

конкретные результаты анализа на несколько дней вперед, дают возможность использовать лине́йное или экспоненциальное приближение, вводить различные фильтры, повышающие достоверность предсказания.

Сопоставление предсказанных величин с величинами, реально получаемыми в лаборатории, позволяет оценить сдвиги, происходящие у больного, эффективность проводимой терапии.

Предлагаемый метод обработки лабораторных данных при оценке течения эндотоксикоза позволяет составить представление об основных тенденциях изменения состояния пациента. Анализ результатов у больных с клиническим улучшением и благоприятным исходом и у больных с летальным исходом, показали достаточно высокую эффективность подобного подхода к лабораторной оценке течения эндотоксикоза и хорошую корреляцию с клинической картиной.

Использование компьютерного прогнозирования при лабораторной оценке течения эндотоксикоза в ряде случаев позволило отказаться или ограничить применение дорогостоящих методов детоксикации, а в ряде случаев, напротив искать более эффективные методы коррекции состояния больного.

**Т.Ю.Азовская, Л.Г.Фечина, С.В.Сазонов**

## **АЛГОРИТМ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ**

Областная детская клиническая больница, г.Екатеринбург

Лечение пациентов с острыми лейкозами по современным программам проводится на основании определения линейной принадлежности и степени дифференцировки злокачественных бластных клеток. Применение метода прямой иммунофлюоресценции с использованием двойного окрашивания с первичномеченными моноклональными антителами (МКА) в проточной цитометрии позволяет дать более полную антигенную характеристику клетки и выявить гетерогенность лейкозного клона клеток по степени их иммунологической дифференцировки, что имеет большое практическое значение для выбора тактики лечения, оценки прогноза заболевания и отбора пациентов для алло- и аутотрансплантации.

В настоящее время перечень МКА, применяемый для диагностики острых лейкозов (ОЛ) продолжает увеличиваться и включает в себя уже более 160 наименований.

В конце 90-х группой иммунологов, представляющих ведущие иммунологические лаборатории был разработан протокол иммунофенотипирования гематопозитических злокачественных заболеваний, что позволило сформировать основные критерии диагностики /4,5/.

В предыдущих публикациях нами описаны частота и интенсивность экспрессии антигенов при различных вариантах острых лейкозов у детей, а также значение иммунологических типов ОЛ для выбора терапии и прогноза заболевания /1, 2, 3/.

Цель данного исследования - определить перечень МКА необходимых и достаточных для иммунологической диагностики острых лейкозов. На основании выбранных МКА отработать алгоритм иммунодиагностики ОЛ, что позволит уменьшить количество применяемых МКА без снижения качества иммунофенотипирования.

За период с 1993 г. по 2000 г. в лаборатории иммунофенотипирования опухолей было обследовано 238 детей Уральского региона с острым лейкозом, диагностированным впервые. Из них 195 детям на основании цитологического и цитохимического исследований поставлен диагноз - острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ); 41 пациенту - острый миелобластный лейкоз (ОМЛ); у 2 детей не определен вариант ОЛ на основании ФАБ-классификации. Для исследования использовали пунктат костного мозга. Применяемая панель моноклональных антител представлена для 26 антигенов (фирма Becton Dickinson, USA). Анализ результатов проведен на проточном цитометре FACScan в программах LYSYS 2 и PAIN-A-GATE Plus.

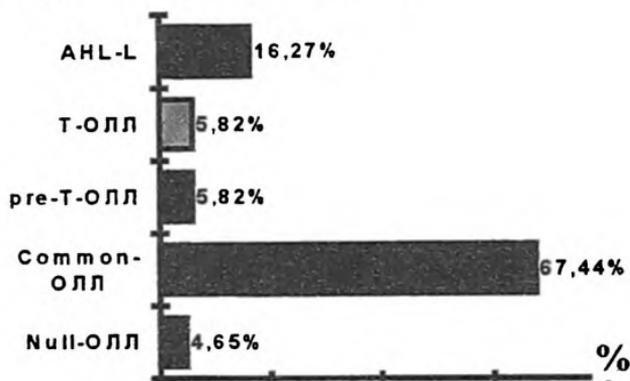
Таблица 1  
Моноклональные антитела, применяемые при иммунологической диагностике острого лейкоза

Общий лейкоцитарный антиген CD45			
Лимфоидные антигены		Мономиелоцитарные антигены	Активационные антигены
T-линейные	B-линейные		
CD2	CD19	CD11b	CD38
CD3cyt/s	CD20	CD13	HLA-DR
CD4	CD22	CD14	
CD5	CD10	CD15	Антиген стволовой клетки
CD7	Kappa	CD33	
CD8	Lambda	CD42a	CD34
-	IgM	CD61	-
-	CD79 cyt	CD71	-

Процесс иммунофенотипирования ОЛ был разделен на несколько этапов:

#### Первый этап.

Цель первого этапа диагностики - определение линейной принадлежности исследуемых лейкозных клеток. Для этого было необходимо выбрать антигены отвечающие следующим требованиям: специфичность для определенной линии клеток и редкая коэкспрессия на клетках другой линейной принадлежности.



**Рис. Фенотип лимфобластных острых лейкозов.**

Примечание: по горизонтали - частота встречаемости в %, по вертикали - иммунологические варианты ОЛЛ.

Острые лимфобластные лейкозы с различными В-линейными иммунофенотипами преобладали в структуре острого лейкоза детского возраста (Рисунок). При этом в 100% случаев отмечали экспрессию на лимфобластах антигенов CD19 и CD22 со стабильно высокими показателями ( $88,29 \pm 1,2\%$  и  $85,29 \pm 1,6\%$  клеток соответственно). Не смотря на специфичность наличия CD19 антигена на клетках В-линии, отмечена его экспрессия на клетках у 35,3% пациентов с ОМЛ. Экспрессия антигена CD22 на лимфобластах была характерна только для иммунологических вариантов В-линейных ОЛЛ, поэтому использование данного МКА позволяет дифференцировать В-линейные варианты ОЛЛ.

Диагностически значения экспрессии CD10 антигена на лимфобластах определяли в 89,53 % случаев ОЛЛ. Помимо специфичности антигена CD10 при Common-ОЛЛ, отмечали его присутствие на лимфобластах у всех пациентов с pre-T-ОЛЛ.

Среди Т-линейных антигенов предпочтение отдано CD7, так как его экспрессию со стабильно высокими показателями наблюдали при всех иммунологических вариантах Т-линейных ОЛЛ.

Присутствие при ОМЛ положительной реакции бластов с МКА CD33 и CD13, распознающих антигены миелоидной линии, затруднило выбор между ними, но при Common- ОЛЛ определяли на лимфобластах чаще коэкспрессию антигена CD13, чем антигена CD33 (20,68 % и 3,44 % соответственно). Поэтому для определения линейной принадлежности бластов на первом этапе диагностики целесообразнее использовать МКА CD33.

Таким образом, для первого этапа иммунологической диагностики острых лейкозов необходимы МКА следующих антигенов: LeucoGATE (CD45/CD14); CD10; CD22; CD7; CD33 (табл. 2).

Таблица 2

**Этапы алгоритма иммунологической диагностики острого лейкоза**

Этап	Моноклональные антитела
I	LeucoGATE (CD45/CD14); CD10; CD22; CD7; CD33
II	для В-линейных ОЛЛ и ОМЛ: CD19/CD79 сyt, CD13/МРО, CD34; TdT
	для Т-линейных ОЛЛ: CD4; CD8; TdT; мембранный/ цитоплазматический CD3
III	для В-линейных ОЛЛ: мембранные/цитоплазматические Каппа; Lambda; IgM
	для миелоидных (M6 и M7): CD71 (гликофорин А), CD61 для M3: HLA-DR

**Второй этап.**

Цели второго этапа иммунодиагностики острых лейкозов:

- определить блок дифференцировки клеток лейкозного клона;
- выделение гибридных форм острых лейкозов.

**Пример 1.** Диагноз при поступлении "Острый лейкоз". При цитологическом и цитохимическом исследовании пунктата костного мозга: бластных клеток - 98%, РОХ - отрицательно, PAS - диффузный в 35% бластов, L1-L2. При проведении первого этапа диагностики: CD45 - 89%; CD22 - 98%. CD14, CD10, CD7, CD33 <1. На втором этапе получены результаты: CD34 - 66,9%; CD19 - 68,4%; CD13 - 18,3%; CD79 сyt - 92,7%. Заключение иммунофенотипирования ОЛ: **pre-pre-B-ALL**

**Пример 2.** Диагноз при поступлении "Острый лейкоз". Цитологически: L1/M0, тотальное поражение бластными клетками костного мозга. Цитохимия: отрицательный результаты. На первом этапе иммунодиагностики: CD45- 98,5%; CD33- 79,2%; CD10 - 34,2%; CD22 - 89,1%; CD14, CD7<1. Результаты второго этапа: CD34 - 82,4%; CD13 -

87,1%. CD79 сyt - 95,5%; TdT - 79,1%. Заключение: ANL-L (Common - ALL с коэкспрессией CD13 и CD33)

Третий этап необходим для дифференцировки пре-B- и В-клеточного иммунологических вариантов ОЛЛ, а также М6 и М7 морфологических вариантов ОМЛ. Наличие цитоплазматических Карра и/или Lambda-цепей IgM и/или IgM характерно для пре-B-ОЛЛ, а мембранных Карра и/или Lambda- цепей IgM и/или IgM - для В-ОЛЛ. Специфическим маркером для ОМЛ М6 является антиген CD71, для ОМЛ М7- антиген CD61.

Использование алгоритма позволяет сократить количество МКА от 26 до 10, что дает значительный экономический эффект.

Для каждого этапа иммунологической диагностики острых лейкозов необходимо 1 - 1,5 часа, что укладывается в сроки, при которых сохраняется жизнеспособность клеток.

На основании полученных результатов определены МКА, необходимые для диагностики следующих вариантов ОЛ (Таблица 3).

Таблица 3

#### Иммунофенотип острых лейкозов

Варианты ОЛ	Иммунофенотип
pre-pre-B-ОЛЛ	CD19, CD79 сyt, CD34, CD22, TdT
Common -ОЛЛ	CD19, CD79 сyt, CD34, CD22, TdT, CD10 возможно наличие одного из миелоидных антигенов (CD13, CD33)
pre-B-ОЛЛ	CD19, CD79 сyt, CD22, TdT, CD10, цитоплазматические Карра/Lambda или IgM возможно наличие одного из миелоидных антигенов (CD13, CD33)
В-ОЛЛ	CD19, CD79 сyt, CD22, мембранные Карра/Lambda или IgM
pre-T-ОЛЛ	CD3 цитоплазматический, CD7, TdT, CD10, возможно CD4/CD8, CD5, CD2, CD34
T-ОЛЛ	CD3 мембранный, CD7, возможно CD4/CD8, CD5, CD2
ОМЛ	CD13, CD33. В зависимости от вариантов CD14, CD15, CD34, HLA-DR, CD61, CD71, коэкспрессия CD7/CD19/CD22

Таким образом, при использовании алгоритма иммунологической диагностики острых лейкозов соблюдается последовательность и этапность иммунодиагностики, уменьшается количество используемых моноклональных антител без снижения качества диагностики, что обеспечивает доступность данного исследования для аналогичных лабораторий.

## ЛИТЕРАУРА

1. Азовская Т.Ю., Фечина Л.Г., Сазонов С.В. Частота экспрессии антигенов при острых лимфобластных лейкозах у детей // Вестник Уральской государственной академии, 1997. - № 3. - с. 63-65.
2. Азовская Т.Ю. Связь коэкспрессии антигенов с частотой рецидивов у детей с острым лимфобластным лейкозом. Вестник Уральской государственной академии, 1997. - № 3. - с. 85-87.
3. Azovskaia T.J., Markova T.P., Khaitov R.M. Immunological investigation of acute lymphoblastic and myeloblastic leukemia variantes. Abstracts of 13th European Immunology Meeting. - Amsterdam, 1997. - p. 452.
4. Adorf D., Barlage S., Gramatzki M. et al. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies // *Leukemia*. 1996. V.10. P.877-895.
5. Ludwig W.D., Raghavachar A., Thiel E. Immunophenotypic classification of acute lymphoblastic leukaemia // *Bailliere's J. Haematol*. 1994. V. 7. P. 235-262.

**Г.В. Коршунов, Д.М. Пучиньян, А.Г. Коршунов**

### **ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ГЕМОСТАЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ**

**Саратовский НИИ травматологии и ортопедии**

В последние 15-20 лет травма во всем индустриальном мире приобрела черты эпидемии. Высокая частота тромбоэмболических осложнений при травмах и тяжелых ортопедических операциях (30-50%) даже в условиях современной антикоагулянтной терапии не сопровождается заметной тенденцией к ее уменьшению.

Существуют три основные причины, ведущие к тромбообразованию: повреждение сосудистой стенки, повышенная склонность крови к свертыванию (тромбофилия) и гемодинамические нарушения. Эти патогенетические механизмы участвуют во всех случаях образования тромба и не зависят от этиологического фактора, инициирующего развитие гемокоагуляционных осложнений. Изменения в системе гемостаза при травме и ортопедических операциях носят универсальный характер и при адекватном реагировании системы зависят от активности процессов воспаления и репарации раны. При срыве компенсаторно-адаптивных гемокоагуляционных механизмов запускается патологическое микросвертывание крови, которое клинически и лабораторно сложно диагностируется. Раннее обнаружение нарушений в системе