

# Современные методы лабораторной диагностики онкогематологических заболеваний

## Подведение итогов работы референтной лаборатории

**В** последние годы в Украине достигнуты определенные успехи в лечении больных с некоторыми формами онкогематологических заболеваний. В значительной степени этому способствовали повышение качества диагностики, использование наряду с цитоморфологическими и энзимохимическими исследованиями современных методов иммунофенотипирования и молекулярно-генетического анализа. С этой целью на базе отдела иммуноцитохимии и онкогематологии Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины (ИЭПОР) функционирует референтная лаборатория. По масштабу и уровню проведения диагностических исследований эта лаборатория не имеет аналогов не только в нашей стране, но и в независимых государствах, образовавшихся после распада СССР. Результаты научных исследований лаборатории признаны за пределами Украины и даже повлияли на современную классификацию онкогематологических заболеваний.



Д. Ф. Глузман

Итоги работы лаборатории за последние несколько лет в интервью с нашим корреспондентом подвела ее заведующий, доктор медицинских наук, профессор Даниил Фишелевич Глузман.

**Расскажите, пожалуйста, о масштабах деятельности лаборатории. Из каких медицинских учреждений Вы получаете образцы на анализ?**

— В настоящее время мы обобщили данные, полученные на базе отдела в 2011–2013 гг. на основании обследования 5581 больного, поступившего на лечение в медицинские учреждения г. Киева, АР Крым и разных областей Украины. У этих пациентов были выявлены различные формы гемобластозов в соответствии с последней классификацией ВОЗ (2008) и Международной классификацией онкологических заболеваний 4-го пересмотра (ICD-O-4).

В 2011 г. нами были обследованы 1644, а в 2012 г. — 1939 больных, составивших соответственно 21,0 и 24,5% от общего количества всех лиц с впервые выявленными опухолями кроветворной и лимфоидной тканей, которые зарегистрированы в Национальном канцер-регистре Украины. В 2013 г. диагностические исследования были выполнены у 1998 пациентов.

Объектом нашего исследования служили мазки периферической крови и пунктата костного мозга, а также пунктата лимфатических узлов, центрифужные препараты клеток, выделенных на градиенте плотности фикокол-урографина. Препараты для анализа направлялись в нашу лабораторию из гематологических отделений 9-й клинической больницы, Главного военного клинического госпиталя Министерства обороны Украины, клинической больницы «Феофания», расположенных в г. Киеве. Кроме того, мы получали образцы из онкологических диспансеров Киевской, Черкасской, Черниговской областей и АР Крым, а также гематологических отделений ряда городских и областных больниц. Диагностический процесс основывался на применении классических цитоморфологических методов исследования мазков крови и костного мозга, окрашенных по Романовскому-Гимзе (Паппенгейму).

**Какие диагностические методы использовались?**

— Нами проводилось комплексное исследование с применением цитохимических методов (определение активности миелопероксидазы, хлорацетатэстеразы, кислой фосфатазы, кислой неспецифической эстеразы, PAS-реакция), обязательных при дифференциации острых лейкозов миелоидного и лимфоидного происхождения. Также они использовались для верификации других форм онкогематологических заболеваний (миелодиспластических синдромов, хронического миелолейкоза, волосатоклеточного лейкоза, Т-клеточных лимфолифферативных заболеваний, опухолей, возникающих из клеток, которые относятся к системе мононуклеарных фагоцитов).

В диагностике опухолей лимфоидной ткани и некоторых форм миелоидных новообразований применяются усовершенствованные нами иммуноферментные методы (АРААР, LSAB-АР), позволяющие при обычной светооптической микроскопии изучать спектр антигенов поверхностных мембран и цитоплазмы клеток непосредственно в мазках периферической крови и костного мозга. Преимуществом подобного подхода в сравнении с иммунофлуоресцентным методом является возможность идентификации цитоморфологических признаков патологических клеток, которые изучаются при условии их низкого содержания (не более 5–10%) в пробах.

**Какие заболевания диагностировались? Каковы особенности диагностики? В чем состоит вклад лаборатории в развитие диагностического процесса?**

— У 423 больных (224 мужчин и 199 женщин) были диагностированы острые лимфобластные лейкозы (ОЛЛ). Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) диагностированы у 1025 больных (483 мужчин и 542 женщины). На основании результатов морфологического, цитохимического исследований и иммунофенотипирования были верифицированы отдельные варианты В- и Т-линейных ОЛЛ. Преобладали ОЛЛ, возникающие из ранних В-клеток-предшественников. В соответствии со стадией дифференцировки их нормальных аналогов были выделены 4 цитологических варианта В-линейных ОЛЛ: про-В-ОЛЛ, ОЛЛ общего (common) типа, пре-В-ОЛЛ, а также В-ОЛЛ из зрелых клеток В-клеточного происхождения.

Среди Т-лимфобластных лейкозов, при которых blasts незначительно отличаются по цитоморфологическим признакам от клеток при В-ОЛЛ, в соответствии со стадией внутриклеточной дифференцировки клеток в норме при иммуноцитохимическом

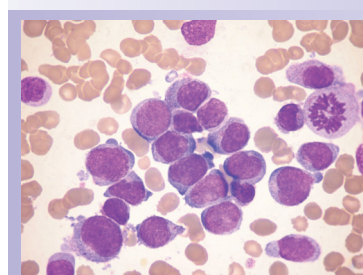
исследовании нами были выделены 4 цитологических варианта ОЛЛ.

У 341 больного (141 мужчины и 200 женщин) были диагностированы миелодиспластические синдромы (МДС). Они представляют собой гетерогенную группу клональных заболеваний, в основе возникновения которых лежит поражение гемопоэтической стволовой клетки. МДС сопровождаются неэффективным гемопоэзом и диспластическими изменениями, затрагивающими клетки одной или нескольких линий миелопоэза. Кроме того, они ассоциируются с повышенным риском развития ОМЛ.

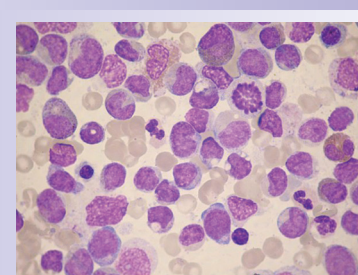
У 76 больных диагностирована рефрактерная анемия с избытком бластов (РАНБ). Для пациентов с РАНБ-1 (содержание бластов в костном мозге 5–9%) и РАНБ-2 (содержание бластов в костном мозге 10–19%) характерно повышенное количество клеток, экспрессирующих антигены CD34 и CD117, ассоциированные с гемопоэтическими клетками-предшественниками.

На поверхностных мембранах этих же клеток выявлялись антигены CD38, HLA-DR и миелоидно-ассоциированные антигены CD13 и CD33. В ряде случаев в популяции бластных клеток определялась асинхронная экспрессия антигенов, связанных с созреванием клеток гранулоцитарного ряда — CD15 и CD11b. У 15% больных на бластных клетках отмечалась абберрантная экспрессия антигена CD56 и у 20% — экспрессия антигена CD7, которая ассоциируется с неблагоприятным прогнозом.

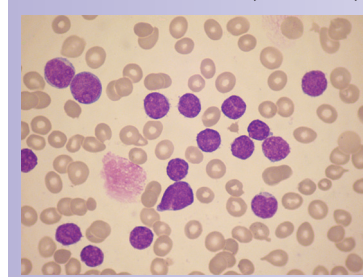
В 2011–2013 гг. нами были обследованы 104 пациента с хроническим миелолейкозом (ХМЛ). В основе развития этого заболевания лежит трансформация полипотентной гемопоэтической стволовой клетки (ПГСК). ХМЛ в своем развитии проходит три



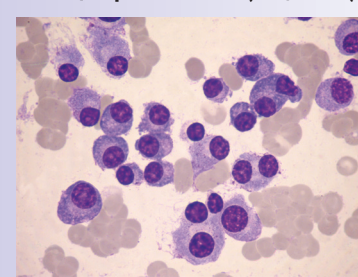
Бластные клетки при остром монобластном лейкозе (МГГ, x1000)



Бластные клетки при остром моноцитарном лейкозе (МГГ, x1000)



Бластные клетки при остром В-лимфобластном лейкозе (МГГ, x1000)



Клетки костного мозга при множественной миеломе (МГГ, x1000)

стадии — хроническую, фазу акселерации и бластного криза. Среди обследованных нами пациентов у 70 была выявлена хроническая фаза заболевания, у 5 — заболевание в фазе акселерации и у 29 — в фазе бластного криза, что ассоциируется с неблагоприятным прогнозом.

Решающее значение для диагностики бластного криза при ХМЛ имеет выявление в периферической крови и костном мозге не менее 20% бластных клеток. Реакция на проводимую терапию при бластном кризе ХМЛ, обусловленная природой преобладающего клона бластных клеток, устанавливается в большинстве случаев на основе их цитоморфологических и цитохимических признаков.

У 58,6% обследованных больных при бластном кризе клетки имели миелоидную природу и были представлены трансформированными клетками-предшественниками гранулоцитарного или эритробластического и мегакариоцитарного ряда. У 41,4% пациентов было установлено лимфоидное происхождение бластных клеток, определенных в крови и костном мозге.

При изучении наименее дифференцированных лейкоэмических клеток при миелоидном бластном кризе ХМЛ для подтверждения их происхождения применяли иммуноцитохимические методы и моноклональные антитела (мкАт) к антигенам CD13, CD14, CD15, CD33. Взаимодействие с мкАт к антигенам CD41, CD61 и гликофоруину позволило идентифицировать бластные клетки мегакариоцитарного и эритробластического рядов.

В случаях лимфоидного бластного криза при ХМЛ лейкоэмические клетки были представлены трансформированными

клетками-предшественниками В-лимфоцитов, на поверхностных мембранах которых определялась экспрессия антигенов CD10, CD19 и CD20.

Кроме того, в 2011–2013 гг. у 1813 больных были диагностированы хронические лимфолифферативные заболевания (ХЛЛЗ). Среди них у 1103 пациентов выявлен В-клеточный хронический лимфолейкоз, у 26 — В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, у 105 — волосатоклеточный лейкоз и у 579 — различные формы неходжкинских злокачественных лимфом В-клеточного происхождения в стадии лейкоемизации.

В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ) является наиболее частой формой лейкозов (24%). В нашей практике он диагностировался преимущественно у лиц зрелого и пожилого возраста. При В-ХЛЛ, как показывают результаты проведенных в последнее время исследований, лейкоэмические клетки образуются из активированных, уже прошедших этап взаимодействия с антигеном В-лимфоцитов. В соответствии с критериями ВОЗ диагноз ХЛЛ устанавливается при наличии  $5 \times 10^9/\text{л}$   $\text{CD5}^+\text{CD23}^+$  моноклональных В-лимфоцитов, которые присутствуют в крови пациентов в течение как минимум 3 мес. На поверхностных мембранах клеток при В-ХЛЛ, кроме указанных выше маркеров, выявляется экспрессия антигенов CD19, CD20 и CD79a и только один тип легких цепей иммуноглобулинов — каппа или ламбда.

У пациентов с неблагоприятным прогнозом на поверхностных мембранах лейкоэмических клеток определялась экспрессия антигена CD38, который не является специфическим маркером В-клеток, а функционирует как регулятор активации и пролиферации клеток, зависящий от клеточного микроокружения.

При В-пролимфоцитарном лейкозе (В-ПЛЛ) — агрессивном заболевании, которое характеризуется неэффективной реакцией на терапию (СНОР, флударабин), — на поверхностных мембранах клеток крови и костного мозга отмечается выраженная экспрессия IgM и В-линейно-ассоциированных антигенов CD19, CD22, CD20 и CD79a. Основным дифференциально-диагностическим признаком при В-ПЛЛ является интенсивная реакция при цитохимическом выявлении активности тартрат-резистентной кислой фосфатазы (которая не подавляется при добавлении в инкубационную среду ионов тартрата).

Волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ) — редкая и необычная форма опухолевых заболеваний лимфоидной ткани — вероятно, формируется из активированных В-клеток на поздних стадиях их созревания. Лейкоэмические клетки имеют отростки цитоплазмы, напоминающие волоски. При этом заболевании также определяется активность тартратрезистентной кислой фосфатазы. При иммуноцитохимическом исследовании на поверхностных мембранах клеток наблюдалась коэкспрессия антигенов CD20, CD22, CD11c, CD25. С помощью иммуноцитохимических методов и мкАт проводилась дифференциальная диагностика указанных форм лимфолейкозов (В-ХЛЛ, В-ПЛЛ, ВКЛ) с некоторыми В-клеточными неходжкинскими лимфомами в фазе лейкоемизации.

Плазмоклеточные опухоли — весьма неоднородная группа, характеризующаяся моноклональной пролиферацией клеток В-ряда на терминальных стадиях дифференцировки, — были диагностированы у 344 больных.

В течение трех лет работы лаборатории множественная миелома была обнаружена у 290 пациентов, солитарная плазмодомы — у 37, плазмобластный лейкоз — у 4. У остальных 13 больных были верифицированы моноклональная гаммапатия невыясненного генеза, первичный амилоидоз, заболевания, обусловленные отложением в тканях моноклональных легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов.

В целом в течение трехлетнего периода в отделе иммуноцитохимии и онкогематологии ИЭПОР им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины с помощью цитоморфологических, энзимохимических и иммуноцитохимических методов были проведены диагностические исследования у большой группы больных г. Киева и регионов Украины с различными формами опухолевых заболеваний кроветворной и лимфоидной тканей.

Впоследствии на основе результатов выполненных нами исследований проводилось лечение пациентов с использованием современных терапевтических протоколов. При этом удалось достичь существенного улучшения результатов лечения — увеличения частоты и длительности ремиссий при острых лейкозах, продолжительности периода бессобытийной выживаемости при других формах гемобластозов.

Подготовила Катерина Котенко