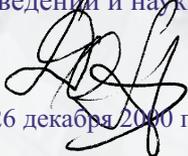


# МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

## МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

СОГЛАСОВАНО

Заместитель начальника  
Главного управления кадровой политики,  
учебных заведений и науки Н.И. Доста



26 декабря 2000 г.

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель  
министра здравоохранения  
В.М.Ореховский



26 декабря 2000 г.

Регистрационный № 172-0012

## СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ У ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ

Минск 2001

[Перейти к оглавлению](#)

**Учреждения-разработчики:** Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, НИИ гематологии и переливания крови

**Авторы:** д-р мед. наук О.В. Алейникова, канд. мед. наук О.Н. Сыцкевич, д-р мед. наук М.П. Потапнев, канд. мед. наук С.Е. Буглова, канд. биол. наук Т.В. Савицкая, Р.И. Юцкевич, Л.Ю. Федорова, О.Г. Сахарова, А.М. Кустанович, К.В. Сальников, В.В. Смольникова, А.В. Новик, д-р мед. наук, проф. А.И. Свирновский.

**Рецензент:** канд. мед. наук, доц. Л.А. Смирнова

Изложенные в методических рекомендациях принципы клинической и лабораторной диагностики острых лейкозов у детей и взрослых включают как общеклинические подходы, так и специальные методы установления детализированного диагноза острого лейкоза. Это обеспечивает раннюю и адресную терапию заболевания, его мониторинг и оценку остаточной (резидуальной) болезни. Методические рекомендации рассчитаны на врачей-гематологов, врачей-лаборантов, могут быть полезны для терапевтов и педиатров смежных специальностей.

Методические рекомендации утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь в качестве официального документа.

# Оглавление

<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>4</b>
<b>КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ У ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ .....</b>	<b>5</b>
Клинические особенности острых лейкозов у детей .....	5
Клинические особенности острых лейкозов у взрослых .....	7
<b>МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ .....</b>	<b>9</b>
1. Цитоморфологическое и цитохимическое исследование .....	9
2. Иммунофенотипирование лейкозных клеток методом проточной цитофлуориметрии .....	14
3. Цитогенетический метод исследования .....	38
4. Метод полимеразной цепной реакции .....	42
<b>ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ПРИЗНАКИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ У ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ .....</b>	<b>53</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Острые лейкозы (ОЛ) составляют 30–35% онкологических заболеваний детского возраста и 3% онкологических заболеваний у взрослых. У детей на долю острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) приходится 80%, острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) — 15–17%. У взрослых ОЛЛ составляет 25%, ОМЛ — 75% всех острых лейкозов. Частота ОЛ в Беларуси составляет  $4,10 \pm 0,4$  случаев на 100 000 детского населения в возрасте до 15 лет и  $3,37 \pm 0,13$  случаев на 100 000 взрослого населения, что соответствует мировым данным (Иванов Е.П. и др., 2000; Coebergh J.W.W. et al., 1989).

Существенный прогресс в лечении ОЛ за последние двадцать лет ознаменовался повышением уровня выживаемости с 5–20% до 60–80% у детей и с 5–10% до 40–60% у взрослых (по данным 5-летней оценки). Этот успех был достигнут благодаря использованию наиболее эффективных комбинаций различных цитостатических препаратов, выполнению трансплантации костного мозга, а также рационализации терапии, основанной на углубленной диагностике заболевания (Weinstein H.J. et al., 1983; Miller D.R., 1995).

Целью методических рекомендаций является ознакомление специалистов-гематологов, врачей-лаборантов и врачей смежных специальностей с современным состоянием клинической и лабораторной диагностики ОЛ у детей и взрослых.

Представленные материалы включают как обобщение литературных данных, так и результаты анализа собственных данных, полученных в процессе обследования и лечения больных с острыми лейкозами.

## КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ У ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ

### Клинические особенности острых лейкозов у детей

Среди наблюдавшихся нами в 1997–2000 гг. 165 детей с острым лейкозом у 73,9% установлен диагноз ОЛЛ и у 24,3% — ОМЛ. В трех случаях (1,8%) острый лейкоз был бифенотипическим.

Клиника ОЛ у детей характеризуется разнообразными проявлениями. Наиболее часто при ОМЛ (у 74% пациентов) отмечается *анемический синдром*, однако анемия III степени ( $Hb < 69$  г/л) встречается с одинаковой частотой (у 25–30% пациентов) как при ОЛЛ, так и при ОМЛ.

*Кожный геморрагический синдром*, часто сочетающийся с кровоточивостью слизистых, более выражен при ОМЛ (у 50% пациентов), особенно при варианте М3 по FAB-классификации. Интенсивность геморрагических проявлений разнообразна: от мелкоточечных и мелкопятнистых единичных или редких высыпаний на коже и слизистых до обширных кровоизлияний, десневых, носовых и даже кровотечений в желудочно-кишечный тракт.

*Интоксикационный синдром* в виде лихорадки более выражен при ОМЛ (у 80% пациентов), чем при ОЛЛ (у 64% пациентов). Такой показатель интоксикации, как снижение массы тела, встречается с одинаковой частотой при ОМЛ и ОЛЛ (в 15% случаев).

Более характерен для ОЛЛ *гиперпластический синдром*, который включает лимфаденопатию (ЛАП), которая выявляется у 51,6% пациентов, гепатомегалию (83%), спленомегалию (70%), увеличение лимфатических узлов средостения (75%). Довольно редко (в 2,6% случаев) выявляются лейкемиды на коже.

Более редко встречается костно-суставной синдром, который наблюдается у 22,3% больных с ОЛЛ, тогда как у больных с ОМЛ он отсутствует. Исследования костного мозга выявляют бластные клетки, процент которых при ОЛЛ в среднем составляет 81%, а при ОМЛ — 65,5%.

Картина периферической крови в развернутой стадии острого лейкоза весьма характерна. У детей с ОЛ обычно выявляют анемию, тромбоцитопению, а также изменение числа лейкоцитов, которое варьируется в довольно широких пределах. При ОЛЛ и ОМЛ у детей в большинстве случаев (62–63%) количество лейкоцитов не превышает  $20 \times 10^9/\text{л}$ , в 25% наблюдается гиперлейкоцитоз свыше  $50 \times 10^9/\text{л}$ . Реже (13–14%) выявляется лейкоцитоз в диапазоне от  $20 \times 10^9/\text{л}$  до  $50 \times 10^9/\text{л}$ . Алейкемическая форма острого лейкоза, т.е., отсутствие бластных клеток в периферической крови, отмечается у 26,5% больных с ОЛЛ и у 20% больных с ОМЛ.

Поражение ЦНС при ОЛ диагностируется, по нашим данным, у 12,6% больных, однако при ОЛЛ нейрорлейкоз встречается в 2,5 раза чаще, чем при ОМЛ.

На основании прежде всего фенотипических маркеров острые лимфолейкозы разделяют на В-линейные и Т-линейные. Т-линейные ОЛЛ составляют 14,5% случаев всех ОЛЛ. Клиническая картина Т-линейного ОЛЛ у детей характеризуется наличием в 100% случаев *гиперпластического синдрома* со значительным увеличением размеров печени и селезенки. *Геморрагический синдром* наблюдается у половины больных и обычно представлен петехиально-пятнистой сыпью. *Анемический синдром* встречается только в 16% случаев в виде анемии I степени. При Т-линейном ОЛЛ часто (в 42,6% случаев) имеет место вовлечение ЦНС (нейрорлейкоз). Исследование периферической крови в 91% случаев выявляет гиперлейкоцитоз (до  $260 \times 10^9/\text{л}$ ). При биохимическом исследовании крови для больных с Т-линейным ОЛЛ характерно значительное увеличение лактатдегидрогеназы (ЛДГ), что не характерно для других форм ОЛЛ.

## Клинические особенности острых лейкозов у взрослых

Среди обследованных нами взрослых больных с острыми лейкозами ОМЛ был диагностирован в 78% случаев и ОЛЛ — в 19% случаев, что соответствует данным других авторов (75% и 25% соответственно) (Lanzkowsky Ph., 1995; Williams M.G., Coller B.S., 1995). В-линейный фенотип ОЛЛ встречается гораздо чаще (у 88,9% пациентов), чем Т-линейный (у 11,1% пациентов). Морфологический вариант L2 (по FAB-классификации) среди всех ОЛЛ является доминирующим (77,8%). Среди ОМЛ преобладает (47,3% случаев) M1 вариант.

Клинические проявления острого лимфолейкоза у взрослых наиболее часто характеризуются лимфаденопатией (в 89% случаев), гепатомегалией (83%) и спленомегалией (61%). При ОМЛ эти признаки *гиперпластического синдрома* обнаруживаются реже. Тем не менее, среди субтипов ОМЛ варианты M4, M5 и M0 часто сопровождаются гепатоспленомегалией (в 89–100% случаев), которая реже встречается (в 33–67% случаев) при M1 и M2 вариантах ОМЛ и практически не встречается (0–15% случаев) при остром промиелоцитарном лейкозе (ОПЛ, M3). Проявления *интоксикационного синдрома* (лихорадка с температурой более 38° С) обнаруживаются у 43–78% больных с ОМЛ, несколько реже (у 39% больных) при ОЛЛ. Признаки *геморрагического синдрома* отмечаются в 67% случаев ОЛЛ и 75–80% случаев ОМЛ, за исключением ОПЛ (M3), где он является доминирующим и наблюдается у всех больных. *Анемия* и тромбоцитопения встречаются более чем у половины больных с ОМЛ (M3, M4 и M5 формы по FAB-классификации), несколько реже при ОЛЛ.

Содержание лейкоцитов в периферической крови в большинстве случаев у взрослых с ОЛ выше  $50 \times 10^9/\text{л}$ . При анализе содержания бластных клеток наиболее низкие значения среди всех ОМЛ как для костного мозга, так и для периферической крови отмечаются у больных с М2 вариантом (средние значения — 59% и 44% бластных клеток соответственно). Средние значения содержания бластных клеток в костном мозге (80%) и периферической крови (50–60%) больных с ОМЛ и ОЛЛ практически не различаются.

## МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ

Диагностика ОЛ базируется на результатах как общеклинических (гемограмма, биохимический анализ крови, гемостазиограмма), так и специальных методов исследования (миелограмма, в ряде случаев — трепанобиопсия, цитоморфологическое и цитохимическое исследование бластных клеток, цитогенетический анализ, иммунофенотипирование лейкозных клеток методом проточной цитофлуорометрии, по показаниям — молекулярно-биологические исследования методом полимеразной цепной реакции).

### 1. Цитоморфологическое и цитохимическое исследование

Цитоморфологическое исследование выполняется методом световой микроскопии при увеличении в 700–1000 раз мазков аспиратов костного мозга и/или периферической крови, окрашенных по Романовскому—Гимзе. Морфологические и цитохимические признаки, позволяющие установить варианты острого лейкоза, основаны на критериях FAB-классификации, которые суммированы в таблицах 1, 2, 3. Среди цитохимических реакций окраска на фосфолипиды суданом черным является одним из наиболее достоверных критериев дифференциальной диагностики ОЛЛ и ОМЛ. Для ОМЛ характерна положительная реакция, в то время как для ОЛЛ — отрицательная.

Миелобласты дают позитивную окраску на миелопероксидазу, лимфобласты — отрицательную. Для бластных клеток при ОМЛ характерно диффузное окрашивание на неспецифическую эстеразу (НЭ), для бластных клеток при ОЛЛ — гранулярное. Реакция на гликоген (ШИК-реакция) положительна (в гранулярной форме) в лимфобластах, но не миелобластах.

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

Суммируя вышеизложенный материал, следует отметить, что микроскопическое и гистохимическое исследование бластных клеток при острых лейкозах во многих случаях позволяет выявить их принадлежность к отдельным росткам кроветворения и определенному этапу дифференцировки, хотя новая классификация ВОЗ не требует определения L1, L2, L3 клеток (Херрис Н.Л. и др., 2000).

*Цитологические признаки L1-, L2- и L3-вариантов морфологии лейкозных клеток при остром лимфобластном лейкозе (Байдун Л.В., 1997; Lanzkowsky Ph., 1995)*

<b>Цитологические признаки</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>
Размеры клеток	преобладают небольшие клетки	большие клетки, неоднородная по размеру популяция	большие клетки, однородная по размеру популяция
Ядерный хроматин	вариабельный, популяция однородная по данному признаку	вариабельный, популяция неоднородна по данному признаку	ясно очерченный, грубо сетчатый, популяция однородная
Форма ядер	правильная, редкие зазубрины, складчатость, расщепления	неправильная, частые расщепления, вдавления, зазубрины	правильная, округлая или овальная
Нуклеолы	невидимые или небольшие, плохо различимы	одна или несколько, часто большие	одна или несколько, выступающие, пузырьковидные
Количество цитоплазмы	небольшое	вариабельное, часто умеренно обильное	умеренно обильное
Цитоплазматическая базофилия	слабая или промежуточная, редко выраженная	вариабельная, в некоторых случаях глубокая	очень глубокая
Цитоплазматическая вакуолизация	вариабельная	вариабельная	часто сильно выраженная

*FAB-классификационные цитоморфологические признаки острых миелоидных лейкозов (Байдун Л.В., 1996; Lanzkowsky Ph., 1995; Williams M.G., Collier B.S., 1995)*

Субтипы ОМЛ (FAB-классификация)	Цитоморфологические признаки	Цитохимическая характеристика			
		палочки Ауэра	МПО	ХАЭ	НЭ
M0 — острый миелобластный лейкоз без признаков созревания	миелобласты без содержания гранул	—	—	—	—
M1 — острый миелобластный лейкоз с минимальными признаками созревания	миелобласты с/без краевых гранул	±	+	±	—
M2 — острый миелобластный лейкоз с созреванием	миелобласты с гранулами, промиелоциты; несколько миелоцитов	+	+	±	—
M3 — острый промиелоцитарный лейкоз	промиелоциты с большим количеством гранул	++	++	+	—
M4 — острый миеломонобластный лейкоз	миелобласты и промиелоциты, > 20% в костном мозге; промонобласты и монобласты > 20%	±	+	+	+*
M5a — острый монобластный лейкоз без дифференцировки	большие монобласты с «кружевным» ядерным хроматином и обильной цитоплазмой	—	—	—	+**
M5b — острый монобластный лейкоз с дифференцировкой	монобласты, моноциты, промоноциты. Моноцитоз в периферической крови	—	—	—	+**
M6 — острый эритролейкоз	эритроидные предшественники > 50%, миело-бласты > 30%	+	+	—	±
M7 — мегакариоцитарный лейкоз	мегакариобласты, «лимфоидная» морфология (L1, L2, M1), «цитоплазматические» выросты	—	—	±	±**

МПО — миелопероксидаза, ХАЭ — хлорацетатэстераза, НЭ — неспецифическая эстераза.

+ — обычно положительны, ++ — положительны в избытке, — — обычно отрицательны, ± — может присутствовать или отсутствовать, \* не полностью ингибируются фторидом натрия, \*\* полностью ингибируются фторидом натрия.

*Система цитологической оценки лейкемических клеток (scoring system) для диагностики L1- и L2-вариантов ОЛЛ (FAB-группа, 1981) (Байдун Л.В., 1997; Lanzkowsky Ph., 1995)*

<b>Цитологический признак</b>	<b>Количественные критерии</b>	<b>Оценка</b>
Высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение	в 75% и более лейкозных клеток цитоплазма занимает менее 20% площади клетки	+ 1
Низкое ядерно-цитоплазматическое соотношение	в 25% и более лейкозных клеток цитоплазма занимает более 20% площади клеток	-1
Нуклеолы	в 75% лейкозных клеток ядрышки отсутствуют или выявляется одна небольшая нуклеола	+ 1
Нуклеолы	в 25% лейкозных клеток выявляется одна и более выступающих нуклеол	-1
Нерегулярная ядерная мембрана	в 20% и более лейкозных клеток выявляются значительные нарушения контура ядерной мембраны: глубокие зазубрины, впадины	-1
Большие размеры клеток	50% и более лейкозных клеток имеют диаметр, достигающий двух диаметров малых лимфоцитов	-1
L1-вариант ОЛЛ — сумма баллов от 0 до + 2, L2-вариант ОЛЛ — сумма баллов от -1 до -4		

## 2. Иммунофенотипирование лейкозных клеток методом проточной цитофлуориметрии

В основе современной иммунофенотипической диагностики ОЛ лежит представление об этапности процесса созревания гемопоэтических клеток-предшественников, из которых на фоне возникновения генетических аномалий может развиваться лейкозный клон. Спектр экспрессируемых этими клетками антигенов (Аг) зависит как от их линейной принадлежности, так и от стадии дифференцировки. Выявление линейно-специфичных и стадийно-специфичных маркеров с помощью моноклональных антител (МКА) позволяет дать иммунофенотипическую характеристику бластных клеток, обычно более точную по сравнению с методами морфологического и цитохимического анализа (Jennings C.D., Foon K.A., 1997). Спектр экспрессируемых лейкозными клетками Аг не всегда соответствует этапам нормального гемопоэза, что ограничивает возможности определения степени их дифференцировки методом иммунофенотипирования (Behm F.G., Campana D., 1999), особенно при ОМЛ и в меньшей степени при Т-ОЛЛ.

Европейская группа по иммунологической классификации острых лейкозов (EGIL-95) рекомендует использовать МКА, выявляющие следующие маркеры (Бене М.К. и др., 1996):

- В-лимфоидные: CD19, CD22, CD79a, CD10, цитоплазматический (cy) и поверхностный (s) IgM, k- и l-цепи Ig, CD20, CD24;
- Т-лимфоидные: цитоплазматический и поверхностный CD3, CD2, CD7, CD1a, CD4, CD5, CD8, TCR a/b<sup>+</sup>, TCR g/d<sup>+</sup>
- миелоидные: MPO, CD13, CD33, CDw65, CD117, лизоцим, CD14, CD15, CD41, CD61, CD64, гликофорин А
- линейно-неспецифичные: TdT, CD34, HLA-DR

Практически ценным представляется определение общелейкоцитарного антигена CD45, который дает дополнительную информацию о степени дифференцировки бластных клеток и позволяет отличать их от нормальных лимфоцитов. Панель МКА фирмы «Becton Dickinson», разработанная для клинической диагностики острых лейкозов, получила одобрение ВОЗ. Используют также МКА и других производителей, имеющих международную аттестацию.

Для визуализации бластных клеток, взаимодействующих с МКА, последние конъюгированы с флуорохромами (флуоресцеин изотиоцианат — FITC, фикоэритрин — PE, перидинин хлорофилл протеин — PerCP и др.). Одновременное внесение в одну пробирку двух-четырех МКА, конъюгированных с различными флуорохромами, позволяет наиболее точно охарактеризовать гетерогенность лейкозных клеток, определить смешанные варианты иммунофенотипов (бифенотип и коэкспрессию маркеров «чужих» линий), а также выявить примесь нормальных клеток крови и, таким образом, избежать неправильной трактовки полученных результатов.

### **2.1. Методика иммунофенотипирования бластных клеток с помощью проточной цитометрии**

Выделение популяции мононуклеарных клеток крови и обработка клеток с помощью МКА выполняются в соответствии с инструкциями фирмы-изготовителя, прилагаемыми к поставляемым реагентам («Becton Dickinson», «ДАКО» и др.). Методика подробно изложена также в практических руководствах по проточной цитометрии (Andreeff M., 1990; Ormerod M.G., 1994). При работе с МКА, мечеными флуорохромами, предпочтительнее работать с мононуклеарами, чем с цельной кровью.

Для выделения мононуклеров периферическую кровь или аспират костного мозга наслаивают на гистопак (Histopaque 1077, «Sigma») или раствор фиколл-верографина плотностью 1,077 г/см<sup>3</sup> 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 путем центрифугирования взвеси клеток при 2200 об./мин в течение 3 мин. При необходимости лизируют эритроциты раствором хлорида аммония. В этом случае производят дополнительную отмывку клеток с помощью ФСБ. Затем готовят взвесь клеток с концентрацией 5–10 млн/мл, вносят ее по 100 мкл в предварительно промаркированные пробирки. В каждую пробирку вносят одно или несколько МКА, конъюгированных с различными флуорохромами. Целесообразно сочетание лимфоидных маркеров с миелоидными, например, CD7/CD13, CD10/CD117, CD19/CD33 и т.д. В качестве третьих МКА в эти же пробирки могут вноситься МКА, выявляющие линейно-неспецифичные маркеры CD34, HLA-DR, CD45. Для диагностики отдельных типов ОЛ полезную информацию могут дать сочетания CD34/CD11c, HLA-DR/CD3, CD5/CD22.

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

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 (FACS Lysing Solution, «Becton Dickinson»), затем отмывают и обрабатывают 10 мин при комнатной температуре пермеабилзирующим раствором (FACS Permeabilizing Solution, «Becton Dickinson»). Осадок клеток отмывают, инкубируют с МКА при + 4°С 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 пермеабилзирующих составов фирм-производителей МКА.

Анализ клеток, маркированных МКА, конъюгированными с флуорохромами, выполняется на проточных цитофлуориметрах (фирм «Becton Dickinson», «Coulter» и др.). Для учета и анализа полученных данных используют прикладные программы LYSYS II, CellQuest, PAINT-A-GATE («Becton Dickinson») 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. Позитивность маркеров определяется по отношению к негативному контролю, в котором вместо МКА клетки обрабатывают мышиными IgG аналогичного изотипа.

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.

## **2.2. Интерпретация результатов иммунофенотипирования**

При анализе полученных данных принято считать позитивными те маркеры, которые обнаружены не менее чем на 20% бластных клеток. Для наиболее специфичных цитоплазматических маркеров, таких как  $\text{cyIgM}$ ,  $\text{cyCD3}$ ,  $\text{CD79a}$  и  $\text{MPO}$ , EGIL рекомендует снижать лимит позитивности до 10%. Иммунофенотипическая диагностика ОЛ затруднена в тех случаях, когда имеют место:

- лейкозы с коэкспрессией нескольких маркеров «чужих» линий;
- бифенотипические лейкозы;
- лейкозы с гетерогенными популяциями бластов;
- лейкозы с абберантными фенотипами (характеризующиеся отсутствием одного или нескольких линейно-специфичных маркеров);
- лейкозы с асинхронной экспрессией антигенов (характеризующиеся одновременной экспрессией маркеров разных этапов дифференцировки, что не встречается на нормальных клетках различных стадий созревания);
- наличие значительной примеси клеток периферической крови.

Для правильной интерпретации результатов иммунофенотипирования в таких ситуациях рекомендуется: окрашивание одновременно нескольких антигенов в одной пробе; определение СИФ данного маркера. Использование в одной пробе 2–4 МКА, конъюгированных с разными флуорохромами, позволяет точно определить, как экспрессированы соответствующие антигены: на одних и тех же клетках или на разных. Именно такой подход считается необходимым для строгого доказательства коэкспрессии маркеров разных линий на бластных клетках, относящихся к одной популяции.

Каждый из определяемых с помощью МКА клеточных антигенов характеризуется своим диапазоном значений СИФ, который зависит от стадии дифференцировки клеток, а также от специфичности экспрессии линейно-рестриктированных Аг на клетках «своей» или «чужой» линии. По нашим данным, СИФ миеломаркеров CD13, CD33, CD117 и MPO, выявляемых как коэкспрессия на клетках ОЛЛ, ниже, чем при их специфической экспрессии на клетках ОМЛ (табл. 4).

*Средняя интенсивность флуоресценции миеломаркеров на клетках ОМЛ и ОЛЛ с коэкспрессией (у детей)*

<b>Маркер</b>	<b>ОМЛ (n = 14)</b>	<b>ОЛЛ с коэкспрессией (n = 20)</b>
CD13	368,7 ± 78,6 (92–1030)	72,5 ± 13,7** (52–310)
CD33	428,3 ± 65,6 (132–1125)	77,7 ± 14,0*** (23–166)
CD117	376,8 ± 46,0 (154–609)	45,8 ± 3,35*** (39–55)
MPO	565,0 ± 79,1 (120–1316)	123,0 ± 14,1*** (31–338)

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  по сравнению с ОМЛ. В скобках даны диапазоны индивидуальных значений СИФ.

T-линейные маркеры CD2, CD4 и CD7 характеризуются высокой интенсивностью флуоресценции на лейкозных клетках при Т-ОЛЛ и низкой — при коэкспрессии на лейкозных клетках при ОМЛ. Общелейкоцитарный антиген CD45 на бластах, как правило, экспрессирован значительно слабее, чем на нормальных лимфоцитах, что позволяет выявить неоднородность состава выделенной популяции мононуклеаров и исключить из последующего анализа примесь лимфоцитов. В пределах одной линии гемопоэза плотность экспрессии CD45 нарастает по мере повышения степени дифференцировки, что наглядно видно при сравнении различных вариантов острых и хронических B-линейных лейкозов (табл. 5).

Значения СИФ также зависят от типа флуорохрома, с которым конъюгировано данное МКА, от параметров настройки проточного цитометра, его типа и используемой прикладной программы учета результатов.

*Значения СИФ для CD45 на клетках В-линейных острых и хронических лейкозов различной стадии дифференцировки (у взрослых больных)*

<b>Тип лейкоза</b>	<b>СИФ, усл. ед.</b>
Про-В-ОЛЛ (n = 1)	10
Common В-ОЛЛ (n = 11)	22,36±12,5
Пре-В-ОЛЛ (n = 11)	48,36±20,83
Зрелый В-ОЛЛ (n = 11)	77,73±14,24
Хронический В-лимфолейкоз (n = 11)	118,55±19,99
Волосатоклеточный лейкоз (n = 11)	205,82±28,99
Плазмоклеточный лейкоз (n = 11)	9,27±2,15

### **2.3. Иммунофенотипические критерии диагностики острых лейкозов**

Согласно классификации Европейской группы по иммунологической классификации лейкозов (EGIL-95), выделяют 4 основных группы острых лейкозов (Бене М.К. и др., 1996):

1. Острые лимфобластные лейкозы (ОЛЛ).
2. Острые миелобластные лейкозы (ОМЛ).
3. Бифенотипические острые лейкозы (БОЛ).
4. Недифференцированные острые лейкозы.

В группе ОЛЛ выделяют четыре подтипа В-линейных и пять подтипов Т-линейных лимфолейкозов, различающихся по степени дифференцировки лейкозных клеток, а также ОЛЛ с коэкспрессией миеломаркеров. В группе ОМЛ выделяют подтипы в соответствии с пораженным ростком миелопоэза (миеломоноцитарный, эритроидный, мегакариоцитарный); в отдельные подгруппы отнесены низкодифференцированный ОМЛ, TdT-позитивный ОМЛ и ОМЛ с коэкспрессией лимфоидных маркеров.

Согласно данным, полученным нами при иммунофенотипировании 165 впервые выявленных острых лейкозов у детей, В-линейные ОЛЛ составляют 63,0% всех случаев, Т-линейные ОЛЛ — 10,9%, ОМЛ — 24,3%, БОЛ — 1,8%. Случаев недифференцированного ОЛ в 1998–2000 гг. нами не наблюдалось. Среди обследованных нами взрослых больных с острыми лейкозами ОМЛ диагностирован в 78% случаев и ОЛЛ — в 19% случаев, в том числе В-линейные ОЛЛ — у 88,9% пациентов, Т-линейные ОЛЛ — у 11,1%.

*Классификация острых лимфобластных лейкозов  
(EGIL 95) (по Бене М.К. и др., 1996)*

<p><i>1. В-линейные ОЛЛ:</i></p> <p>Про-В-ОЛЛ Common В-ОЛЛ Пре-В-ОЛЛ Зрелый В-ОЛЛ</p>	<p>CD19<sup>+</sup> и/или CD79a<sup>+</sup> и/или CD22<sup>+</sup> (позитивны не менее 2 из 3 маркеров) Большинство случаев TdT<sup>+</sup> (кроме зрелого В-ОЛЛ), HLA-DR<sup>+</sup> Другие дифференцировочные В-линейные Аг отсутствуют CD10<sup>+</sup> cyIgM<sup>+</sup> sIgM<sup>+</sup></p>
<p><i>2. Т-линейные ОЛЛ:</i></p> <p>Про-Т-ОЛЛ Пре-Т-ОЛЛ Кортикальный Т-ОЛЛ Зрелый Т-ОЛЛ <math>\alpha/\beta</math><sup>+</sup> Т-ОЛЛ (группа а) <math>\gamma/\delta</math><sup>+</sup> Т-ОЛЛ (группа б)</p>	<p>CD3<sup>+</sup> (цитоплазматический или мембранный) Большинство случаев TdT<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup> CD7<sup>+</sup> CD2<sup>+</sup> и/или CD5<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> CD1a<sup>+</sup> Мембранный CD3<sup>+</sup>, CD1a<sup>-</sup> Анти-TCR <math>\alpha/\beta</math><sup>+</sup> Анти-TCR <math>\gamma/\delta</math><sup>+</sup></p>
<p><i>3. ОЛЛ с коэкспрессией миелоидных антигенов (миелопозитивный ОЛЛ)</i></p>	

В табл. 6 представлены критерии иммунофенотипической диагностики ОЛЛ. Принадлежность лейкозных клеток к В-лимфоидной линии определяется экспрессией не менее 2 из 3 В-линейных маркеров: CD19, CD79а, CD22. Кроме того, в ядрах В-лимфобластов выявляется фермент терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза – TdT (кроме зрелого В-ОЛЛ), а на поверхности — антигены гистосовместимости II класса HLA-DR. Common В-ОЛЛ отличается от про-В-ОЛЛ появлением CALLA-антигена CD10. Для пре-В-ОЛЛ определяющим является наличие в цитоплазме IgM (m-цепи). Зрелый В-ОЛЛ характеризуется экспрессией поверхностного IgM (sIgM).

*Частота выявления основных маркеров  
при В-линейных ОЛЛ (у детей)*

Антигены	Про-В-ОЛЛ, n = 9		Common В-ОЛЛ, n = 47		Пре-В-ОЛЛ, n = 46	
	n	%	n	%	n	%
CD19	9/9	100	47/47	100	45/46	98
CD20	3/9	33	27/47	57	30/46	65
CD22	7/9	78	34/41	83	37/41	90
CD10	0/7	0	47/47	100	40/41	98
HLA-DR	9/9	100	47/47	100	46/46	100
TdT	6/6	100	35/35	100	32/34	94
CD34	9/9	100	40/47	85	29/46	63
cyIgM	0/6	0	0/38	0	42/42	100
sIgM	0/7	0	0/42	0	3/40*	8
CD2	5/9	56	16/46	35	18/44	41
CD13	2/8	25	17/46	37	6/46	13
CD33	0/8	0	13/45	29	8/43	19
CD117	1/6	17	1/36	3	2/33	6
MPO	2/6	33	12/36	33	13/35	37

\*три случая транзиторного пре-В-ОЛЛ (cyIgM + sIgM + )

В табл. 7 представлена иммунофенотипическая характеристика 102 случаев ранних вариантов В-линейных ОЛЛ у детей. В этой группе Common В- и пре-В-ОЛЛ встречались примерно с одинаковой частотой (46% и 45% соответственно), тогда как про-В-ОЛЛ был значительно более редким (9%). Единственный случай зрелого В-ОЛЛ за период 1998–2000 гг. в таблицу не включен и охарактеризован отдельно. Как видно из таблицы, при всех трех ранних вариантах В-линейных ОЛЛ с наибольшей закономерностью выявлялись маркеры CD19, TdT и HLA-DR. Частота экспрессии CD22 и CD20 увеличивалась по мере повышения степени дифференцировки бластных клеток, тогда как частота экспрессии маркера стволовой клетки CD34, выявляемого на клетках про-В-ОЛЛ в 100% случаев, постепенно уменьшалась. Common В-ОЛЛ характеризовался экспрессией CD10 при отсутствии cyIgM и sIgM. Пре-В-ОЛЛ отличался присутствием cyIgM при сохранении экспрессии CD10. В 3 из 40 случаев (8%) была выявлена сочетанная экспрессия cyIgM и sIgM при отсутствии на поверхности бластных клеток легких цепей иммуноглобулинов (k и l), что характерно для транзиторного пре-В-ОЛЛ. Единственный за данный период у детей случай зрелого В-ОЛЛ, по морфологии клеток отнесенный к L3, характеризовался фенотипом CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD79a<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, sIgM<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, TdT<sup>-</sup>, cyIgM<sup>-</sup>, CD10<sup>-</sup>.

При ранних вариантах В-линейных ОЛЛ (про-В, Common В, пре-В) коэкспрессия миеломаркеров, а также Т-линейного маркера CD2 встречалась более чем в половине случаев. Как видно из табл. 6, наиболее закономерно на В-лимфобластах выявлялась коэкспрессия CD2 и MPO, значительно реже — CD13, CD33 и CD117. Выявление одновременной коэкспрессии 2 и более миеломаркеров требовало проведения дифференциальной диагностики с БОЛ, для чего использовали систему подсчета баллов (см. далее).

Определяющим критерием диагностики Т-линейных ОЛЛ (табл. 6) является экспрессия CD3 в цитоплазме или на поверхности бластных клеток (в зависимости от стадии их дифференцировки), а также внутри-ядерного фермента TdT при отсутствии поверхностного HLA-DR антигена. При наиболее раннем варианте Т-ОЛЛ (про-Т-ОЛЛ), помимо указанных маркеров, экспрессируется также CD7. Пре-Т-ОЛЛ отличается более широким спектром Т-линейных Ag: появляются CD2, CD5 и иногда CD8. Определяющим признаком кортикального Т-ОЛЛ служит экспрессия CD1a, а зрелого варианта Т-ОЛЛ – экспрессия поверхностного CD3. В зависимости от типа Т-клеточного рецептора зрелый Т-ОЛЛ может относиться к группе А (TCR  $\alpha/\beta^+$ ) или В (TCR  $\gamma/\delta^+$ ). Общеизвестно, что примерно в 25% случаев Т-ОЛЛ стадию дифференцировки лейкозных клеток точно установить не удается из-за асинхронной экспрессии антигенов (Jennings C.D., Foon K.A., 1997; Behm F.G., Campana D., 1999).

Согласно полученным нами данным (табл. 8), у детей чаще других встречается кортикальный тип Т-ОЛЛ (половина всех случаев Т-ОЛЛ). При этом, помимо указанных в классификации маркеров, полезным для диагностики оказывается определение также CD4 и CD8, поскольку именно двойная позитивность бластов (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) позволила нам отнести Т-ОЛЛ к кортикальному типу при сомнительных результатах исследования CD1a или при отсутствии анти-CD1a МКА в типизирующей панели. Для данного типа Т-ОЛЛ характерной была также экспрессия TdT, CD2, CD5 и CD7. В отдельных случаях сохранялся маркер стволовой клетки CD34 и появлялась начальная экспрессия поверхностного CD3. С маркером CD1a в половине случаев сочеталась коэкспрессия CALLA-антигена CD10. Коэкспрессия миеломаркеров встречалась редко, за исключением МРО, низкие значения СИФ которого свидетельствовали о его неспецифичности.

*Частота выявления основных маркеров  
при Т-линейных ОЛЛ у детей*

Антигены	Т-ОЛЛ с атипичной экспрессией маркеров, n = 4		Кортикальный Т-ОЛЛ, n = 9		Зрелый Т-ОЛЛ, n = 5	
	n	%	n	%	n	%
CD2	4/4	100	8/9	89	5/5	100
sCD3	4/4	100	3/9	33	4/5	80
CD5	4/4	100	9/9	100	5/5	100
CD7	4/4	100	9/9	100	5/5	100
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	1/4	25	2/9	22	1/5	20
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	2/4	50	6/9	67	4/5	80
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0/4	0	8/9	89	0/5	0
CD1a	1/4	25	6/7	86	0/2	0
TdT	3/4	25	8/8	100	2/3	67
CD10	0/4	0	4/8	50	1/5	20
CD34	2/3	67	2/9	22	0/5	0
CD13	1/3	33	2/9	22	0/5	0
CD33	0/4	0	0/9	0	0/4	0
CD117	1/4	25	0/7	0	1/3	33
MPO	2/4	50	6/8	75	1/4	25

Зрелые варианты Т-ОЛЛ характеризовались отсутствием CD34, CD1a, постепенным исчезновением TdT в сочетании с высокой интенсивностью флуоресценции CD2, sCD3, CD5, CD7, а также только одного из двух маркеров: CD4 или CD8, разделение которых происходит на медуллярном этапе дифференцировки тимоцитов. Коэкспрессия миеломаркеров (CD117, MPO) встречалась в единичных случаях.

Иммунофенотипы, которые можно было бы отнести по классификации EGIL-95 к наиболее ранним вариантам Т-ОЛЛ, среди 18 Т-линейных ОЛЛ, выявленных за последние 2,5 года, не встречались. Как видно из табл. 7, в четырех случаях (22%) степень зрелости Т-ОЛЛ установить не удалось. В трех из них причиной послужила одновременная экспрессия маркеров как ранних, так и поздних стадий дифференцировки (асинхронная экспрессия): sCD3<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, TdT<sup>+</sup> (2 случая), sCD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD1a<sup>+</sup>, TdT<sup>+</sup> (1 случай). Фенотип лимфобластов в одном случае был aberrантным: sCD3<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>. Все атипичные варианты Т-ОЛЛ характеризовались коэкспрессией одного из миеломаркеров (MPO, CD117 и CD13).

В классификации EGIL-95 (табл. 9) все подтипы ОМЛ миеломоноцитарного ряда объединены в одну группу, при этом диагностика базируется на выявлении экспрессии на бластных клетках двух и более маркеров из числа следующих: MPO, CD13, CD33, CD65, CD117. В то же время иммунофенотипирование позволяет в ряде случаев дать более детальную характеристику лейкозов этой группы, в первую очередь — отличить ОЛ миелоидного ряда (FAB-подтипы M0, M1, M2, M3) от ОМЛ с вовлечением моноцитарного компонента (M4, M5). Так, экспрессия специфичного моноцитарного маркера CD14 может служить диагностическим критерием острого миеломоноцитарного (M4) и моноцитарного (M5) лейкоза. Следует, однако, помнить, что подвариант M5a у детей в половине случаев характеризуется отсутствием CD14 (Behm F.G., Campana D., 1999). Практически во всех случаях ОМЛ подтипов M4 и M5 бластные клетки экспрессируют антигены HLA-DR, CD11c и CD15, а также CD4 с низким значением СИФ, который появляется на определенных этапах дифференцировки клеток миеломоноцитарного ряда (табл. 10).

*Классификация острого миелоидного лейкоза (EGIL-95)  
(Бене М.К. и др., 1996)*

1. ОМЛ миеломоноцитарной линии:  
MPO<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD65<sup>+</sup>, и/или CD117<sup>+</sup> (c-kit)  
(позитивны не менее 2 маркеров)
2. ОМЛ эритроидной линии: (чисто эритроидный, М6):  
ранний/незрелый: не классифицируемый маркерами  
зрелый: антигликофорин А<sup>+</sup>
3. ОМЛ мегакариоцитарной линии (М7):  
CD41<sup>+</sup> и/или CD61<sup>+</sup> (мембранный или цитоплазматический)
4. Ранний миелоидный лейкоз (М0). Определяется только с помощью иммунологических маркеров. Фенотип соответствует другим миеломоноцитарным ОМЛ, при этом негативны цитохимические реакции и специфические лимфоидные маркеры CD3, CD79a, CD22.
5. TdT-позитивный ОМЛ.
6. ОМЛ с коэкспрессией лимфоидных маркеров (лимфопозитивный ОМЛ).

ОМЛ подтипов М1 и М2 иммунофенотипически неразличимы и характеризуются экспрессией миеломаркеров CD13, CD33, CD117, МРО в сочетании с HLA-DR и часто — CD34. Для ОМЛ М1 и М2 типична коэкспрессия Т-лимфоидных маркеров CD4, CD7. ТdT-позитивный ОМЛ выделен в классификации EGIL-95 в самостоятельную группу. При ОМЛ М3 бластные клетки обычно экспрессируют общемиелоидные маркеры CD13 и CD33. Антигены, характерные для более ранних стадий ОМЛ, такие как HLA-DR, CD34 и CD117, при М3 чаще отсутствуют, но могут выявляться на клетках микрогранулярного варианта М3v (Behm F.G., Campana D., 1999). Хотя наиболее ранний миелоидный лейкоз М0 выделен в самостоятельную группу, фенотипически он часто неотличим от ОМЛ М1 и характеризуется экспрессией хотя бы одного миеломаркера (CD13, CD33, CD117) в сочетании с CD34 и HLA-DR. При ОМЛ М0 часто выявляется также коэкспрессия CD4 и CD7.

Следует отметить, что выявление миелопероксидазы (МРО) методом проточной цитометрии оказывается более чувствительным по сравнению с цитохимическим исследованием, поскольку анти-МРО МКА связываются не только с ферментативно активной формой МРО, но и с проферментом (Behm F.G., Campana D., 1999). По нашим данным, у детей при ОМЛ М0-М5 МРО оказывается позитивной почти во всех случаях (табл. 10), причем интенсивность флуоресценции маркера нарастает по мере повышения степени дифференцировки бластных клеток. В отличие от ОМЛ, коэкспрессия МРО при лимфолейкозах характеризуется низкими значениями СИФ (см. табл. 4).

*Частота выявления основных маркеров  
при ОМЛ у детей*

Антигены	ОМЛ М0-М3, n = 27		ОМЛ М4-М5, n = 13	
	n	%	n	%
CD13	19/26	7	10/13	77
CD33	26/27	96	13/13	100
CD117	19/20	95	7/10	70
CD15	10/27	37	12/12	100
CD11c	13/27	48	13/13	100
MPO	21/22	95	10/11	91
CD14	0/26	0	11/13	85
HLA-DR	17/25	68	12/13	92
CD34	19/27	70	7/13	54
CD2	9/23	39	7/13	54
CD4	7/26	27	7/13	54
CD7	13/25	52	4/13	31
TdT	3/20	15	1/11	9

Точная фенотипическая диагностика ОМЛ бывает затруднена при отсутствии на бластных клетках отдельных линейно-специфичных маркеров и HLA-DR Ag (аберрантный фенотип), особенно если это сочетается с коэкспрессией T-линейных маркеров CD7, CD2 и реже — CD5. Такие случаи требуют проведения дифференциальной диагностики с бифенотипическими лейкозами.

Бифенотипические острые лейкозы (БОЛ) — это гетерогенная группа лейкозов, связанных с повреждением дифференцировки на уровне полипотентной стволовой клетки. Их характерный признак — одновременная экспрессия как лимфоидных, так и миелоидных маркеров. При этом маркеры обеих линий представлены в равной степени, что отличает БОЛ от ОЛ с коэкспрессией маркеров «чужой» линии. БОЛ следует также отличать и от смешанных вариантов ОЛ, при которых популяция лейкозных клеток состоит из двух и более клонов с разными фенотипами. Частота бифенотипических лейкозов, при соблюдении строгих критериев их диагностики, составляет примерно 7% (Jennings C.D., Foon K.A., 1997). В нашей практике этот показатель не превышает 3%.

*Критерии диагностики бифенотипических острых лейкозов (EGIL 95) (Бене М.К. и др., 1996)*

<b>Баллы</b>	<b>В-линейные маркеры</b>	<b>Т-линейные маркеры</b>	<b>Миеломаркеры</b>
2	CD79 cyIgM cyCD22	cy/s CD3 anti-TCR $\alpha/\beta$ anti-TCR $\gamma/\delta$	anti-MPO
1	CD19 CD10 CD20	CD2 CD5 CD8 CD10	CD13 CD33 CDw65
0,5	TdT CD24	TdT CD7 CD1a	CD14 CD15 CD64 CD117

\*диагноз бифенотипического острого лейкоза устанавливается, если сумма баллов  $> 2$  и для миеломаркеров, и для маркеров одной из лимфоидных линий.

Чтобы отличить БОЛ от ОЛ с коэкспрессией маркеров «чужих» линий, пользуются системами подсчета баллов, в которых экспрессия каждого линейно-специфичного Ag оценивается от 0,5 до 2 баллов в зависимости от его специфичности. Приведенная в табл. 11 схема диагностики бифенотипических лейкозов, предложенная EGIL-95, принципиально не отличается от широко распространенной ранее схемы D.Catovski (1993), но содержит более полный перечень маркеров. Диагноз БОЛ устанавливается, если маркеры и миелоидной, и лимфоидной линии набирают более 2 баллов.

Высокая частота выявления МРО как коэкспрессии на лимфобластах требует при интерпретации МРО-позитивных случаев ОЛ учитывать не только процент клеток, экспрессирующих данный маркер, но и его СИФ. Присутствие МРО в бластных клетках можно оценивать в 2 балла (см. табл. 11) только в тех случаях, когда плотность экспрессии антигенных молекул достаточно высока: по нашим данным, при СИФ свыше 300 усл. ед. (см. табл. 4). Такой подход позволяет исключить возможность неправильной интерпретации неспецифической позитивности МРО.

Таким образом, иммунофенотипирование позволяет получить незаменимую информацию о линейном происхождении, а также о степени дифференцировки лейкозных клеток, что важно для выбора адекватного протокола химиотерапии. При этом всегда следует помнить о том, что иммунофенотип бластных клеток при ОЛ у детей и взрослых не всегда соответствует иммунофенотипу нормальных клеток на определенных стадиях гемопоэза. Правильной интерпретации результатов исследования в сложных для диагностики случаях способствуют: оптимальный выбор МКА для типизирующей панели; анализ как процента позитивных клеток, так и интенсивности флуоресценции маркеров; знание критериев классификации как типичных, так и нетипичных вариантов ОЛ.

### 3. Цитогенетический метод исследования

Цитогенетические исследования характеризуют хромосомные нарушения в бластных клетках при острых лейкозах. При ОЛЛ хромосомные aberrации и изменения ploидности обнаруживаются более чем у половины больных. Клиническое значение имеют некоторые из них. В нормальных клетках содержится 46 хромосом, которые представляют диплоидный набор. Содержание в лейкозных клетках более 50 хромосом является благоприятным прогностическим признаком при ОЛ, особенно у детей. У детей частота гипердиплоидных лейкозных клонов составляет 25–30%, у взрослых — не более 5% (Сергеев А.Г. и др., 2000; Pui Ch.-H., Crist W.M., 1999). Наличие структурных перестроек в хромосомах бластов с числом хромосом более 50 имеет неблагоприятное прогностическое значение. Установлена также связь плохого исхода заболевания с гиподиплоидией лейкозных клонов. Изменения в геноме бластных клеток ассоциируются не только с количественными изменениями хромосом (ploидностью), но и с их структурными изменениями. Последние включают в себя реципрокные транслокации, инверсии, делеции, амплификацию генов и точечные мутации. Многие из этих изменений выявляются рутинным цитогенетическим анализом, однако есть такие, которые определяются только с помощью молекулярно-генетических методов.

Методика цитогенетических исследований общеизвестна (Benn P.A., Perle M.A., 1992; Gosden C.M. et al., 1992) и состоит в следующем:

- мононуклеары костного мозга выделяют в градиенте плотности гистопак-1077 (2200 об./мин, 20 мин), отмывают дважды раствором ФСБ, подсчитывают количество и жизнеспособность клеток;

- культивируют мононуклеары (5–8 млн клеток) в концентрации 1,0 млн/мл в питательной среде RPMI-1640 с 10% эмбриональной телячьей сывороткой, L-глутамином и антибиотиками в течение 24 ч (при ОЛЛ) или 24 ч и 48 ч (при ОМЛ) при 37°С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>;
- после окончания культивирования к клеткам добавляют 1 каплю колцемида (10 мкг/мл), перемешивают, инкубируют при 37°С в течение 30 мин;
- клетки центрифугируют, удаляют супернатант, оставив 1 мл среды над осадком;
- осадок клеток ресуспендируют, добавляют по каплям 0,55% раствор хлористого калия, доведя общий объем пробы до 10 мл, инкубируют при 37°С в течение 10 мин;
- пробы центрифугируют, ресуспендируют повторно в 0,55% растворе хлористого калия, снова центрифугируют;
- к 1 мл взвеси осадка добавляют по каплям охлажденный при –20°С фиксатор (96° этанол или метанол в смеси с ледяной уксусной кислотой в соотношении 3:1), инкубируют при +4°С в течение 10 мин;
- клетки осаждают центрифугированием, вновь добавляют фиксатор до 10 мл, оставляют пробирку на ночь;
- на следующий день клетки осаждают центрифугированием, готовят хромосомные препараты на стекле (до 9 стекол), окрашивают в 4% растворе краски Гимзы в течение 15 мин; учитывают метафазные пластинки.

Для достоверности учетов результатов оценивают не менее 10–20 метафазных пластинок. Наш опыт практической работы позволяет получить метафазные пластики в 90% случаев ОМЛ и 50–60% случаев ОЛЛ у детей, а также в 40–60% случаев ОЛ у взрослых, из них верифицировать кариотип лейкозных клеток удается практически во всех случаях ОМЛ и 80–85% случаев ОЛЛ.

Связь выявляемых структурных хромосомных поломок с вариантом ОЛ приведена в **табл. 12.**

*Хромосомные aberrации, наиболее часто определяемые при различных субтипах лейкозов (по Martinez-Climent J.A., 1997; с дополнениями)*

Субтип острого лейкоза	Хромосомные aberrации
<i>Острые лимфолейкозы</i>	
Про-В-ОЛЛ	t(4;11) (q21; q23) t(9;22) (q34; q11) t(11;19)(q23; p13)
Common В-ОЛЛ	del (6q) t(9;22) (q34; q11)
Пре-В-ОЛЛ	t(1;19) (q23; q13) t (12;21)(p13; q22)
Зрелый В-ОЛЛ	t(8;14) (q24; q32) t(2;8) (p12; q24) t(8;22) (q24; q11)
Т-линейные ОЛЛ	t(11;14) (p13; q11) t(1;14) (p34; q11) t(8;14) (q24; q11) t(10;14) (q24; q11)
<i>Острые миелолейкозы</i>	
M1	-7*, -5*, + 8* t(9;22) (q34; q11)
M2	-7*, + 8* t(8;21) (q22; q22)
M3	t(15;17) (q22; q11-12)
M4, M5, M2	+ 8*, t(9;11) (p21-22; q23), del (11)(q22-23)*
M4Eo, M2, M4	inv(16) (p13; q22), del (16) (q22)
M4, M2, M1	t(6;9) (p23; q34)*
M6	-7*, + 8*, del (5q)
M7	t (1;22)

\*данный тип aberrаций встречается и при других морфологических типах ОМЛ

Результаты цитогенетических исследований наиболее важны их неслучайной связью с определенными типами ОЛ и прогностической значимостью, что определяет тактику лечения пациента. Прогностически крайне неблагоприятным при ОЛЛ является наличие Ph-хромосомы —  $t(9;22)$ . Среди взрослых она встречается у 25–30% больных ОЛЛ (у детей — в 5–10% случаев). При ОМЛ к прогностически благоприятным относятся такие хромосомные aberrации, как  $t(8;21)$ ,  $t(15;17)$  и  $inv(16)$ , тогда как обнаружение моно- (три-) сомий 5, 7 и 8-й пар хромосом или комплекса хромосомных aberrаций свидетельствует о высокой вероятности плохого исхода заболевания.

#### **4. Метод полимеразной цепной реакции**

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) является основным молекулярно-биологическим методом, применяемым в онкогематологии для выявления химерных онкогенов при ОМЛ и реаранжировки генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора при ОЛЛ. Обычно используют две ее разновидности: мультиплексная («множественная») ПЦР, позволяющая в одной реакции определять как нормальный, так и химерный гены, и «гнездная» ПЦР, точно выявляющая определенный (измененный или неизмененный) участок гена. Последняя разновидность ПЦР, как наиболее чувствительная, применяется для диагностики минимальной остаточной болезни. Учитывая, что в основе лейкозов лежат генетические изменения, их выявление на уровне ДНК и РНК имеет важное значение для диагностики ОЛ и выбора тактики лечения.

Идентификация мРНК транскрипта диагностируемого гена, измененного в результате хромосомных aberrаций, осуществляется с применением реакции обратнотранскриптазной ПЦР (ОТ-ПЦР). При этом одноцепочечная мРНК, выделяемая из бластных клеток периферической крови или костного мозга пациентов, транскрибируется в кДНК с использованием фермента обратной транскриптазы. Амплификация (увеличение количества копий) гена-мишени достигается множеством раундов репликации кДНК с помощью специфических праймеров в реакции ПЦР. «Мультиплексная» ПЦР позволяет одновременно выявлять несколько генов в результате смешивания нескольких пар праймеров, определяющих размер амплифицируемых участков генов. «Гнездная» ПЦР предполагает проведение двухэтапной амплификации выявляемых участков генов, в которой ДНК-продукт первого этапа служит матрицей для амплификации во втором этапе.

Полученный в ходе реакции ДНК-продукт визуализируется с помощью геле-электрофореза. Методология проведения реакции ПЦР для выявления мРНК химерных генов описана N.C.P. Cross (1994) и другими авторами.

Важность молекулярно-биологических исследований для диагностики онкогематологических заболеваний подтверждается тем фактом, что в 1997 г. ВОЗ была предложена классификация неоплазий гематopoэтической и лимфоидной тканей, основанная на одновременном учете морфологических, иммунофенотипических, генетических и клинических признаков (Херрис Н.Л. и др., 2000). Согласно этим рекомендациям, для ОЛЛ важными прогностическими находками служат следующие генетические абберации:  $t(9;22)(q34; q11)$ , приводящая к образованию химерного гена BCR/ABL; реаранжировки с участием хромосомы 11q23 — гена MLL;  $t(1;19)(q23; p13)$  — гена E2A/PBX1;  $t(12;21)(p12; q22)$  — ETV/CBF $\beta$  (TEL/AML1). При ОМЛ такими являются:  $t(8;21)(q22; q22)$ , приводящая к образованию химерного гена AML1 (CBF $\beta$ )/ETO;  $t(15;17)(q22; q11-12)$  — гена PML/RAR $\beta$  и варианты;  $inv16$  и варианты CBF $\beta$ в/МУН11; реаранжировки с участием хромосомы 11q23 — гена MLL. Выявление транслокаций и других типов хромосомных аббераций проводится цитогенетически, в то время как ответственного за них гена — методом ПЦР.

#### **4.1. Молекулярная биология генов при ОЛЛ**

С помощью цито- и молекулярно-генетических методов показано присутствие хромосомных транслокаций в 75% случаев ОЛЛ. Транслокации при ОЛЛ наиболее часто затрагивают гены, кодирующие транскрипционные факторы — белки, взаимодействующие с ДНК. Изменение нормальной функции этих генов ведет к сбою нормальной регуляции пролиферации, дифференцировки и чувствительности к апоптозу лейкозных клеток.

Реципрокная транслокация между хромосомами 9 и 22 t(9;22) (q34; q11) ведет к образованию так называемой Филадельфийской (Ph) хромосомы, на молекулярном уровне экспрессирующей гибридный (химерный) ген BCR/ABL. Этот ген кодирует протеин с повышенной тирозинкиназной активностью и трансформирующей способностью. По нашим данным и данным литературы, Ph-хромосома обнаруживается у 90–95% больных с хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ), у 25% взрослых пациентов с ОЛЛ и у 3–5% детей с ОЛЛ. Примерно в 1% случаев ОМЛ также бывают BCR/ABL позитивными. Приблизительно в 70% Ph-позитивных случаев ОЛЛ точка разрыва в гене BCR на 22 хромосоме лежит в регионе m-bcr, что ведет к экспрессии p190 белка, реже — в регионе M-bcr, что соответствует белку p210. Белки p190 и p210 имеют тирозинкиназную активность, которая вызывает трансформацию гематопозитических клеток. Пациенты с ОЛ и экспрессией BCR/ABL имеют неблагоприятный прогноз. У детей с ОЛЛ выявление гена BCR/ABL обычно ассоциируется с более старшим возрастом, пре-B иммунофенотипом, высоким лейкоцитозом и более частым лейкемическим поражением ЦНС.

В исследованиях методом «гнездной» ПЦР химерный ген BCR/ABL был выявлен у 3 (4,6%) пациентов с первичным ОЛЛ (данные РНПЦ детской онкологии и гематологии). На момент обследования пациентам было 5 лет (с иммунофенотипом Common B-ОЛЛ), 6 и 13 лет (пре-B-ОЛЛ).

Молекулярно-генетическими методами химерный ген TEL/AML1, образованный в результате транслокации t(12;21)(p13; q22), определяется у 18,9–28,9% детей с ОЛЛ. Ген TEL на хромосоме 12p13 кодирует ДНК-связывающий белок, ген AML1 на хромосоме экспрессирует белок-транскрипционный фактор (активатор) различных гематоспецифических генов. Стандартными цитогенетическими методами эта аберрация диагностируется менее чем у 0,05% детей с ОЛЛ. Транслокация является наиболее частой аберрацией В-линейного ОЛЛ у детей. Встречается у пациентов в возрасте 1–12 лет с ОЛЛ (более чем в 76% — в возрасте 1–5 лет), характеризуется пре-В иммунофенотипом с коэкспрессией миелоидных маркеров (CD13, CD33 или CDw65). Присутствие гена TEL/AML1 ассоциируется с хорошим прогнозом, однако транскрипт гена может быть выявлен у пациентов в рецидиве. В собственных исследованиях ген TEL/AML1 обнаружили у 5 (13,2%) детей с ОЛЛ. Пациенты были в возрасте 4–12 лет, лейкозные клетки во всех случаях характеризовались В-линейным иммунофенотипом.

Структурные изменения, связанные с хромосомой 11q23, — наиболее часто встречающиеся цитогенетическая аномалия при лейкозах. Они обнаруживаются примерно у 80% детей с ОЛЛ, в 5% случаев ОМЛ и в 85% случаев при рецидивах лейкозов у пациентов, прошедших курс терапии ингибиторами топоизомеразы II. Основные нарушения при этом затрагивают ген MLL, который кодирует белок с молекулярной массой 431 kDa, являющийся транскрипционным фактором. Важную роль MLL подтверждает экспрессия гена почти во всех исследованных тканях. Наиболее частой абберацией, затрагивающей ген MLL, является  $t(4;11)(q21; q23)$  с образованием химерного гена MLL/AF4. Транслокация встречается в 2–5% случаев детского ОЛЛ, главным образом, у детей до года и характеризуется про-B иммунофенотипом (CD10 негативным) с частой коэкспрессией миелоидных маркеров и низкой выживаемостью больных. В собственных исследованиях ген MLL/AF4 был выявлен у 1 больного в возрасте 16 лет с про-B-ОЛЛ.

Одна из наиболее часто цитогенетически определяемых транслокаций у детей с ОЛЛ —  $t(1;19)(q23; p13)$ , которая присутствует почти в 6% случаев В-линейных ОЛЛ, преимущественно пре-B фенотипа (25%). В результате транслокации транскрипционный домен E2A гена на хромосоме 19 сливается с геном PBX1 на 1 хромосоме. Химерный ген E2A/PBX1 является сильным транскрипционным активатором. Методом ПЦР ген E2A/PBX1 можно определять у пациентов с нормальным кариотипом. Пациенты с  $t(1;19)(q23; p13)$  имеют очень неблагоприятный прогноз. Для них требуется применение более агрессивной химиотерапии, что позволяет считать определение гена E2A/PBX1 важным для правильного выбора тактики лечения.

T-линейные и B-линейные ОЛЛ характеризуются также транслокациями, включающими гены рецепторов соответственно T-клеток (TCR) и иммуноглобулинов (Ig). При B-клеточных ОЛЛ и лимфоме Беркитта в транслокацию часто вовлекается MYC ген, что приводит к трансформации клеток. В большинстве случаев при t(8;14)(q24; q32) MYC ген сливается с локусом тяжелой цепи иммуноглобулинов. В остальных случаях гены каппа (2p12) либо лямбда (22q11) легких цепей на хромосоме 8 сливаются с MYC в результате транслокаций t(2;8)(p12; q24) и t(8;22)(q24; q11). Выявление методом ПЦР реаранжировки TCR/B (7q34) и особенно TCR/D (14q11) имеет значение для определения клоногенности лейкозных клеток.

## **4.2. Молекулярная биология генов при ОМЛ**

Образование химерного гена AML1/ETO, соответствующего транслокации t(8;21)(q22;q22), — наиболее часто встречающаяся генетическая поломка при ОМЛ. Она выявляется у 15–18% взрослых больных и примерно у 6% больных детей и чаще всего ассоциируется с ОМЛ-M2, реже с M1 и крайне редко – с другими субтипами миелолейкозов. Результатом транслокации является слияние гена AML1 (CBFa) на хромосоме 21q22 с геном ETO на хромосоме 8q22. Белковый продукт гена AML1 является транскрипционным фактором (активатором) для различных гематоспецифичных генов: GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора), CSF1R (рецептора моноцитарного колониестимулирующего фактора), TCRb (комплекса генов рецепторов Т-лимфоцитов), миелопероксидазы и др. Механизм трансформирующей способности AML1/ETO связывают с его подавлением нормального гена AML1, определяющего нормальное созревание и дифференцировку гемопоэтических клеток. Выявление гена AML1/ETO при ОМЛ обычно ассоциируется с хорошим ответом на химиотерапию и длительной ремиссией. Метод ПЦР выявляет транскрипт гена AML1/ETO у всех пациентов с цитогенетической t(8;21) при ОМЛ. С помощью ОТ-ПЦР обнаруживают дополнительно 5–10% AML1/ETO-позитивных пациентов с цитогенетически отсутствующей t(8;21).

В наших исследованиях ген AML1/ETO был выявлен у 9 больных с ОМЛ: у 6 (66,7%) с диагнозом ОМЛ-М2, у одного с ОМЛ-М0, у одного с ОМЛ-М1 и у одного с ОМЛ-М4. При интерпретации данных молекулярно-биологического исследования этого гена следует иметь в виду, что химерный транскрипт, согласно литературным данным, может быть обнаружен у пациентов спустя 10 лет после наступления полной морфологической и цитогенетической ремиссии и даже у больных после аллогенной трансплантации костного мозга. Это требует использования количественной методики учета экспрессии данного гена при мониторинге заболевания.

Транслокация t(15;17)(q22q11.2) и соответствующий ей химерный ген PML/RARa неизменно ассоциируется с острым промиелоцитарным лейкозом (М3) и регистрируется с частотой 5% у взрослых и 3–10% у детей. Транслокация встречается также при бластном кризе ХМЛ, но никогда — при других лейкозах и солидных опухолях. При транслокации происходит объединение гена промиелоцитарного лейкоза (PML) на хромосоме 15 с геном рецептора ретиноевой кислоты  $\alpha$  (RARa) на хромосоме 17. Белок — продукт химерного гена — выступает как ингибитор функции RARa, определяющего дифференцировку миелоидных клеток под действием ретиноевой кислоты. Все случаи ОПЛ проявляются вовлечением гена RARa, хотя встречаются редкие варианты ОПЛ (морфологически атипичные) со слиянием RARa с геном PLZF — при t(11;17) и с геном NPM — при t(5;17). Из них более значительной является t(11;17), которая формирует лейкоз, устойчивый к лечению ретиноевой кислотой. В собственных исследованиях мы обнаружили ген PML/RARa у всех первичных больных с диагнозом ОПЛ.

Возможности ПЦР при ОПЛ определяют как быструю и точную диагностику, так и мониторинг минимальной резидуальной болезни. Длительное выживание пациентов ассоциируется с отсутствием PML/RARa транскрипта, а позитивный результат в ПЦР, выявленный после молекулярно-генетической ремиссии, предсказывает ранний рецидив.

Из других генетических нарушений, выявляемых с помощью ПЦР, следует упомянуть инверсию 16 хромосомы 4 inv(16) и ее вариант — транслокацию t(16;16)(p13; q22). Данные аберрации диагностируются при ОМЛ-М4Ео с эозинофилией в костном мозге, встречаются при ОМЛ-М4 без эозинофилии, а также других подтипах лейкозов: ОМЛ-М2, -М5, -М1, -М6, -М7, а также при МДС и бластном кризе ХМЛ. У большинства больных наблюдают inv(16) и только у некоторых — делецию del(16)(q22) или транслокацию t(16;16) (p13; q22). Точка разрыва на q плече хромосомы при инверсии находится там же, где и при делеции, — q22, точка разрыва на p плече локализована на p13. Молекулярно-генетические исследования показали, что химерный ген образуется при слиянии CBFB гена на q плече и MYH11 гена на p плече (Потапнев М.П., Зобнин В.Д., 1992; Сергеев А.Г. и др., 2000). CBFB кодирует белок, который является субъединицей белкового ДНК-связывающего комплекса — CBF (также называемого РЕВР2), преимущественно выявляемого в Т-клетках. Ген MYH11 кодирует белок тяжелой цепи миозина. Белок — продукт химерного гена — выступает в роли доминантного активатора генов транскрипционных факторов. Описано не менее восьми различных типов транскриптов гена CBFB/MYH11. Клиническое течение заболевания у детей с inv(16) не отличается от пациентов других групп, но отмечается более высокий риск лейкозного поражения ЦНС. По нашим данным, выявление данного гена характерно для ОМЛ-М4.

Таким образом, использование метода ПЦР позволяет решать задачи диагностики заболевания и мониторинга молекулярных маркеров острого лейкоза после окончания лечения. Наш опыт молекулярной генодиагностики свидетельствует о целесообразности скринингового обследования на присутствие химерного гена BCR/ABL у всех пациентов с ОЛЛ и ОМЛ (M1 и M2 вариантов). Ген TEL-AML1, продукт скрытой транслокации t(12;21) наиболее часто выявляется (в 15% случаев) у больных с первичным В-линейным ОЛЛ. У взрослых больных t(12;21) обнаруживается в 20–25% случаев. Диагностика гена MLL-AF4, продукта транслокации t(4;11), показана у больных с цитогенетически выявленной t(4;11) и диагнозом ОЛЛ.

Большинство прогностически важных хромосомных aberrаций при острых нелимфобластных лейкозах специфично для отдельных морфологических подклассов. Поэтому контингент обследуемых на наличие гена AML1/ETO ограничен пациентами с ОМЛ-M1, -M2, -M4; гена PML/RAR α — пациентами с ОМЛ-M3; гена CBFB/MYH11 — пациентами с ОМЛ-M4 и -M5.

## ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ПРИЗНАКИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ У ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ

Анализ клинической симптоматики и результатов лабораторных исследований при ОЛ у детей и взрослых позволил выявить их характерные отличительные признаки (табл. 13).

ОЛЛ наиболее распространен среди детей и в юношеском возрасте, у взрослых встречается реже. По результатам наших исследований, частота выявления ОЛЛ у детей в структуре ОЛ составила 73,9%, у взрослых — 29%. Это соответствует литературным данным: ОЛЛ у детей имеет место в 80% случаев ОЛ, у взрослых — в 25–30% (Ковалева Л.Г., 1990; Pui Ch.-H., Crist W.M., 1999). Иммунофенотипическая характеристика ОЛЛ выявила преобладание В-линейных фенотипов как у взрослых, так и у детей. С одинаковой частотой наблюдались Т-линейные ОЛЛ, что согласуется и с данными литературных источников (Pui Ch.-H., Crist W.M., 1999). Среди детей Т-ОЛЛ был более характерен для старшего возраста.

## Основные различия острых лейкозов у детей и взрослых

Типы ОЛ и их признаки	Частота (%)	
	дети	взрослые
ОЛЛ	73,9	19,0
<i>из них:</i>		
— пре-B-ОЛЛ	45,2	88,9
— T-линейные ОЛЛ	14,8	11,1
— L1	76,0	11,1
— L2	24,0	77,8
ОМЛ	24,3	78,0
<i>из них:</i>		
— M4	35,0	10,8
— M1	20,0	47,3
ЛАП при ОЛЛ	48,6	89,0
Лейкоциты в периферической крови $> 20 \times 10^9/\text{л}$	37,0	55,6
Гипердиплоидия	25,0–30,0	5,0
t(9;22) при ОЛЛ	5,0–10,0	25,0–30,0
t(12;21) при ОЛЛ	18,9- 28,9	3,0–4,0

Морфология лимфобластов у детей в большинстве случаев (76%) представлена L1, у взрослых преобладает вариант L2 (77,8%), что в целом соответствует приводимым в литературе данным (Кисляк Н.С., 1980; Pui Ch.-H., Crist W.M., 1999). Наличие L2 лимфобластов у взрослых сочетается с неблагоприятным прогнозом ОЛЛ, что указывает на более тяжелое течение ОЛЛ и высокий процент развития рецидивов заболевания.

ОМЛ является наиболее распространенным вариантом среди ОЛ у взрослых. В наших исследованиях он составлял 81% всех случаев ОЛ, что согласуется и с данными литературы (Кисляк Н.С., 1980; Weinstein H.J. et al., 1983). Частота ОМЛ в детском возрасте увеличивается по мере роста ребенка, достигая максимума у взрослых. В структуре ОМЛ в детском возрасте преобладал М4 вариант (35%), в то время как у взрослых — М1 (47,3%). Согласно литературным источникам, М1 вариант ОМЛ наиболее распространен у взрослых и составляет 50–60% случаев (Кисляк Н.С., 1980).

Из клинических симптомов при ОЛЛ у 89% взрослых наблюдалась лимфаденопатия, которая у детей имела место только в 48,6% случаев. По данным литературы, лимфаденопатия при ОЛЛ у взрослых отмечается в половине случаев и характеризуется увеличением периферических лимфатических узлов, причем у  $\frac{1}{4}$  больных гиперплазия достигает значительной степени, а в 50% случаев в процесс вовлекаются бронхопульмональные и паратрахеальные лимфатические узлы (Кисляк Н.С., 1980). Поражение бронхопульмональных и паратрахеальных лимфатических узлов выявляется только у 10% детей с ОЛЛ (Pui Ch.-H., Crist W.M., 1999).

Гепатомегалия, спленомегалия и другие клинические признаки ОЛ встречаются одинаково часто как у детей, так и взрослых. Анемический и тромбоцитопенический синдромы при исследовании периферической крови не имеют существенных различий в клинике у детей и взрослых. Однако при анализе содержания лейкоцитов выявлено, что в детском возрасте при установлении диагноза ОЛ этот показатель в большинстве случаев (63%) не превышает значений  $20 \times 10^9/\text{л}$ , в то время как у взрослых чаще наблюдается гиперлейкоцитоз (свыше  $50 \times 10^9/\text{л}$ ).

Анализ результатов молекулярно-биологических и цитогенетических исследований при ОЛ у детей и взрослых, показал, что в детском возрасте чаще наблюдается гипердиплоидия хромосом (25–30%), что ассоциируется с хорошим прогнозом. Цитогенетическое исследование клеток при ОЛ у взрослых гипердиплоидию выявило только в 5% случаев. Ген BCR/ABL и транслокация t(9;22) обнаружены только у 4,8% больных детей с ОЛЛ, в то время как у взрослых — у 25–30%, что согласуется с данными литературы. Ген TEL/AML1, соответствующий транслокации t(12;21), выявлен нами у детей с ОЛЛ в 15% случаев. У взрослых, по данным литературы, его частота при ОЛЛ не превышает 3–4%.

Установление диагноза ОЛ требует проведения комплекса клиничко-лабораторных исследований, что позволит правильно и своевременно назначить комплексную полихимиотерапию. Ниже мы приводим алгоритм диагностики ОЛ у детей и взрослых.

