана на сопоставлении морфофункциональных характеристик лейкозных бластов и нормальных/нетрансформированных клеток гемопоэза. Известно, что нормальный процесс дифференцировки клеток в костном мозге и/или тимусе происходит с определенной, достаточно постоянной скоростью, определяемой потребностью организма в кроветворных и иммунокомпетентных клетках. По мере функционального созревания лимфоидных и миелоидных клеток происходит перестройка генов, кодирующих специфические рецепторы клеток, а значит, происходит

изменение набора рецепторов для различных факторов роста, дифференцировки и межклеточного взаимодействия. По набору мембранных и цитоплазматических антигенов можно установить линейную принадлежность, стадию зрелости и функциональное состояние клетки [12].

Для количественного определения популяционного состава лейкоцитов используется способность их рецепторов взаимодействовать со специфическими антителами с образованием стабильных комплексов на поверхностной мембране клетки.

Выявление лейкозных бластов. Выявление лейкозных бластов в периферической крови и/или костном мозге методом проточной цитометрии основано на отличии их фенотипа от фенотипа неизмененных клеток. Нормальные клетки, сохраняющиеся в некотором количестве даже при выраженной опухолевой экспансии, могут использоваться как внутренний стандарт антигенной экспрессии маркеров зрелых уровней дифференцировки. Именно уровень антигенной экспрессии и физические характеристики определяют местоположение каждой популяции клеток в многомерном пространстве проточной цитометрии [12, 31].

При диагностике гематологических заболеваний предпочтительно использовать селективное гейтирование, в частности по панлейкоцитарному маркеру CD45 (low) и боковому светорассеянию (SSC). Гейтирование по гистограмме SSC/CD45 является удобным средством идентификации патологических клеток, так как обычно бласты занимают (на точечном графике SSC/CD45) такое место, где очень мало здоровых клеток. Особенно ярко это видно на образцах ПК (рисунок 5).

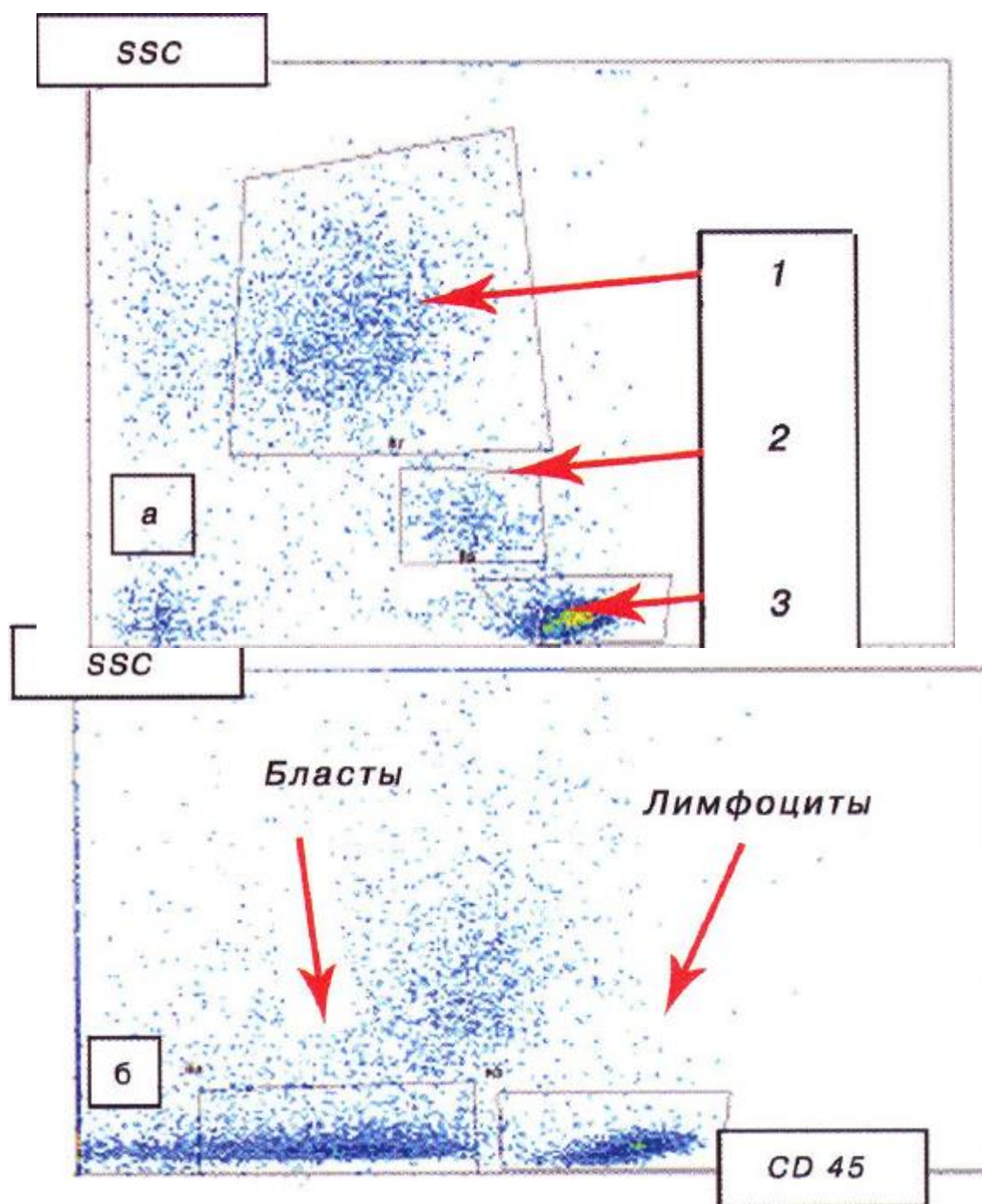


Рисунок 5 – Точечный график SSC/CD45 [12]

Примечание: а – ПК пациента с отсутствием онкогематологических заболеваний. Стрелками указаны обычные места расположения основных популяций клеток: гранулоцитов (1), моноцитов (2) и лимфоцитов (3); б – ПК больной ОЛЛ. Стрелками указаны неизмененные лимфоциты с обычным уровнем экспрессии CD45, бластные клетки с таким же низким уровнем гранулярности и сниженной яркостью экспрессии CD45

Использование определенного маркера для селективного гейтирования патологической популяции предполагает, что МКАт к этому маркеру должны быть включены во все пробирки. Желательно, чтобы гейтирующий маркер был конъюгирован с флюорохромом (FITC, PE) для учета по третьему или, если есть техническая возможность, по четвертому каналу флюоресценции. Это дает максимальный простор для выбора других маркеров и определения их сочетанной экспрессии внутри патологической популяции [12].

Однако даже теоретически не может быть определен вариант гейтирования, подходящий для всех вариантов злокачественной трансформации гемопоэтических клеток. Поэтому так важно иметь широкий выбор диагностических МКАт для определения фенотипа злокачественных клеток в разных клинических ситуациях.

1.4.5 Аберрантность иммунофенотипа

Иммунологическая классификация ВП-ОЛЛ основана на представлении об экспрессии линейно-специфических и стадийно-специфических антигенов на поверхности клеток в ходе нормальных этапов дифференцировки В-лимфоцитов. Однако, в настоящее время установлено, что лейкоимические бласты при ВП-ОЛЛ демонстрируют многочисленные иммунофенотипические аберрации по сравнению с их нормальными гемопоэтическими аналогами [21]. Такие особенности определяют лейкоз-ассоциированный иммунофенотип (ЛАИФ) опухолевых клеток, который играет важную роль в диагностике ОЛЛ и оценке минимальной остаточной болезни (МОБ) на этапах противоопухолевой терапии [11].

Понятие ЛАИФ при ВП-ОЛЛ включает в себя:

- Асинхронную экспрессию – одновременная экспрессия антигенов, относящихся к разным стадиям дифференцировки (в норме никогда не определяется одновременная экспрессия ранних и поздних антигенов);
- Аберрантную экспрессию миелоидных маркеров (CD13, CD33, CD 117, CD 15) или же Т-линейных маркеров (CD2, CD3, CD4, CD8, CD5);
- Увеличение/снижение экспрессии специфичных маркеров (повышенная экспрессия CD10 при common-B лейкозе) [25].

1.5 Основные маркёры ВП ОЛЛ

На стадии Про-В лимфоцитов наблюдается стабильная экспрессия CD34 и TdT, низкая экспрессия CD10 и полное отсутствие CD20. По мере созревания, на стадии Пре-Пре-В лимфоцитов, происходит постепенная потеря таких маркеров как CD34 и TdT, становится более выраженной экспрессия CD10. На следующей стадии (Пре-В лимфоцитов) постепенно появляется экспрессия CD20, suIgM и слабое проявление поверхностного IgM. На этих стадиях клетки умеренно экспрессируют CD22, а также выявляется выраженная экспрессия CD38. А экспрессия таких маркеров как CD79a, CD19 и HLA-DR стабильна на протяжении всех этапов дифференцировки В-лимфоцитов.

Позитивной для поверхностных маркеров считается экспрессия на 20% клеток, а для цитоплазматических – 10% [27].

Определение линейной коммитированности опухолевых клеток тем проще, чем больше дифференцировочных маркеров на поверхности клетки. Трудности в определении линейной принадлежности бластов чаще всего связаны с отсутствием экспрессии линейных маркеров и с существованием перекрестной экспрессии поверхностных антигенов.

CD45, также известный как LCA (от англ. «leukocyte common antigen») или T200, является трансмембранным гликопротеином I типа с молекулярной массой 180-220 кДа.

Уровень экспрессии CD45 нарастает по мере дифференцировки гемопоэтических клеток от незрелых предшественников до зрелых форм. Молекула CD45 слабо экспрессируется на всех клетках пула стволовых гемопоэтических клеток, максимальные уровни характерны для зрелых лимфоцитов, промежуточные уровни экспрессии демонстрируют миелоидные клеточные элементы. Различия в уровнях экспрессии антигена CD45 на гемопоэтических клетках широко используются при цитофлуориметрическом анализе клеток при острых лейкозах позволяя точно разграничить гейт (*гейте* – клеточная популяция с заданными характеристиками) бластных клеток [18, 38].

CD10 или CALLA (Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen). Нейтральная эндопептидаза. Это интегральный мембранный белок II типа, с массой 100 кДа. CALLA обычно присутствует на поверхности ранних лимфоидных клеток и служит для идентификации common-В лейкоза [38, 30].

CD19 (известный как B4). Комплекс CD21-CD19- CD81 играет важную роль в амплификации сигнала, полученного В-клеткой через BCR. Экспрессия CD19 обнаруживается со стадии про-В-клетки и сохраняется на протяжении всей жизни В-лимфоцита, несколько снижаясь лишь на плазматических

клетках. Этот антиген рассматривается в качестве «линейного» маркера всех В-лимфоцитов. Один В-лимфоцит несет около 18 тысяч молекул [18].

CD79a гликопротеин массой 40-45кДа и принадлежит к классу Ig, экспрессирующихся на поверхности. Этот белок специфически и строго экспрессируется по всему В-лимфоцитарному ряду. Он возникает рано в онтогенезе, вероятно, до экспрессии цитоплазматической μ -цепи, и присутствует в цитоплазме плазматиков [38].

TdT - терминальная дезоксирибонуклеотидил трансфераза, внутриклеточная ДНК-полимераза. В норме определяется в ядре незрелых В- и Т-лимфоидных клеток и исчезает по мере их созревания. TdT- позитивные клетки присутствуют только в костном мозге и тимусе. Наличие фермента более характерно для клеток лимфоидного ряда, однако многочисленные исследования выявили его также в миелобластах, поэтому присутствие TdT является скорее признаком клеточной незрелости, чем маркером лимфобластов [18].

CD22 представляет собой трансмембранный гликопротеин из суперсемейства Ig. Он может экспрессироваться в двух изоформах: α -форма (130кДа) и β -форма (140кДа). CD22 экспрессируется в цитоплазме предшественников В-лимфоцитов, а затем на поверхности зрелого В-лимфоцита. Экспрессия заканчивается после превращения в плазмочит. Этот маркер отсутствует в Т-лимфоцитах ПК, гранулоцитах и моноцитах [38].

CD20 – интегральный негликозилированный мембранный белок. Представлен на всех нормальных В-лимфоцитах в ПК, лимфатических узлах селезенке, миндалинах и КМ, отсутствует на плазмочитах.

HLA-DR – один из антигенов гистосовместимости II класса, обнаруживаются на антигенпрезентирующих (APC), дендритных клетках, моноцитах и тимических клетках, а так же экспрессирован на всех стадиях дифференцировки В-клеток, кроме плазматических, а также на макрофагах и активированных Т-лимфоцитах. Он представлен также на определенной стадии незрелых миелоидных клеток. Примитивные гемопоэтические предшественники экспрессируют CD34, но не содержат антиген HLA-DR, тогда как более дифференцированные предшественники экспрессируют как CD34, так и HLA-DR. В нормальной дифференцировке миелоидных клеток HLA-DR отсутствует на более зрелых клетках гранулоцитарного роста, начиная с промиелоцитов [18, 38].

CD34 – мономерный трансмембранный фосфогликопротеин с массой 110кДа. Это антиген гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников (характерен для про-В ОЛЛ), который, являясь молекулой клеточной адгезии, способствует независимому соединению гемопоэтических стволовых клеток с клеточными элементами стромы костного мозга. Высока корреляция его экспрессии с HLA-DR и TdT.

CD34 обнаруживается в 70% случаев детского ОЛЛ. Прогностическое значение экспрессии CD34 различное – благоприятное при В-ОЛЛ [14, 30].

cyIgM отсутствует на ранних В-клетках, появляясь позднее, указывая на зрелость В-лимфоцитов, соответственно характеризует Пре-В-ОЛЛ [40].

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Материал исследования

Материалом исследования являлась капиллярная кровь (ОАК) и аспират КМ 319 пациентов, обратившихся в РНПЦ ДОГИ по направлению врачей учреждений здравоохранения Республики Беларусь. Пациенты были отобраны для исследования показателей крови и иммунофенотипической характеристики клеток при ВП ОЛЛ.

Для сравнения показателей использовали данные гемограмм и иммунофенотипирования клеток, которые были составлены для 219 человек, прошедших лабораторно-иммунологическое обследование в РНПЦ ДОГИ.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Забор крови

Забор крови из пальца осуществляли в пробирку с гепарином. Забор крови проводили у 219 пациентов РНПЦДОГ в утренние часы натощак (последний прием пищи должен быть не позже, чем за час до сдачи крови). Накануне исследования и в день забора крови исключались физические и эмоциональные перегрузки, а также жирная еда [21].

2.2.2 Получение и интерпретация результатов ОАК

ОАК позволяет получить сведения о количественном и качественном составе форменных элементов крови:

- Содержание гемоглобина (Hb)
- Определение общего числа лейкоцитов (WBC) и процентного соотношения отдельных форм среди них
- Определение числа тромбоцитов (PLT)

Гемоглобин (Hb) – основной компонент эритроцитов, представляет собой сложный белок, основная функция которого состоит в переносе кислорода от легких к тканям, а также в выведении углекислого газа из организма и регуляции кислотно-основного состояния.

Для детей уровень Hb в норме (г/л) составляет: 118-150 г/л (0-4 лет), 120-150 г/л (5-13 лет), 130-160 г/л (от 14 лет).

При ОЛЛ видно снижение уровня Hb.

Лейкоциты – это форменные элементы крови, основной функцией которых является защита организма от чужеродных агентов.

Для детей уровень лейкоцитов в норме ($\times 10^9$ клеток/л) является: 4,5-9,5 $\times 10^9$ клеток/л (3-5 лет), 4,2-9,5 $\times 10^9$ клеток/л (6-13 лет), 4-9,5 $\times 10^9$ клеток/л (от 14 лет).

Как говорилось в разделе 1.4.1, зачастую, наблюдается повышенное содержание лейкоцитов.

Тромбоциты – участвуют в процессах свертывания крови.

Уровень тромбоцитов в норме ($\times 10^9$ клеток/л) составляет 150-450 $\times 10^9$ клеток/л (от 1 года) [22].

2.2.3 Получение аспирата костного мозга

Пункция костного мозга – прокол костной пластинки и получение материала из губчатых костей скелета. Проводится, с целью получения его ткани для ИФТ. В ходе манипуляции используют специальные иглы, снабженные предохранительными элементами, препятствующими слишком глубокому проникновению в кость, обеспечивая безопасность производимой процедуры. Проводится под сопровождением местных анестетиков [9].

Для иммунофенотипического исследования проводится забор 1-2 мл костного мозга в пробирки с антикоагулянтом (исследование иммунофенотипа — гепарин или EDTA). Материал хорошо размешивается с антикоагулянтом, чтобы предотвратить его свертывание [2].

2.2.4 Получение мононуклеаров из аспирата КМ

Выделение популяции мононуклеарных клеток крови и обработка клеток с помощью МКАт выполняется в соответствии с инструкциями фирмы-изготовителя, прилагаемыми к поставляемым реагентам. Методика подробно изложена также в практических руководствах по проточной цитометрии. При работе с МКАт предпочтительнее работать с мононуклеарами.

Для выделения мононуклеаров аспират костного мозга наслаивают на гистопак (Histopaque 1077, «Sigma») или раствор фиколл-верографина плотностью 1,077 г/см³ в соотношении 2:1 и центрифугируют при 1200 об/мин в течение 30 мин. Слой клеток в интерфазе собирают, переносят в чистую пробирку и отмывают дважды фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ) с 0,1% азидом натрия путём центрифугирования взвеси клеток при 2200 об/мин в течение 3 минут. Затем готовят взвесь клеток с концентрацией 5-10 млн/мл, вносят её по 100 мкл в предварительно промаркированные пробирки [27].

2.2.5 Иммунофенотипирование бластных клеток с помощью проточной цитометрии

В каждую пробирку вносят одно или несколько МКАт, конъюгированных с различными флуорохромами. Целесообразно сочетание лимфоидных маркеров с миелоидными. В качестве третьих в эти же пробирки могут вноситься МКАт, выявляющие линейно-неспецифичные маркеры (CD45, CD34, HLA-DR) [32,27].

Пробирки, содержащие МКАт и клетки (из расчета 1 мкг на 1 мкл), инкубируют в темноте при комнатной температуре в течение 20-30 мин., после чего дважды отмывают центрифугирование с 0,5 мл ФСБ. К ресуспендированному осадку добавляют 250 мкл 1% раствора параформальдегида и оставляют при +4°C до момента учета результатов на проточном цитометре (до 2 суток).

Определение внутриклеточных маркеров требует предварительной пермеабиллизации клеточных мембран до внесения МКА. С этой целью мононуклеары сначала инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре с фиксирующим раствором (FACSL Lysing Solution), затем отмывают и обрабатывают 10 мин при комнатной температуре пермеабиллизующим раствором (FACS Permeabilizing Solution). Осадок клеток отмывают, инкубируют с МКА при + 4°C в течение 30 мин, далее обрабатывают, как описано выше. Для пермеабиллизации могут применяться и другие методы, например, с использованием 0,1% раствора сапонины или готовых пермеабиллизующих составов фирм-производителей МКА.

Таблица 3 – Панель моноклональных антител для диагностического иммунофенотипирования ОЛ

№	FITC	PE	PC-5	PC-7
1	HLA-DR	CD14	CD3	CD45
2	CD4	CD1a	CD8	CD45
3	CD2	CD117	CD34	CD45
4	CD19	CD33	CD10	CD45
5	CD20	CD22	CD5	CD45
6	IgM	CD13	CD7	CD45
7	CD65	CD15	CD56	CD45
8	TdT	cyCD79a	-	CD45
9	MPO	cyCD22	cyCD3	CD45
10	cyIgM	-	-	CD45

2.2.6 Интерпретация результатов иммунофенотипирования

При анализе полученных данных принято считать позитивными те маркеры, которые обнаружены не менее чем на 20% бластных клеток – для поверхностных маркёров, для наиболее специфичных цитоплазматических маркеров (суIgM, суCD3, CD79a) EGIL-95 рекомендует снижать лимит позитивности до 10%.

Анализ клеток, маркированных МКА, конъюгированными с флуорохромами, выполняется на проточных цитофлуориметрах (фирм «Coulter»). Для учета и анализа полученных данных используют прикладные программы CellQuest, PAINT-A-GATE или их аналоги. Обычно учитывают по 10 тыс. клеток из каждой пробы. При анализе результатов сначала по параметрам светорассеяния FSC/SSC и экспрессии CD45 выделяют популяцию предположительно бластных клеток, после чего в ней определяют показатели флуоресценции исследуемых маркеров в каждой пробе (рисунок 6). Позитивность маркеров определяется по отношению к негативному контролю, в котором вместо МКА клетки обрабатывают мышиными IgG аналогичного изотипа.

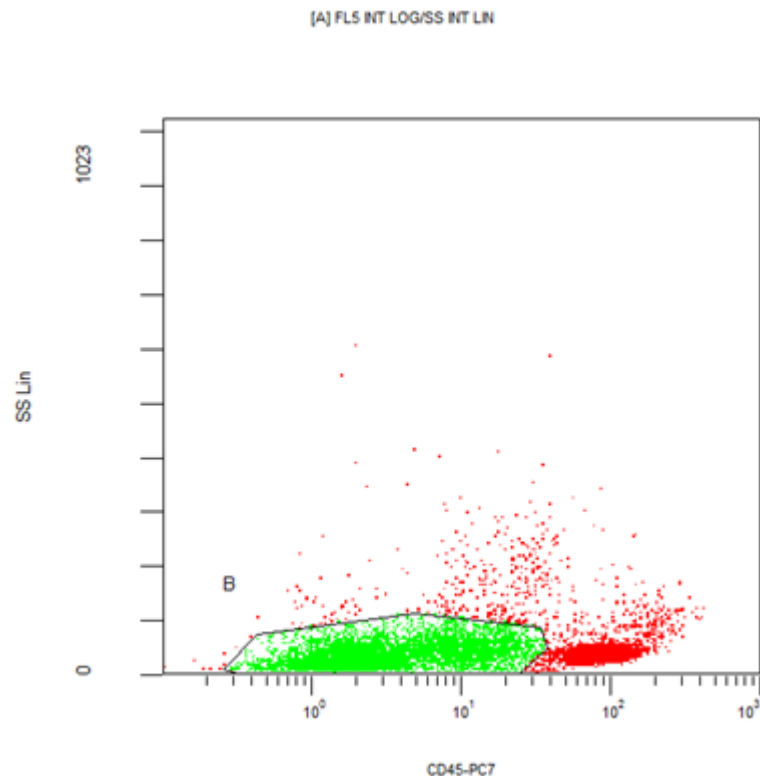


Рисунок 6 – Гейтирование по FSC/SSC и CD45

Проточная цитометрия позволяет определить, как процент клеток, экспрессирующих выявляемый маркер, так и среднюю интенсивность его флуоресценции (СИФ), которая выражается в условных единицах, соответствующих среднему каналу максимального свечения маркера. Показатель СИФ отражает количество экспрессируемых антигенных молекул клетки [27].

2.3 Статистические методы исследования

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы Microsoft Office Excel и STATISTICA 10.

В программе STATISTICA были построены диаграммы размаха для визуального сравнения показателей крови в норме и при ВП ОЛЛ. При этом для оценки достоверности различий между пациентами и контрольной группой (показателями нормы) использовался критерий Манна-Уитни. Результаты считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Основной целью статистического анализа являлась проверка гипотез:

- О встречаемости анемии, тромбоцитопении и лейкоцитоза при ВП- ОЛЛ
- О том, насколько часто встречаются маркеры, указанные в литературе, как характерные для ВП-ОЛЛ.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В исследование были включены 319 детей в возрасте 0-17 лет (медиана 4 года) (160 мальчиков и 159 девочек) с ВП ОЛЛ, диагностированном в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии в период с 2008 по 2014 год (в рамках протокола МБ-ОЛЛ 2008).

Были обработаны показатели ОАК и проведено их сравнение с литературными данными, для получения сведений об общем состоянии пациентов при ОЛЛ. Анализ иммунофенотипических характеристик выполняли методом проточной цитометрии.

Систематизировав и обработав эти данные, для реализации исследования нами были выбраны следующие показатели для ОАК: Hb, WBC, PLT. Для иммунофенотипирования опухолевых клеток, как и писалось в разделе 1.5 брались следующие маркеры: CD45, CD10, cyIgM, cyCD79a, TdT, CD22(cyt), CD34, CD20, CD22. Для оценки aberrантной экспрессии были выбраны следующие маркеры: Т-линии – CD2, CD5, CD1a; миелоидного ряда – CD13, CD33, CD15, CD117.

3.1 Изучение разнонаправленных изменений исследуемых показателей ОАК

Для подтверждения отклонений (анемический синдром, тромбоцитопения, лейкоцитоз) ОАК у пациентов с ВП ОЛЛ, нами были составлены 3 группы, которые показывают разнонаправленные изменения исследуемых показателей:

- 1 группа: исследуемые показатели, которые не выходят за пределы норм референтных интервалов;
- 2 группа: исследуемые показатели выше норм референтных интервалов;
- 3 группа: исследуемые показатели ниже норм референтных интервалов.

При исследовании показателя Hb пациенты были разделены по возрасту, так как пределы норм референтных значений различаются у разных возрастных групп. Первая группа – от 1 до 4 лет (177 человек), вторая группа – 5-13 лет (120 человек), третья группа – от 14 лет (22 человека). В первой группе показатель Hb оказался ниже нормы референтных значений у 164 человек (92,7%), в пределах нормы референтных значений у 13 человек (7,3%).

На диаграмме размаха (рисунок 7) можно увидеть статистически значимое ($p = 0,00$) уменьшение количества Нб. Минимальное значение составило 31 г/л, максимальное – 149 г/л, медиана 84 г/л.

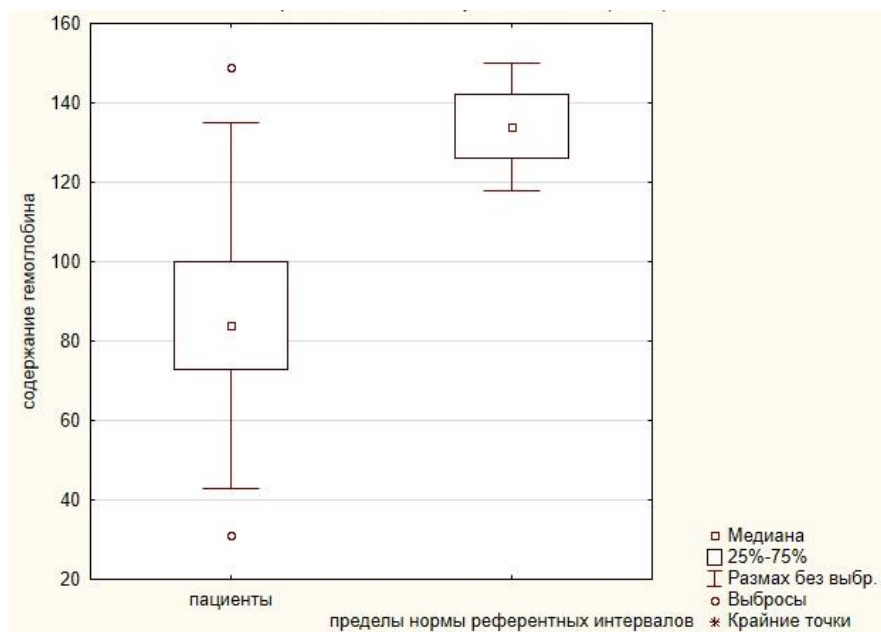


Рисунок 7 – Содержание Нб (г/л) у детей 0-4 года в норме и при ВП ОЛЛ

Во второй группе у 110 человек показатели ниже нормы референтных значений (91,7%), в пределах нормы референтных значений у 10 человек (8,3%).

На диаграмме размаха (рисунок 8) можно увидеть статистически значимое ($p = 0,00$) уменьшение количества Нб. Минимальное значение составило 5 г/л, максимальное – 150 г/л, медиана – 85 г/л.

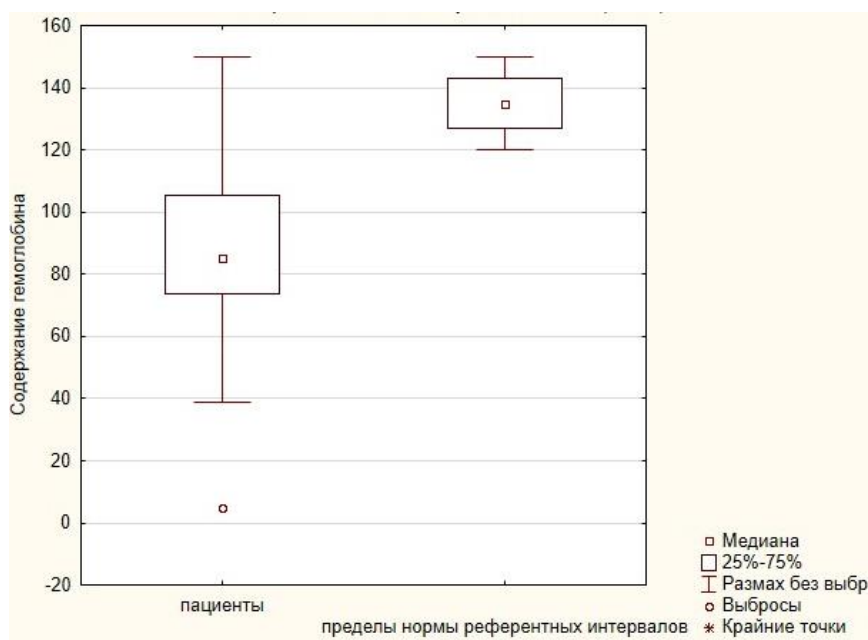


Рисунок 8 – Содержания Нб (г/л) у детей 5-13 лет в норме и при ВП ОЛЛ

В третьей группе было выявлено, что показатель Нб ниже нормы референтных значений у 20 человек (90,9%), и лишь у 2 человек (9,1%) находится в пределах нормы референтных значений.

На диаграмме размаха (рисунок 9) можно увидеть статистически значимое ($p = 0,00$) уменьшение количества Нб. Минимальное значение составило 47 г/л, максимальное – 149 г/л, медиана – 105 г/л.

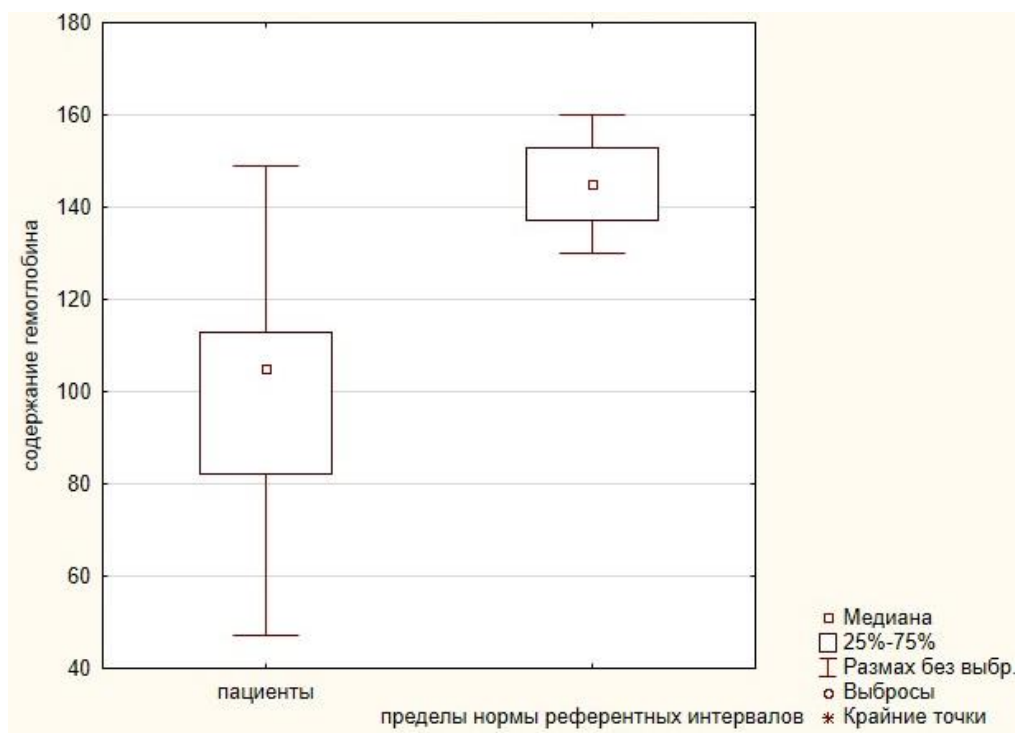


Рисунок 9 – Содержание Нб (г/л) у детей от 14 лет в норме и при ВП ОЛЛ

Проведя анализ относительно показателя Нб (г/л) выявлено: из 319 показателей 25 (7,8%) показателя не выходят за пределы нормы референтных интервалов, 294 (92,2%) показателей ниже норм референтных интервалов (рисунок 10).



Рисунок 10 – Частота встречаемости разнонаправленных изменений Hb (г/л)

Исследование показателя PLT ($\times 10^9$ клеток/л) выявило, что большинство значений находятся ниже пределов нормы референтных интервалов ($n=254$; 79,6%) и лишь несколько ($n=65$; 20,4%) не выходят за пределы нормы референтных интервалов (рисунок 11). Максимальное значение достигает 454×10^9 клеток/л, минимальное равно 0×10^9 клеток/л, медиана составила 59×10^9 клеток/л, $p=0,00$.

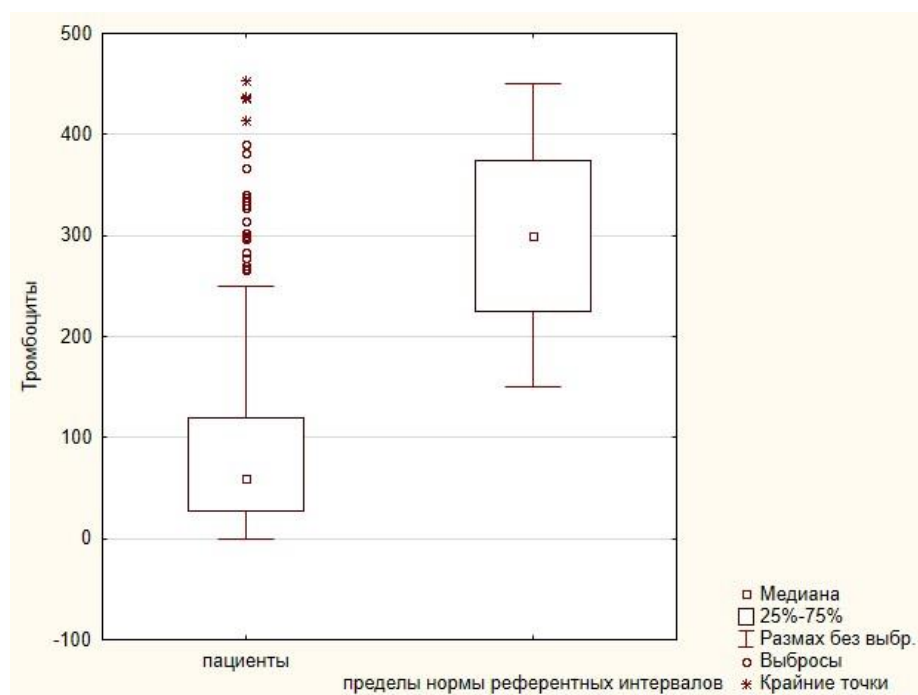


Рисунок 11 – Содержание PLT у детей в норме и при ВП ОЛЛ

Для анализа WBC пациенты были разделены на возрастные группы: 0-5 лет (204 человека), 6-13 лет (93 человека), от 14 лет (22 человека).

В первой группе показатель WBC оказался ниже норм референтных значений у 53 человек (26%), в пределах нормы референтных интервалов у 57 человек (28%), выше нормы референтных интервалов у 94 человек (46%). На диаграмме размаха (рисунок 12) мы можем наблюдать максимальную точку 268×10^9 клеток/л.

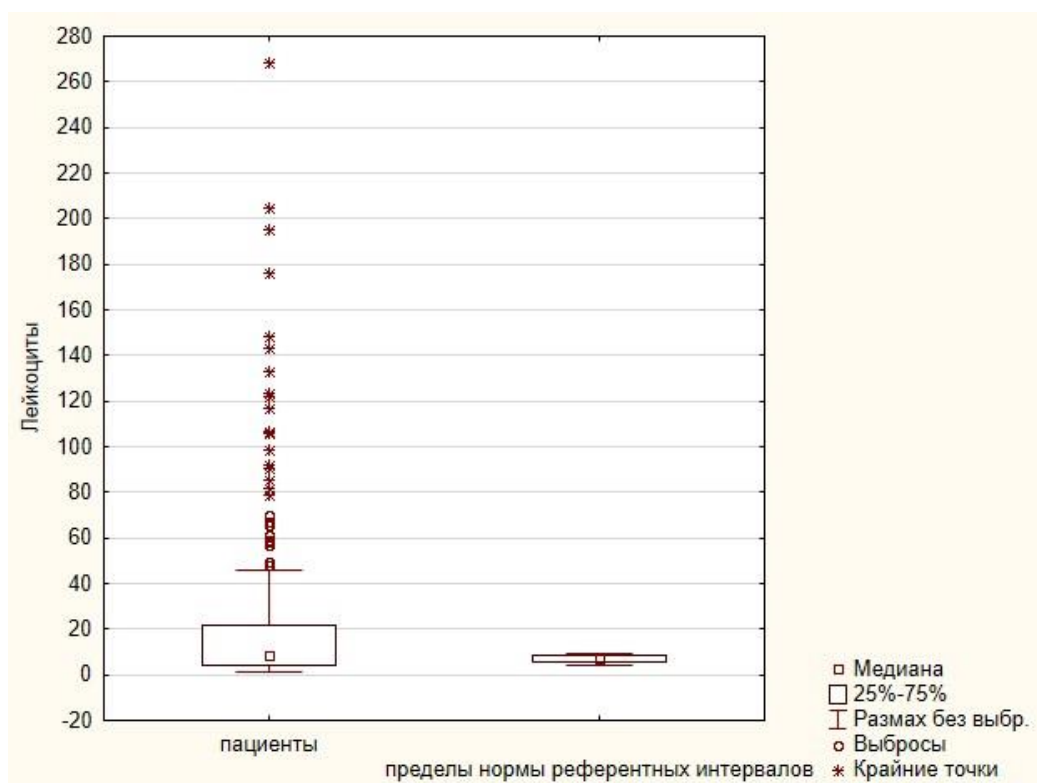


Рисунок 12 – Содержание WBC у детей 0-5 лет в норме и при ВП ОЛЛ

Во второй группе пониженный показатель WBC наблюдался у 23 человек (25%), в пределах нормы референтных интервалов у 25 человек (27%), выше нормы референтных интервалов у 45 человек (48%). На диаграмме размаха (рисунок 13) мы можем заметить, что максимальное значение достигает 377×10^9 клеток/л, что значительно превышает пределы норм, минимальное составляет $0,6 \times 10^9$ клеток/л, медиана- 9×10^9 клеток/л. Различия между пределами норм референтных значений и пациентами статистически значимы ($p=0,02$).

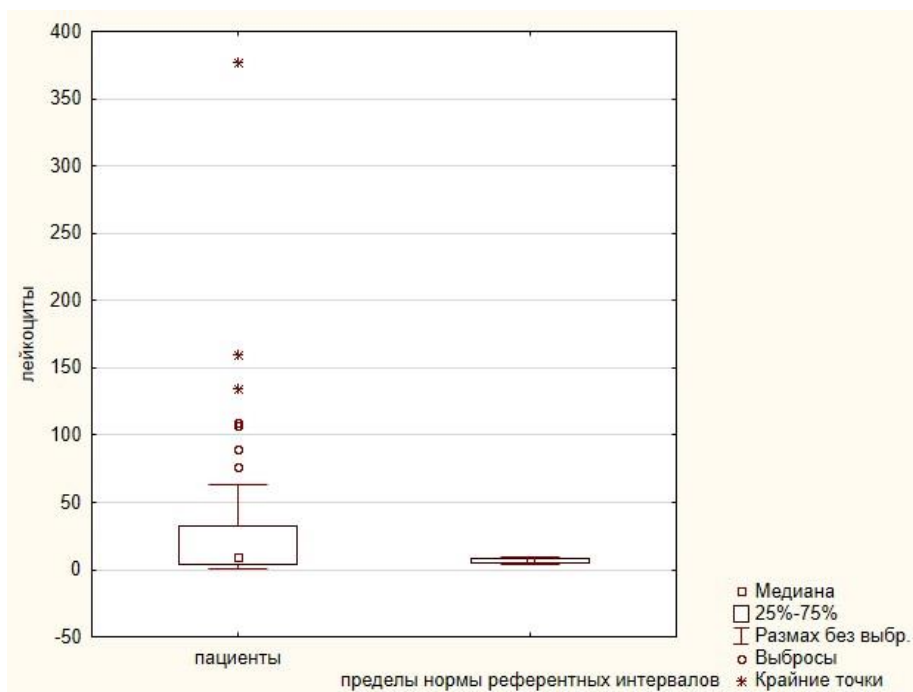


Рисунок 13 – Содержание WBC у детей 6-13 лет в норме и при ВП ОЛЛ

В третьей группе было обнаружено, что показатель WBC ниже норм референтных интервалов у 5 человек (23%), не выходит за пределы норм референтных интервалов у 6 человек (27%), выше норм референтных интервалов у 11 человек (50%) (рисунок 14). (Max – 270, min-1, med - 9,45)

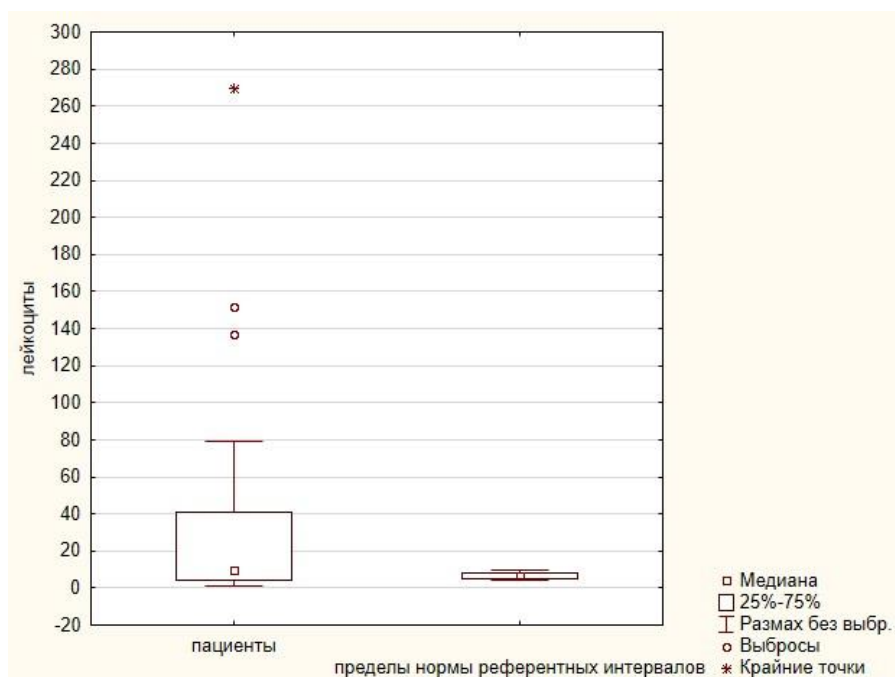


Рисунок 14 – Содержание WBC у детей от 14 лет в норме и при ВП ОЛЛ

Проанализировав показатель WBC ($\times 10^9$ клеток/л) установлено: из 319 показателей ниже норм референтных интервалов у 81 человека (25%), не выходит за пределы норм референтных интервалов у 88 человек (28%), выше норм референтных интервалов у 150 человек (47%) (рисунок 15).



Рисунок 15 – Частота встречаемости разнонаправленных изменений WBC

Таким образом, проанализировав полученные данные по всем трем группам по исследуемым показателям, можно сказать, в основном, что их значение выходит за пределы референтных интервалов. Показатель Hb ниже нормы референтных значений. Также пониженный уровень тромбоцитов и повышенное содержание лейкоцитов, как и говорилось в литературных источниках [16].

3.2 Результаты ИФТ

При анализе собственных данных мы определили, что у пациентов с ОЛЛ 81% случаев приходится на common-B-ОЛЛ, 13% – Пре-B-ОЛЛ и 6% на Про-B-ОЛЛ.

В результате нашей работы было выявлено, что во всех случаях заболевания в той или иной степени выражена aberrantная экспрессия, не свойственная нормальным гемопоэтическим предшественникам. Асинхронная экспрессия дифференцировочных маркеров наблюдалась в большинстве случаев ВП-ОЛЛ (таблица 4А).

Таблица 4 – Особенности экспрессии антигенов при ВП ОЛЛ

Маркер	Про-B ОЛЛ n(%)	Common-B ОЛЛ n(%)	Пре-B ОЛЛ n(%)	ВП ОЛЛ n(%)
А				
CD10 (n=20/257/42/319)				
Негативная экспрессия	20 (100)		2 (4,7)	22 (6,9)
Позитивная экспрессия		257 (100)	40 (95,3)	297 (93,1)
TdT (n=20/212/41/273)				
Негативная экспрессия	4 (30)	6 (2,8)	1 (2,4)	11 (4)
Позитивная экспрессия	16 (70)	206 (97,2)	40 (97,6)	262 (96)
CD20 (n=20/257/41/318)				
Негативная экспрессия	20 (100)	172 (77)	24 (58,5)	216 (67,9)
Позитивная экспрессия		85 (33)	17(41,5)	102 (32,1)
CD34 (n=20/256/41/318)				
Негативная экспрессия	6 (30)	49 (19,1)	13 (30,9)	68 (21,4)
Позитивная экспрессия	14 (70)	207 (80,9)	29 (69,1)	250 (78,6)
CD22 (n=20/255/41/317)				
Негативная экспрессия		12 (4,7)	1 (2,4)	13 (4,1)
Позитивная экспрессия	20 (100)	243 (95,3)	40 (88,6)	303 (95,9)
cyIgM (n=18/207/41/266)				
Негативная экспрессия	18 (100)	207 (100)		222 (84,5)
Позитивная экспрессия			41 (100)	44 (16,5)
CD45 (n=18/254/41/313)	1 (5,6)	105 (41,3)	15 (36,7)	121 (38,7)
CD34/CD20 коэкспрессия	14 (70)	197 (76,7)	29 (69)	240 (75,2)
Б				
CD13 (n=20/252/41/313)				
Позитивная экспрессия	16 (80)	208 (82,5)	40 (97,6)	264 (84,3)
CD15 (n=20/238/42/299)				
Позитивная экспрессия	3 (15,8)	4 (1,7)	13 (31)	20 (6,7)
CD33 (n=20/254/41/315)				
Позитивная экспрессия	5 (15)	29 (11,4)	3 (7,3)	37 (11,7)
CD117 (n=20/252/41/313)				
Позитивная экспрессия	0	3 (1,2)	0	3 (1,2)

В				
CD2 (n=20/254/41/315)				
Позитивная экспрессия	2 (10)	4 (1,6)	0	6 (1,9)
CD5 (n=20/256/41/317)				
Позитивная экспрессия	2	5	1	8 (2,5)
CD1a (n=20/253/40/313)				
Позитивная экспрессия	0	0	0	0 (0)
CD3 (n=20/255/41/319)				
Позитивная экспрессия	0	0	0	0 (0)

Проанализировав таблицу, мы видим, что такой маркер, как CD34, который соответствует более ранним стадиям нормального гемопоэза, экспрессируется в 78,6% случаев ВП-ОЛЛ, причем 80,9% случаев приходится на common-В-ОЛЛ, 61,9% на Пре-В-ОЛЛ. Тогда как в 30% случаев Про-В-ОЛЛ экспрессия этого маркера не отмечена. Похожая ситуация наблюдалась и с маркером TdT, экспрессия которого была не типична для данных стадий дифференцировки. В 30% случаев Про-В-ОЛЛ данный антиген не выявлялся, в то время как у 97,2% случаев common-В-ОЛЛ и 40% Пре-В-ОЛЛ на опухолевых клетках отмечалась экспрессия TdT. Экспрессия маркера CD20, появление которого характерно для более поздней стадии гемопоэза В-лимфоцитов, не наблюдалась при Про-В ОЛЛ, но присутствовала в 85 (33 %) случаях из 257 Common-В ОЛЛ, тогда как у 17 (41,5 %) пациентов из 41 с Пре-В ОЛЛ экспрессия данного маркера была отрицательной. У 240 (75,2 %) из 319 детей выявлена одномоментная коэкспрессия маркеров разных стадий дифференцировки CD34+/CD20+, причем данная абберрация чаще встречалась при Common-В подтипе ОЛЛ (76,7 %), в 70 % случаев Пре-В ОЛЛ и в 69 % Пре-В ОЛЛ соответственно. Так же была оценена экспрессия CD34+/CD22++ (68,3%), CD10++/CD20++ (75,5%) и CD22++/CD20- (54,9%) (рисунок 16) [21, 31].

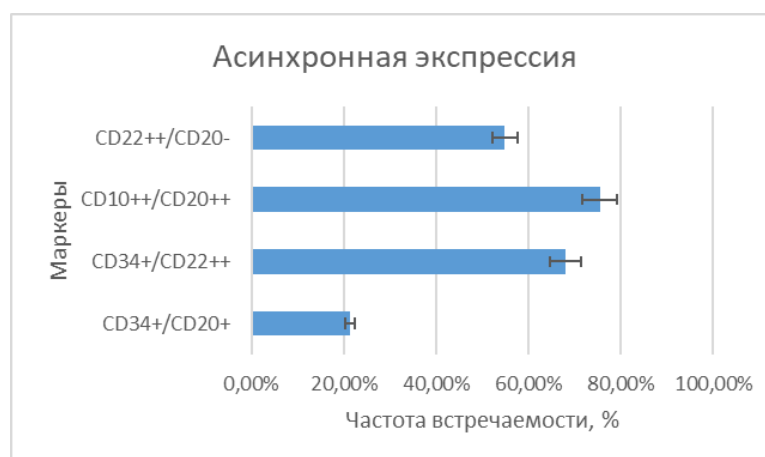


Рисунок 16 – Частота встречаемости коэкспрессии маркеров разных стадий дифференцировки.

Примечание: CD⁻ – 0-19%; CD⁺ – 20-60%; CD⁺⁺ – 60-100%

Отсутствие экспрессии антигена CD45 было выявлено у 121 (75,2 %) из 313 пациентов. Однако почти во всех случаях Про-В ОЛЛ экспрессия данного маркера была позитивной, за исключением 1 человека (5,6%). CD 10, характерный для common-B ОЛЛ, встречался и в Пре-В-ОЛЛ в 40 случаях (95,3%), в общей сложности позитивная экспрессия составила 93,1% (рисунок 17).

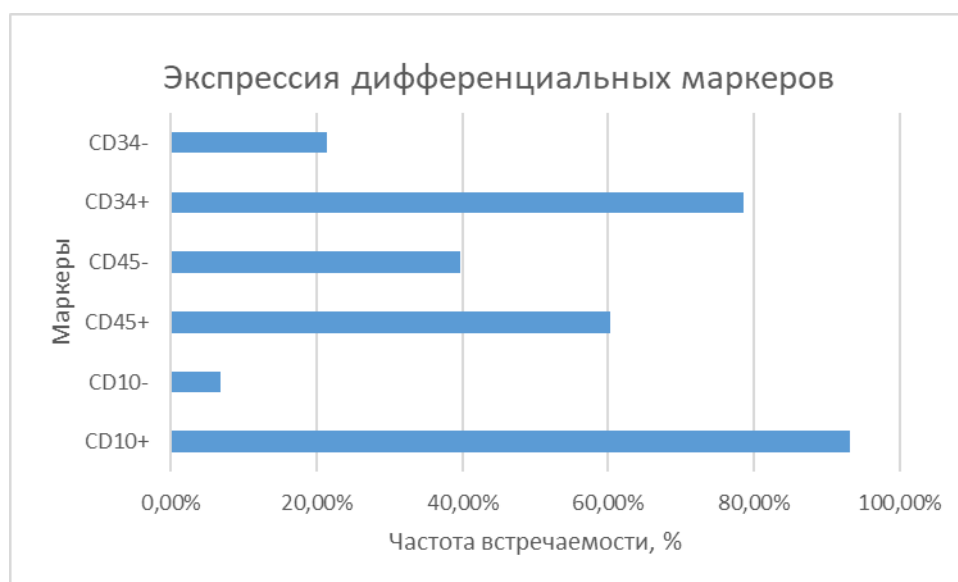


Рисунок 17 – Частота встречаемости экспрессии антигенов CD45 и CD10

Коэкспрессия миелоидных маркеров на поверхности опухолевых клеток была часто встречаемой аберрацией у пациентов с ВП ОЛЛ (табл. 2Б). Было установлено, что на лейкоэмических лимфобластах с различной частотой и интенсивностью экспрессируются такие миелоидные антигены, как CD13, CD117, CD15 и CD33. Наиболее часто, у 264 (84,3 %) из 313 пациентов, среди миелоидной коэкспрессии встречалась аберрантная экспрессия маркера CD13. С меньшей частотой была отмечена коэкспрессия маркеров CD33, CD15, CD117, что составляло 11,7 %; 6,7 % и 1,2 % случаев соответственно (рисунок 18).

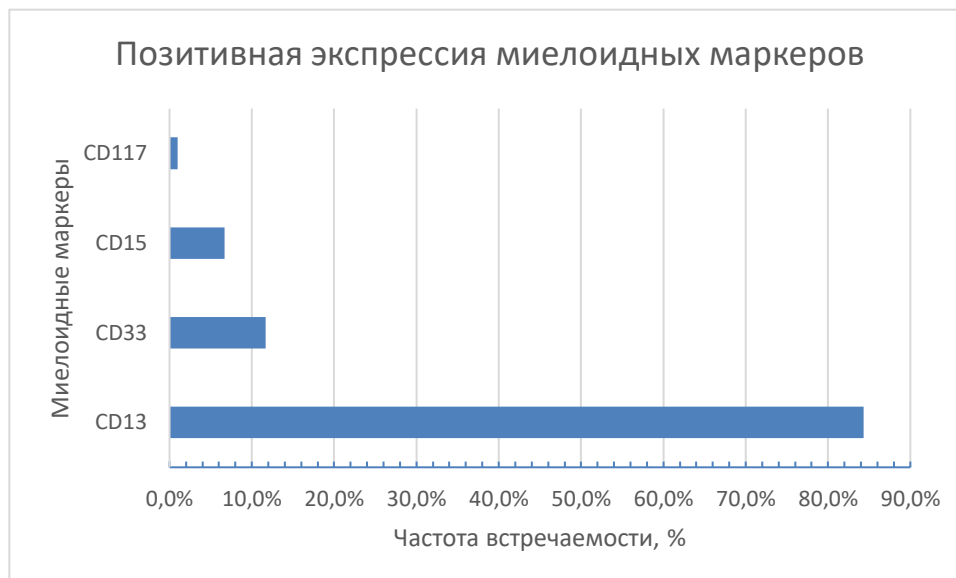


Рисунок 18 – Частота встречаемости коэкспрессии миелоидных маркеров у детей с ВП-ОЛЛ

Экспрессия Т-линейных маркеров на лейкемических клетках ВП ОЛЛ наблюдалась в редких случаях (табл. 2В). Так, коэкспрессия антигена CD2 была выявлена в 1,9 %, CD5 – в 2,5 %. Не встречалась экспрессия таких маркеров, как CD1a и CD3 (рисунок 19).

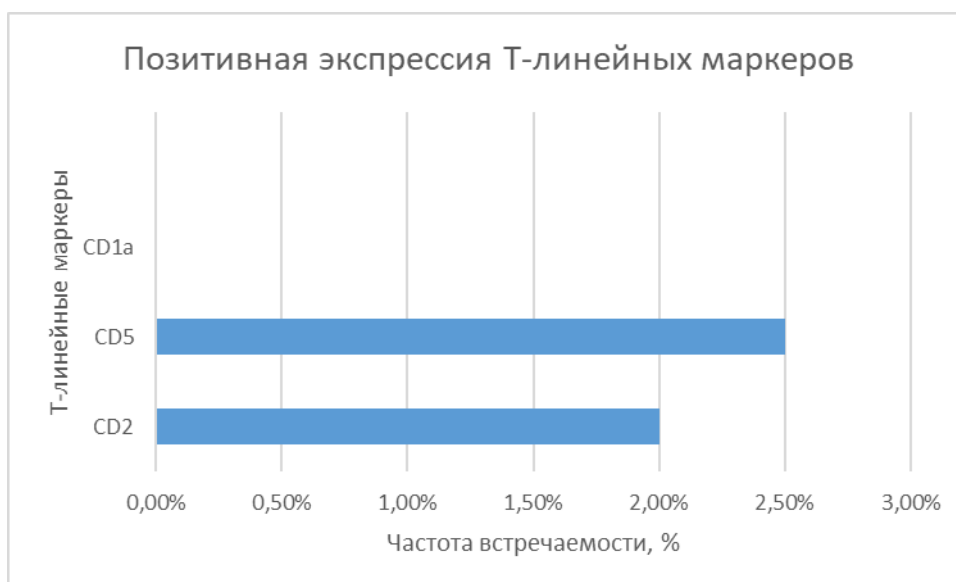


Рисунок 19 – Частота встречаемости коэкспрессии Т-линейных маркеров у детей с ВП-ОЛЛ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных были сформулированы следующие заключения:

1. Установлено, что у пациентов с ВП ОЛЛ во всех возрастных группах отмечается достоверное снижение уровня гемоглобина и тромбоцитов, а также увеличение лейкоцитов по сравнению с группой контроля.
2. Установлено, что опухолевые клетки при ВП-ОЛЛ имеют многочисленные иммунофенотипические aberrации по сравнению с их нормальными гемопоэтическими аналогами. На опухолевых клетках с различной частотой и интенсивностью экспрессируются такие миелоидные антигены, как CD13, CD117, CD15 и CD33. Преимущественно встречается экспрессия антигена CD13 (84,3 %). Реже встречалась коэкспрессия таких маркеров, как CD33 (11,7%), CD15 (6,7%), CD117 (1,2%). Экспрессия Т-линейных маркеров на лейкемических клетках ВП ОЛЛ наблюдалась в редких случаях, например, CD2 выявлен в 1,9 %, CD5 – в 2,5 %, а CD1a и CD3 не встречались. Экспрессия антигена CD34 который соответствует более ранним стадиям дифференцировки, встречается в 78,6% случаев ВП ОЛЛ, причем 80,9% случаев приходится на common-B-ОЛЛ, 61,9% на Пре-B-ОЛЛ. Отсутствие экспрессии антигена CD45 было выявлено у 75,2% пациентов. Однако почти во всех случаях Про-B-ОЛЛ экспрессия данного маркера была позитивной. В большинстве случаев ВП ОЛЛ наблюдаются разные варианты асинхронной экспрессии дифференцировочных маркеров: CD34+/CD20+ (75,6%), CD34+/CD22++ (68,3%), CD10++/CD20++ (75,5%) и CD22++/CD20- (54,9%).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Белевцев М.В. Патогенетическое и прогностическое значение факторов неспецифического гуморального иммунитета при остром лимфобластном лейкозе у детей / М.В. Белявцев [и др.]. // Актуальные вопросы детской онкологии и гематологии. – Минск. –2002. – С. 146-147.
2. Биопсия костного мозга. [Электронный ресурс]. – Электрон. текстовые дан. –Medycyna Praktyczna, 2018 – Режим доступа: <https://empendium.com/ru/chapter/B33.IV.24.22/>, свободный.
3. Владимирская, Е.Б. Нормальное кроветворение и его регуляция / Е.Б. Владимирская // Клин. онкогематология. – 2015. - № 8. – С. 109-119.
4. Волкова, М.А. Клиническая онкогематология: Руководство для врачей / М.А. Волкова. – М.: Медицина, 2001. – 516 с.
5. Воробьев, И.А. Иммунофенотипирование опухолей системы крови и лимфоидных опухолей / И.А. Воробьев [и др.]. // Гематология и трансфузиология –2005. –№3. – С. 8-14.
6. Генетика и апоптоз гемобластозов [Электронный ресурс]. – Электрон. текстовые дан. –Medbe.Ru, 2018 – Режим доступа: <http://medbe.ru/materials/leykemiya-i-leykozy-belokrovie/genetika-i-apoptoz-gemoblastozov/>, свободный.
7. Дроздова, М.В. Заболевания крови. Полный справочник /М.В. Дроздова, А.А Дроздов. – М.: Эксмо, 2008. — 151с.
8. Европейский онкологический журнал: сб. науч. ст. / УП «Профессиональные издания», 2016. – №4. – С. 736-764
9. Егоренков, В.В. Правила забора материала для морфологического исследования / В.В. Егоренков [и др.]. // Практическая онкология. – 2017. – №4. – С. 336-342.
10. Здоровье населения Республики Беларусь: стат. сб. / Национальный статистический комитет РБ; под ред. В.И.Зеновского. – Минск, 2014. – 39 с.
11. Зотова, В.В. Иммунологические и цитогенетические критерии диагностики MRD при остром лимфобластном лейкозе у детей / В.В. Зотова [и др.]. // Онкоиммунология. – 2011. – №4. – С.455-467
12. Зуева, Е.Е. Иммунофенотипирование в диагностике острых лейкозов (лекция) / Е.Е. Зуева [и др.]. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. – № 7. – С. 25-32.
13. Зуховицкая, Е.В. Острые лимфобластные лейкозы / Е.В. Зуховицкая [и др.]. // Журнал ГГМУ.– 2015. – №3. – С.12-17
14. Иммунологические маркеры, наиболее часто используемые в дифференциальной диагностике лейкозов [Электронный ресурс]. – Электрон.

текстовые дан. –Studwood.ru, 2018 – Режим доступа: https://studwood.ru/1576778/meditsina/immunologicheskie_markery_nai-bolee_chasto_ispolzuemye_differentsialnoy_diagnostike_leukozov, свободный.

15. Клеточная смерть. Апоптоз. [Электронный ресурс]. – Электрон. текстовые дан. – Dommedika.com, 2018 – Режим доступа: <https://dommedika.com/oncology/37.html>, свободный.

16. Кулешова, Е.В. Первичная диагностика острого лимфобластного лейкоза / Е.В. Кулешова [и др.]. // Смоленский медицинский альманах. – 2017. – №4. – С. 1-10.

17. Литвицкий, П.Ф. Врожденный иммунитет: механизмы реализации и патологические синдромы (лекция) / П.Ф. Литвицкий [и др.]. // Вопросы современной педиатрии. – 2009. – №4. – С. 95-101.

18. Луговская, С.А. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов / С.А. Луговская, М.Е. Почтарь, Н.Н. Тупицын – М., Тверь: Триада, 2005. – 168 с.

19. Лыжко, Н.А. Молекулярно-генетические механизмы инициации, промоции и прогрессии опухолей / Н.А. Лыжко. // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – №4. – С. 7-17.

20. Масчан, М.А. Острый лимфобластный лейкоз у детей / М.А. Масчан [и др.]. // Онкогематология. – 2014. – №2. – С. 50-61.

21. Мовчан, Л.В. Лейкоз ассоциированный иммунофенотип опухолевых клеток у детей с острым лимфобластным лейкозом из предшественников В-лимфоцитов / Л.В. Мовчан // Онкогематология. – 2012. – С. 22-28.

22. Общий анализ крови: кратко о главном. [Электронный ресурс]. – Электрон. текстовые дан. –Лаборатория «Synevo», 2018 – Режим доступа: <https://www.synevo.by/ru/patients/articles/879-complete-blood-count/>, свободный.

23. Подготовка пациента к процедуре сдачи крови. [Электронный ресурс]. – Электрон. текстовые дан. –Invitro.ru, 2018 – Режим доступа: <https://www.invitro.ru/for-clients/mat/1147/>, свободный.

24. Руководство по гематологии / М.Г. Абрамов [и др.], под ред. проф. П.А. Воробьева. – 3-е изд., перераб. И доп. М.: Ньюдиамед, 2002. – 106-191 с.

25. Рыбакина, Е.Г. Интерлейкин-1 в молекулярных механизмах нейроиммунных взаимодействий: автореф. дис. док. био. наук: 14.00.16 / Е.Г. Рыбакина; НИИ экспериментальной медицины РАМН. – Санкт-Петербург, 2001. – 219 с.

26. Сметанникова, Н.А. Роль полиморфных вариантов генов p53, CCR5, XRCC1 и XPD в патогенезе острого лимфобластного лейкоза у детей:

автореф. дис. канд. мед. наук: 14.03.03 / Н.А. Сметанникова; ГНЦ ВБ. – Томск, 2011. – 23 с.

27. Современные методы диагностики острых лейкозов у детей и взрослых: методические рекомендации: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 26.12.2000. – Минск: РНПЦДОГ, 2001. – 53 с.

28. Телетаева Г.М. Цитокины и противоопухолевый иммунитет / Г.М. Телетаева // Практическая онкология. – 2010–№ 4–С. 211-218.

29. Фиясь, А.Т. Основы клинической гематологии / А.Т. Фиясь, И.Р. Ерш. – Минск: Выш. шк., 2013. – 271с.

30. Abd Alla Abd Eladeem Hameeda. The role of kappa and lambda in subclassifications of B-cell lymphoblastic leukemia in Sudanese patients using flow cytometry / Abd Alla Abd Eladeem Hameeda [et al.]. // Open journal of blood diseases. – 2016. – Vol.6. – P. 44-52.

31. Francesco Manelli. Immunophenotyping of acute leukemias – from biology to clinical application / Francesco Manelli. // Flowcytometry – select topics. – 2016. – P. 115-129.

32. Introduction to Flow Cytometric Analysis [Электронный ресурс]. – Электрон. текстовые дан. –DeNovo Software, 2018 – Режим доступа: <http://wiki.clinicalflow.com/introduction-flow-cytometric-analysis>, свободный.

33. Ismael Samudio. Apoptosis in leukemias: regulating and therapeutic targeting / Ismael Samudio [et al.]. // Cancer treatment and research. –2013.– Vol 45. –P. 1-21.

34. Luciana Cavalleiro Marti. Lymphoid Hematopoiesis and Lymphocytes Differentiation and Maturation / Luciana Cavalleiro Marti [et al] // Lymphocyte Updates - cancer, autoimmunity and infection. – 2017. – P. 1-17.

35. Madhumita Jagannathan-Bogdan. Hematopoiesis / Madhumita Jagannathan-Bogdan, Leonard I. Zon // Article. – 2013. – June.

36. Michael A. Rieger, Timm Schroeder. Hematopoiesis // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. – 2012.-P. 1-17.

37. Nahla A Nosair. FAS (CD 95) expression as a prognostic marker in acute leukemia and blastic transformation phase in chronic myeloid leukemia / Nahla A Nosair [et al.]. // Egyptian journal of hematology. – 2014. –Vol. 39. – P 25-31.

38. Outside US Flow Cytometry Catalog / Beckman Coulter, Inc. – USA, 2017. – 260 с.

39. René Marke. The many faces of IKZF1 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia / René Marke [et al.] // Hematologica. – 2018. – Vol. 103. – P. 565-574.

40. Thomas Szczepanski. Flow-cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes / Thomas Szczepanski [et al.] // Clinical chemistry and laboratory Medicine. – 2006. – Vol. 44/ – P. 776-796.