

На правах рукописи

Ермаков Георгий Александрович

**ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕТЕЙ
АМУРСКОЙ ОБЛАСТИ С ИНФЕКЦИОННЫМИ
ОСЛОЖНЕНИЯМИ ГЕМОБЛАСТОЗОВ - ОСТРОГО
ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА И
ЛИМФОГРАНУЛЕМАТОЗА**

14.00.36 – аллергология и иммунология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Екатеринбург – 2009

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Амурская государственная медицинская академия» РОСЗДРАВА, г. Благовещенск.

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор

Чубенко Г.И.

Доктор медицинских наук, профессор

Тузанкина И.А.

Официальные оппоненты

Доктор медицинских наук, доцент

Гусев Е.Ю.

Доктор медицинских наук, доцент

Войцеховский В.В.

Ведущая организация - НИИ клинической иммунологии СО РАМН,
г.Новосибирск

Защита диссертации состоится «24» ноября 2009г. в 10-00 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 004.027.01 при учреждении РАН Институте иммунологии и физиологии УрО РАН: 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, д. 106.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН по адресу: 620041, г.Екатеринбург, ул.Софьи Ковалевской / Академическая, 22/20, с авторефератом – на сайте учреждения РАН ИИФ УрО РАН: <http://www.iip.uran.ru>.

Автореферат разослан «15» октября 2009 г.

Ученый секретарь совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций,
доктор медицинских наук, профессор

И.А.Тузанкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проведенного исследования продиктована значительным ростом уровня заболеваемости гемобластозами среди детского населения. По данным статистических отчетов Министерства здравоохранения и социального развития РФ общая заболеваемость болезнями крови и кроветворных органов в России за период 1993-2003гг, увеличилась с 1141,2 до 4015,7 на 100 тыс. населения. Известно, что инфекция – одно из наиболее частых осложнений гемобластозов. Тяжёлые инфекционные осложнения в 59,4-75,3% случаев являются основной причиной летальных исходов при лейкозах у детей (Ковалева Л.Г., 1990; Алейникова О.В, 1997; Урмаева М.М., 1999).

Развитие синдрома системной воспалительной реакции, рассматриваемого по данным В.А.Черешнева, Е.Ю.Гусева с соавторами (2004) как составляющей интегрального процесса – системного воспаления, на фоне полихимиотерапии у детей встречается достаточно часто (Урмаева М.М., 1999). Восприимчивость пациентов с гемобластозами к инфекциям объясняется различными причинами: нейтропенией, количественным и качественным угнетением фагоцитоза, функциональными изменениями клеточных факторов иммунитета, снижением продукции иммуноглобулинов, нарушением целостности защитных барьеров, подавлением нормальной флоры (Голосова Т.В. с соавт.,1980; Ковалева Л.Г., 1990; Athens J.W., 1993; Урмаева М.М., 1999).

Химиотерапия препаратами, обладающими цитотоксическим действием, также определяет повышенную восприимчивость детей с гемобластозами к различным видам инфекции. Нередко присоединению инфекции способствует применение инвазивных лечебных и диагностических процедур, которые достаточно широко используются в гематологической практике (Pizzo P.A., 1993; Tsutsumi H., 1996; Самочатова Е.В. с соавт., 1996; Дмитриева Н.В. с соавт., 1996; Паровичникова Е.Н. и соавт., 1998; Урмаева М.М. с соавт., 1999).

В связи с этим, изучение структуры и частоты возникновения гемобластозов, а также оценка эффективности иммунологической защиты у детей Амурской области с инфекционными осложнениями наиболее часто встречающихся гемобластозов – острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) и лимфогранулематоза (ЛГМ) может способствовать определению адекватной стратегии терапии и улучшению прогноза заболевания.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: оценить состояние иммунитета у детей Амурской области при развитии инфекционных осложнений острого лимфобластного лейкоза и лимфогранулематоза, с учетом нозологической формы гемобластоза и этиологической структуры инфекционного процесса.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:

1. Провести анализ структуры заболеваемости гемобластозами детей в Амурской области за десятилетний период с 1996 г.
2. Провести анализ характера инфекционных осложнений у детей с гемобластозами в Амурской области за десятилетний период с 1996г.
3. Оценить этиологический спектр инфекционных осложнений ОЛЛ и ЛГМ у детей, проживающих в Амурской области.
4. Провести сравнительный анализ иммунологических данных у детей Амурской области с ОЛЛ и ЛГМ.
5. Выявить диагностические признаки иммунодефицитных состояний у детей с ОЛЛ и ЛГМ в Амурской области и оценить прогностическую значимость определяемых иммунологических параметров в отношении развития инфекционных осложнений.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ

Выявлены изменения структуры гемобластозов детского возраста в Амурской области за десятилетний период с 1996 г.

Впервые проведена оценка этиологического спектра инфекционных осложнений ОЛЛ и ЛГМ у детей Амурской области и выявлены отличия в этиологии инфекционных осложнений при данных нозологиях.

Впервые проведен сравнительный анализ иммунологических данных у детей с ОЛЛ и ЛГМ в Амурской области, с учетом нозологической формы гемобластоза и этиологической структуры инфекционного процесса.

Впервые определен характер иммунодефицитных состояний у детей с инфекционными осложнениями ОЛЛ и ЛГМ в Амурской области.

Впервые определена прогностическая значимость параметров цитокинового профиля в отношении развития инфекционных осложнений у детей с ОЛЛ, проживающих в Амурской области.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Значимость исследований подчеркивается растущей заболеваемостью детей гемобластозами в Амурской области.

Теоретическая значимость работы состоит в получении новых данных о состоянии систем защиты организма детей при развитии инфекционных процессов, осложняющих течение гемобластозов, а также о спектре причинно-значимых инфекционных агентов у них.

Практическую значимость составляет получение обоснований для расширения диагностического диапазона методами оценки иммунных нарушений у детей с гемобластозами, позволяющих прогнозировать появление инфекционных осложнений.

Результаты исследования обосновывают использование в качестве дополнительных критериев диагностики при различных гистологических вариантах ЛГМ параметры CD16+, CD3+, CD19+лимфоцитов и соотношение CD3+/CD19+лимфоцитов.

Полученные факты снижения концентрации антител IgG-класса, повышения значений метаболической активности нейтрофилов с активизацией их резервных возможностей и изменения соотношения ФНО α /эритропоэтин в сыворотке крови, могут учитываться при прогнозировании развития инфекционных осложнений определённой этиологии.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. В период с 1996 по 2006 гг. произошло увеличение заболеваемости гемобластозами у детей Амурской области за счёт острого лимфобластного лейкоза и лимфогранулематоза.

2. Выявлена зависимость этиологии инфекционных осложнений от специфики изменений иммунологических параметров при ОЛЛ и ЛГМ у детей Амурской области.

3. Инверсия соотношения ФНО α и эритропоэтина у детей с ОЛЛ является прогностически значимым признаком развития инфекции.

4. Смешанно-клеточный гистологический вариант лимфогранулематоза и лимфогранулематоз с нодулярным склерозом у детей характеризуются различными вариантами соотношения CD3+/CD19+субпопуляций лимфоцитов.

ВНЕДРЕНИЕ В ПРАКТИКУ

Разработан и клинически апробирован способ автоматизации измерений при использовании метода непрямой поверхностной иммуофлюоресценции. (РП №1599 01.12.2005).

Подготовлены и внедрены информационное письмо «Клинико-эпидемиологическая характеристика гемобластозов у детей Амурской области», и методические рекомендации «Инфекционные осложнения у детей с гемобластозами».

Результаты проведенного исследования внедрены практическую работу гематологического отделения АОДКБ, учебный процесс ГОУ ВПО Амурской государственной медицинской академии и систему ФПК и ППС АГМА.

АПРОБАЦИЯ ДИССЕРТАЦИИ

Основные положения диссертации доложены на III Российско-китайском фармацевтическом симпозиуме (Харбин, 2006), XIII Всероссийском форуме «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2009), VI, VII региональных научно-практических конференциях «Молодежь XXI века: шаг в будущее» (Благовещенск, 2005, 2006), региональном научно-практическом

обществе аллергологов и иммунологов (Благовещенск, 2007).

Диссертационная работа обсуждена на центральной проблемной комиссии ГОУ ВПО Амурской ГМА, а также апробирована и обсуждена на заседании проблемной комиссии по аллергологии и иммунологии учреждения РАН ИИФ УрО РАН.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ, из которых 3 - в изданиях, рекомендованных ВАК.

СТРУКТУРА И ОБЪЁМ ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, трех глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Работа содержит 25 таблиц и 11 рисунков. Список литературы включает 217 источников, в том числе 143 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведен анализ историй болезни 364 детей с онкогематологическими заболеваниями, получавших лечение в отделении гематологии Амурской областной детской клинической больницы (АОДКБ) за период с 1996-2006 гг. Инфекционные осложнения в данной группе регистрировались неоднократно и в итоге составили 615 случаев.

Выполнена оценка состояния иммунитета 105 детей, в возрасте от 3 до 17 лет, у которых наблюдался 191 эпизод острых инфекционных осложнений на момент госпитализации в гематологическое отделение АОДКБ.

Клинико-лабораторные данные детей в возрасте от 3 до 17 лет, отнесенных по результатам профилактического осмотра к условно здоровым, проживающих на территории Амурской области, были расценены как нормативные. Они составили контрольную группу, которая включала 3 возрастных подгруппы: от 3 до 7 лет; от 8 до 14 лет; от 15 до 17 лет - по 10

человек каждая, однородность которых подтверждена математическими методами проверки.

В исследуемую группу включены дети с гемобластозами. Из них с острым лимфобластным лейкозом, В-линейным – 71 ребенок, с лимфогранулематозом (ЛГМ) – 19 человек, с лимфосаркомой – 5, с лимфомой – 10 детей. Таким образом, наиболее многочисленными были группы детей с ОЛЛ ($67,62 \pm 8,45$) и ЛГМ ($18,10 \pm 2,26$), которые в дальнейшем анализировались более детально. Исследование цитокиновых параметров проводили у 43 детей с диагнозом ОЛЛ и 11 детей с ЛГМ.

Иммунологические исследования у детей с гемобластозами проводились с учетом этапа лечения:

1 этап – период диагностики заболевания до начала терапии (46 детей);

2 этап – период полихимиотерапии (71 ребенок);

- подгруппа 1 – индукция ремиссии;

- подгруппа 2 – постиндукционные курсы химиотерапии;

3 этап – через 6 месяцев после завершения курсов химиотерапии, стадия ремиссии (105 детей).

В первую группу вошли дети с впервые выявленным гемобластозом. Иммунологическое исследование этой группы проведено в комплексе диагностических мероприятий до начала полихимиотерапии.

Вторая группа включала детей на этапах полихимиотерапии (ПХТ) или комбинированной терапии (ПХТ + лучевая терапия). В неё вошли дети с впервые диагностированным гемобластозом, получающие курсы ПХТ или курсы комбинированной терапии (ПХТ + лучевая терапия), а также дети, бывшие в ремиссии, имеющие в анамнезе рецидив гемобластоза и получившие повторные курсы ПХТ.

Третья группа включала детей, получивших курсы ПХТ, имеющих клиничко-гематологическую ремиссию и находящихся на ежегодном

обследовании с целью ранней диагностики. Исследования в данной группе проводились через 6 месяцев после завершения ПХТ.

Проанализированы анамнестические данные, наследственность, пол, возраст, район проживания, особенности развития ребенка, динамика основного заболевания, перенесенные инфекционные осложнения гемобластоза.

Материалом для исследования служили: первичная медицинская документация, истории болезней, стационарные журналы гематологического отделения АОДКБ, амбулаторные карты пациентов, данные годовых отчетов по заболеваемости и смертности детей с гемобластозами в Амурской области, а также опубликованные данные в целом по России.

В качестве биологических материалов исследовали костный мозг, периферическую кровь, сыворотку крови, смывы из рото- и носоглотки, отделяемое раневых поверхностей, биологические выделения.

Иммунологическое исследование включало определение параметров гемограммы на гемоанализаторе «Pentra-60», субпопуляций CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CD16+ CD25+ лимфоцитов методом непрямой поверхностной иммунофлюоресценции. Состояние гуморальных параметров иммунитета определяли, оценивая концентрацию основных классов сывороточных А, М, G методом радиальной иммунодиффузии по G.Manchini и методом ИФА с применением диагностических тест-систем «Ig-ИФА Бест стрип 12?8 (ТМБ)», производства «Вектор-Бест». Исследование концентрации цитокинов в плазме крови (ФНО α и эритропоэтина) проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием реактивов, производства «BIOSOURCE». Фагоцитарную и метаболическую активность нейтрофилов оценивали в опсоно-фагоцитарной реакции и НСТ-тесте.

Выделение и идентификация возбудителей инфекций проводилась общепринятыми микробиологическими методами, согласно приказу № 535 от 22 апреля 1985 г. «Об унификации микробиологических (бактериологических)

методов исследования, применяемых в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» и международным определителем Bergey (2002). Микологическое исследование дополняли методом селективной изоляции дрожжей с использованием среды Candiselect 4 и твердофазным ИФА с определением сывороточных антител IgG-класса к грибам родов *Candida* и *Aspergillus*.

Антигены вирусов гепатитов В и С, а также сывороточные антитела классов IgG и IgM к ВПГ – 1,2 и ЦМВ определяли методом ИФА с применением диагностических тест-систем производства «Вектор-бест».

Статистический анализ работы выполнен на персональном компьютере с использованием разработанных для этого класса задач статистических программ Microsoft Excel и Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных за период с 1996-2006 гг., позволил выявить увеличение числа детей, больных гемобластозами в Амурской области в 1,4 раза, количество которых составило 0,0708 на 1000 чел. детского и подросткового населения (рис.1).

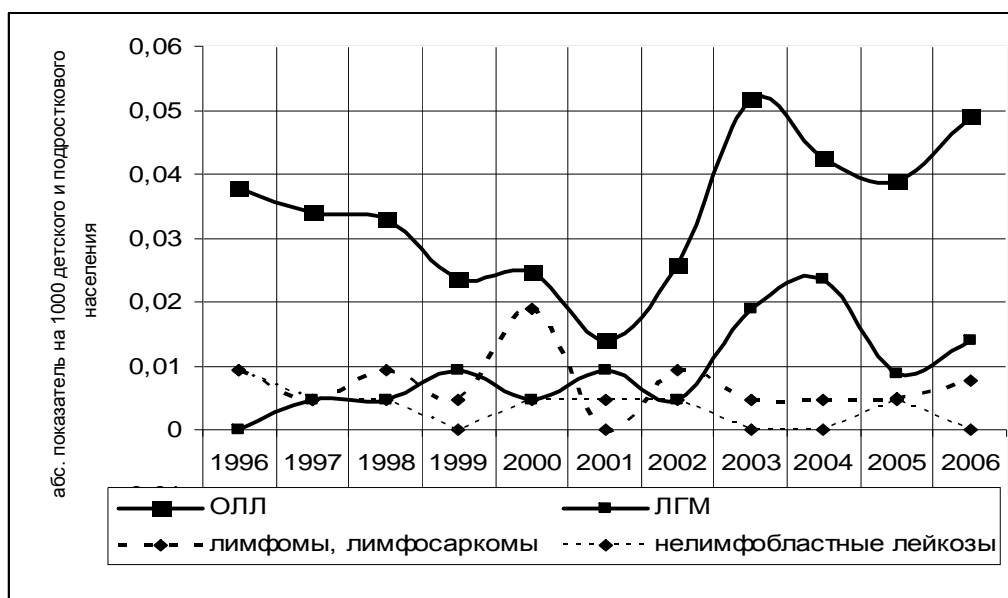


Рисунок 1 - Первичная заболеваемость гемобластозами детей Амурской области за период 1996-2006 гг.

Примечание. ОЛЛ - острый лимфобластный лейкоз, ЛГМ – лимфогранулематоз.

Преобладающей нозологической формой в структуре гемобластозов у детей за этот период в Амурской области являлся острый лимфобластный лейкоз. Достоверное увеличение заболеваемости детей лимфогранулематозом (ЛГМ) отмечено в период с 2003 по 2006 гг.

Таким образом, ЛГМ стал вторым по частоте встречаемости заболеванием, среди гемобластозов у детей.

За исследуемый период (с 1996 по 2006 гг.) наибольшая заболеваемость гемобластозами регистрировалась в северных районах Амурской области: Зейском, Сковородинском, Магдагачинском, Тындинском. Высокая летальность при гемобластозах выявлена у детей, проживавших в Ромненском, Шимановском и Бурейском районах. Сковородинский, Магдагачинский, и Шимановский районы расположены вдоль реки Амур, являющейся пограничной территорией с КНР.

При исследовании возрастных особенностей гемобластозов выявлено, что возраст от 1,1 до 2,5 лет оказался критическим в отношении заболеваемости острыми нелимфобластными лейкозами. Нозологические формы, такие как лимфосаркома, хронический миелолейкоз наблюдались преимущественно у детей в возрасте от 4 до 5,5 лет. Критическим в отношении заболеваемости ОЛЛ и ЛГМ оказался возраст 9-14 лет.

Для В-клеточного варианта ОЛЛ и В-клеточных лимфом было характерно преобладание девочек (64% и 82% соответственно). Среди детей, заболевших ЛГМ, преобладали мальчики (75%).

Из всех инфекционные осложнения (ИО) большую часть занимали локализованные формы – 95,7%. При ЛГМ достоверно чаще встречались синуситы, фарингиты, стоматиты. При ОЛЛ – доминировали трахеиты, бронхиты, пневмонии, инфекции мочеполовой системы, язвенно-некротический колит. На долю генерализованных инфекций приходилось 4,3% случаев от их общего числа, частота которых при ОЛЛ была несколько ниже (в 1,2 раза), чем при ЛГМ.

Согласно первичным медицинским документам за десятилетний период сепсис развился только у 12 детей с ОЛЛ (1,95% от всех случаев гемобластозов) и у 14 детей с ЛГМ (2,28%). Доля сепсиса среди инфекционных осложнений у детей с ОЛЛ и ЛГМ была несколько выше, составив 4,23%. Среди заболеваний респираторного тракта при всех гемобластозах доминировали пневмонии (2,9% случаев) и фарингиты - 19,2% случаев (таблица 1).

Таблица 1 - Частота инфекционных осложнений у детей с гемобластозами в отделении гематологии за период 1996-2006 гг.

Инфекционные осложнения	Нозологические формы гемобластозов у детей					
	ОЛЛ		ЛГМ		ИТОГО	
	п	% от всех случаев ИО	п	% от всех случаев ИО	п	%
Генерализованные						
Сепсис (согласно критериям АССР/СССМ (1992))	12	46,15	14	53,85	26	100
Всего	12	1,95	14	2,28	26	4,23
Локализованные						
Инфекции респираторного тракта	98	37,2	148	40,1	246	39,9
Фарингит	36	13,7	82	23,2*	118	19,2
Синуситы	11	4,2	32	9,1*	43	7,0
Трахеит/бронхит	35	13,3*	32	9,1	67	10,9
Пневмония	16	6,1*	2	0,6	18	2,9
Инфекции пищеварительного тракта	111	42,2	162	43,9	273	44,3
Стоматит	64	24,3	123	34,8*	187	30,4
Энтериты	47	17,9*	39	11,0	86	14,0
Язвенно-некротический энтероколит	4	1,5	2	0,6	6	1,0
Инфекции мочеполовой системы	35	13,3*	32	9,1	67	10,9
Абсцессы мягких тканей	15	5,7*	9	2,5	24	3,9
Всего	263	38,37	353	57,4	589	95,77
Общее количество случаев инфекционных осложнений за 1996-2006 гг.					615	100

Примечание. *- $p < 0,05$ уровень достоверности различий между показателями частоты инфекционных осложнений при ОЛЛ и ЛГМ; ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз; ЛГМ – лимфогранулематоз; ИО - инфекционные осложнения ОЛЛ и ЛГМ; п - количество случаев инфекционных осложнений у детей с ОЛЛ и ЛГМ за период 1996-2006 гг.; % - процент генерализованных и локализованных инфекционных осложнений у детей в зависимости от основного заболевания: ОЛЛ или ЛГМ за период 1996-2006 гг.

Среди заболеваний пищеварительного тракта первое место занимали стоматиты (30,4%), второе – энтериты (14,0%), в 1,0% случаев регистрировался язвенно-некротический энтероколит.

Таким образом, частота развития ИО при ОЛЛ и ЛГМ не имела достоверных отличий и была сопоставима при обеих нозологиях.

Для выяснения этиологической структуры инфекционных осложнений за трехлетний период с 2004 г. было обследовано 105 детей с гемобластозами. Проводилось микробиологическое исследование материала больных с последующим выделением и идентификацией чистой культуры возбудителя.

Результаты исследований свидетельствовали о том, что в структуре инфекционных осложнений при различных формах гемобластозов преобладали инфекции, вызванные грибами родов *Candida* и *Aspergillus* – 52,1% случаев от всех инфекционных осложнений.

При ОЛЛ представители рода *Candida* идентифицированы в 62,77%, а при ЛГМ в 71,4% от всех ИО грибковой этиологии. У большинства пациентов инфекционные осложнения микотической природы проявлялись в виде поражения пищеварительного и респираторного тракта. При ОЛЛ, в качестве этиологических агентов были идентифицированы *C. glabrata* и *C. krusei*, которые не выделялись при ЛГМ (таблица 2).

Таблица 2 - Частота выявления возбудителей грибковых инфекций у детей с ОЛЛ и ЛГМ

Грибы-возбудители инфекционных осложнений	Нозологические формы гемобластозов			
	ОЛЛ		ЛГМ	
	Кол-во штаммов	%	Кол-во штаммов	%
<i>Aspergillus</i> spp.	14	37,84*	2	28,57*
<i>A. fumigatus</i>	12	32,43	2	28,57*
<i>A. flavus</i>	2	5,4	0	0
<i>Candida</i> spp.	23	62,16	5	71,4
<i>C. albicans</i>	12	32,43*	4	57,14*
<i>C. tropicalis</i>	4	10,81*	1	14,29*
<i>C. glabrata</i>	4	10,81*	0	0
<i>C. krusei</i>	3	8,11*	0	0
ИТОГО	37		7	

Примечание. *- $p < 0,05$ уровень достоверности различий между показателями частоты встречаемости различных штаммов микроорганизмов при ОЛЛ и ЛГМ; ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз; ЛГМ – лимфгранулематоз; n-количество случаев высева, % - процент случаев высева групп возбудителей или отдельных их видов от общего количества случаев высева в группах детей с ОЛЛ или ЛГМ.

При лимфогранулематозе выделялись *A.fumigatus*, *C.albicans*, *C. tropicalis*. Различия этиологического спектра грибковых осложнений при ОЛЛ и ЛГМ могут быть обусловлены иммунными нарушениями на различных уровнях регуляции. При ОЛЛ страдает центральное звено иммунопоза в костном мозге, что обуславливает многоуровневость иммунных нарушений и даёт возможность активизации условно – патогенных грибов *Candida*, *Aspergillus*.

Инфекции, в этиологии которых фигурировали бактериальные возбудители, были выявлены в 47,5% случаев. Ведущее место в структуре бактериальных инфекций занимали представители грамположительной микрофлоры родов *Streptococcus* (*Str.viridans* – 14,29%) и *Staphylococcus* (*Staph.epidermidis* – 15,31%) (таблица 3).

Таблица 3 - Структура высевов бактериальных возбудителей из инфекционных очагов и крови при инфекционных осложнениях у детей с ОЛЛ и ЛГМ

Бактерии возбудители инфекционных осложнений	Нозологические формы гемобластозов					
	ОЛЛ		ЛГМ		ИТОГО	
	n	%	n	%	n	%
<i>Streptococcus</i> spp.	24	24,49*	18	16,33	42	21,77
<i>Str.viridans</i>	14	14,29	7	14,29	21	14,29
<i>Str.pyogenes</i>	8	8,16	7	14,29*	15	10,20
<i>Enterococcus</i> spp.	7	7,14	5	10,20*	12	8,16
<i>Ent. faecalis</i>	7	7,14	5	10,20*	12	8,16
<i>Pseudomonas</i> spp.	5	5,10	2	4,08	7	4,76
<i>P. aeruginosa</i>	4	4,08*	1	2,04	5	3,40
<i>Klebsiella</i> spp.	9	9,18	4	8,16	13	8,84
<i>K. pneumoniae</i>	5	5,10*	1	2,04	6	4,08
<i>Staphylococcus</i> spp.	19	19,33*	7	15,12	26	17,86
<i>Staph.epidermidis</i>	15	15,31*	4	9,0	19	13,1
<i>Staph. aureus</i>	4	4,08	3	6,12*	7	4,76
<i>E. coli</i>	2	2,04	6	12,24*	8	5,44
<i>Acinetobacter</i>	1	1,02*	0	0	1	0,68
Всего...	98	100,00	49	100,00	147	100,00

Примечание. *- $p < 0,05$ уровень достоверности различий между показателями частоты встречаемости различных штаммов микроорганизмов при ОЛЛ и ЛГМ; n – количество случаев высева микроорганизмов с последующей их идентификацией; ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз; ЛГМ – лимфогранулематоз; n-количество случаев высева, % - процент случаев высева групп возбудителей или отдельных их видов от общего количества случаев высева в группах детей с ОЛЛ или ЛГМ.

При ОЛЛ частота выделения грамотрицательной микрофлоры не имела достоверных отличий от грамположительной. При данной нозологической форме выявлена тенденция к преобладанию представителей родов *Klebsiella* и *Pseudomonas* по сравнению с ЛГМ.

При ЛГМ было выявлено достоверное преобладание представителей рода *Escherichia* (12,24%) по сравнению с ОЛЛ (2,04%).

Иммунологические исследования детей с ОЛЛ и ЛГМ на первом этапе выявили дефицит клеточных параметров иммунитета с максимальной выраженностью при ОЛЛ на фоне лейкоцитоза. Абсолютное количество CD19⁺-лимфоцитов при ОЛЛ в 1,2 раза превышало значения в контрольной группе, а при ЛГМ было достоверно снижено в 1,64 раза. Число CD16⁺-лимфоцитов при ОЛЛ не имело достоверных отличий от контрольных значений. При ЛГМ, наоборот, наблюдалось четырехкратное увеличение относительных значений CD16⁺-лимфоцитов на фоне относительного лимфоцитоза.

Острый лимфобластный лейкоз характеризовался дефицитом CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺, CD16⁺-лимфоцитов на фоне абсолютного и относительного лимфоцитоза, повышением СПИ (соотношение CD4⁺/CD8⁺-лимфоцитов), увеличением содержания CD19⁺-лимфоцитов в периферической крови, снижением концентрации антител классов IgA, IgM, IgG и снижением относительного количества фагоцитирующих клеток с дефицитом активности нейтрофилов в НСТ-тесте.

На этапах полихимиотерапии (ПХТ) по протоколу ALL-BMF-90 у пациентов с ОЛЛ наблюдалось снижение клеточных параметров иммунитета (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺, CD16⁺-лимфоцитов). Через шесть месяцев после завершения курсов ПХТ количественного восстановления клеточных параметров не наступало. Наблюдалось увеличение субпопуляционного индекса (СПИ-соотношение CD4⁺/CD8⁺-лимфоцитов) в динамике проводимого лечения у детей с ОЛЛ. В контрольной группе – составил $1,25 \pm 0,17$. В группе

детей с ОЛЛ на первом этапе исследования СПИ составил $1,56 \pm 0,2$, на втором этапе – $1,78 \pm 0,14$, на третьем этапе – $1,89 \pm 0,15$.

Выявлено, что динамика антителопродукции при ОЛЛ и ЛГМ имела сходные тенденции и характеризовалась снижением сывороточных антител классов Ig A, Ig M и Ig G в период проведения полихимиотерапии.

Также определено достоверное преобладание относительных значений CD19+лимфоцитов при ОЛЛ у детей по сравнению с ЛГМ.

Превышение абсолютных значений CD19+лимфоцитов при ОЛЛ через 6 месяцев после завершения полихимиотерапии возможно объясняется тем, что изначально высокие абсолютные значения этих клеток при ОЛЛ были обусловлены выходом бластов на периферию.

Преобладающим гистологическим вариантом ЛГМ в течение 2004-2006 гг. у детей Амурской области являлся смешанно-клеточный вариант. Различия клеточных параметров иммунитета детей, больных ЛГМ, по сравнению с контрольной группой выражались в относительном лимфоцитозе и четырехкратном увеличении относительных значений CD16+лимфоцитов. На втором этапе исследования количество CD8+лимфоцитов сохранялось в пределах исходных значений и, следовательно, менее чем другие субпопуляции были подвержены действию химиопрепаратов во время лечения ЛГМ у детей.

При исследовании гуморальных параметров и фагоцитоза выявлено, что лимфогранулематоз характеризовался снижением сывороточной концентрации антител классов IgA, IgM, IgG и параметров нейтрофильного фагоцитоза.

Иммунологический профиль при смешанно-клеточным варианте ЛГМ характеризовался высокими значениями CD3+лимфоцитов за счет увеличения CD4+ и CD8+лимфоцитов. Соотношение CD3+/CD19+лимфоцитов, при данном варианте составило 4,50 (в контрольной группе – 4,25) из-за сниженных значений CD19+лимфоцитов. ЛГМ с нодулярным склерозом характеризовался низкими значениями соотношения CD3+/CD19+-популяций лимфоцитов, которое приближалось к единице ($1,50 \pm 0,06$).

Результатом проводимой ПХТ у детей с ЛГМ явилось достоверное снижение популяции CD16+лимфоцитов, фагоцитарного числа нейтрофилов и их метаболической активности в НСТ-тесте.

Нами была проведена ретроспективная оценка иммунологических параметров у детей с ОЛЛ и ЛГМ до начала терапии с учетом этиологии развившихся инфекций на этапах ПХТ. Инфекционные осложнения на этапе ПХТ развивались в 100% случаев. За три года иммунологические исследования проведены у 105 детей, имевших 191 эпизод острых инфекционных осложнений за время госпитализации. Иммунный профиль детей с ОЛЛ, осложненным инфекцией, характеризовался снижением количества лейкоцитов за счет CD3+, CD4+, CD8+, CD16+лимфоцитов, дефицитом антител классов IgA, IgM и IgG-классов. Фагоцитарный индекс и активность нейтрофилов в НСТ-тесте были повышены. Резервные возможности нейтрофильных лейкоцитов в НСТ-тесте у детей с ОЛЛ или ЛГМ, осложненными инфекцией, достоверно повышались при ПХТ (*таблица 4*).

Были выявлены различия клеточных параметров иммунитета детей, страдающих ОЛЛ и ЛГМ, в зависимости от этиологии инфекционных осложнений. Дети, у которых в последствии развивались инфекционные осложнения грибковой этиологии, имели достоверный дефицит клеточных факторов иммунитета. Это выражалось низкими абсолютными и относительными значениями CD3+, CD4+, CD8+лимфоцитов ещё до начала полихимиотерапии. Таким образом, имея ввиду, что у детей с ОЛЛ определенное количество лимфоцитов с фенотипом CD3+ и/или CD19+ является бластами, а содержание лейкоцитов и лимфоцитов при этом было ниже контрольных значений, можно констатировать, что у данной группы детей развивался вторичный иммунодефицит, проявлением которого и были манифестные формы инфекций, вызванные грибами рода *Candida*.

На этапе проведения ПХТ относительное содержание лимфоцитов как при ОЛЛ, так и при ЛГМ резко снижалось. В случаях, когда ОЛЛ или ЛГМ

осложнялся грибковыми инфекциями, иммунный профиль у детей до начала терапии характеризовался достоверным снижением клеточных параметров иммунитета.

Таблица 4 - Иммунологические параметры у детей с ОЛЛ и ЛГМ, осложненными инфекциями грибковой и бактериальной этиологии до начала ПХТ

Иммунологические показатели	Контрольная группа (M±m)	ОЛЛ с ИО бактериальной этиологией (M±m)	ОЛЛ с ИО грибковой этиологией (M±m)	ЛГМ с ИО бактериальной этиологией (M±m)	ЛГМ с ИО грибковой этиологией (M±m)
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	6,0±0,32	5,0±1,3*	4,60±1,3*	4,53±0,57*	3,60±0,45*
Лимф.,%	39,50±1,4	42,00±1,6*	25,0±1,6*	22,8±2,85*	33,3±4,16*
Лимф., 10 ⁹ /л	2,37±0,1	2,1±0,08*	1,28±0,1*	1,00±0,13*	1,20±0,15*
CD3+лимф., %	71,0±3,1	60,0±3,2*	66,0±3,2*	25,67±3,21*	28,2±3,53*
CD3+лимф., 10 ⁹ /л	1,70±0,05	1,57±0,2*	0,84±0,9*	0,86±0,11*	0,46±0,06*
CD19+лимф., %	12,50±0,9	10,0±0,04*	8,0±0,04*	4,92±0,62*	3,93±0,49*
CD19+лимф., 10 ⁹ /л	0,40±0,02	0,26±0,01*	0,10±0,01*	0,22±0,03*	0,09±0,01*
CD4+лимф., %	37,0±1,9	36,00±2,1	23,0±2,1	17,60±2,20	11,25±1,41
CD4+лимф., 10 ⁹ /л	0,90±0,04	0,94±0,05	0,29±0,05	0,49±0,06	0,15±0,02
CD8+лимф., %	31,0±1,7	23,00±1,1	22,0±1,1	10,69±1,34	10,23±1,28
CD8+лимф., 10 ⁹ /л	0,75±0,03	0,60±0,02	0,28±0,02	0,33±0,04	0,16±0,02
CD16+лимф.,%	12,50±1,3	11,0±0,43	6,87±0,60	49,93±6,24	31,19±3,90
CD16+лимф., 10 ⁹ /л	0,30±0,01	0,35±0,02	0,21±0,02	0,82±0,10	0,49±0,06
CD25+лимф., %	4,0±0,14	2,0±0,5	0	2,40±0,30	2,40±0,30
СПИ	1,25± 0,17	1,56±0,2	1,04±0,13	1,12±0,14	0,75±0,09
Ig A, г/л	0,91±0,03	0,81±0,01	0,51±0,06	0,88±0,11	0,56±0,07
IgM, г/л	1,25±0,05	0,98±0,02	0,61±0,01	1,77±0,22	1,10±0,14
IgG, г/л	10,22±0,8	9,13±1,01	5,7±0,63	10,67±1,33	6,66±0,83
ФИ, %	63,50±2,1	54,0±3,1	33,7±4,34	29,80±3,73	18,62±2,33
ФЧ, м.т.	4,72±0,2	4,03±0,5	2,5±0,7	5,47±0,68	3,39±0,42
АСП, %	14,13±1,1	14,01±1,6	8,75±2,24	27,27±3,41	17,04±2,13
АСТ, %.	23,90±2,1	25,2±0,1	15,6±0,14	36,59±4,57	22,65±2,83
АСП/АСТ-резервные возможн.	1,67±0,1	1,69	1,69	1,22±0,15	1,22±0,15

Примечание. *- p<0,05 уровень достоверности различий между показателями частоты встречаемости различных штаммов микроорганизмов при ОЛЛ и ЛГМ; АСП – фагоцитарная активность нейтрофилов спонтанная; АСТ - фагоцитарная активность стимулированная.

Концентрация иммуноглобулинов А, М и G-классов максимально страдала при инфекциях грибковой этиологии. У детей, имевших в анамнезе инфекции во время терапевтического курса при ОЛЛ или ЛГМ, восстановление гуморальных параметров иммунитета в случаях купирования инфекционного процесса, происходило более интенсивно. Это проявлялось и в восстановлении

относительных величин CD19+лимфоцитов, и в повышении сывороточных концентраций противoinфекционных антител через полгода после завершения курсов индукции ремиссии.

Резервные возможности нейтрофильных лейкоцитов, наиболее ярко иллюстрируют изменение активности нейтрофилов при оценке их метаболической активности. В НТС-тесте, как в группе детей с ОЛЛ, так и в группе детей с ЛГМ, показатели претерпевали существенные изменения в течение периода проведения ПХТ. Наиболее выраженными эти изменения были у детей с инфекционными осложнениями грибковой этиологии по сравнению с детьми, имевшими ИО бактериальной природы. Если до начала терапии, в данной группе, спонтанная активность нейтрофилов сохранялась в пределах значений контрольной группы ($13,0 \pm 1,6\%$), то во время проведения полихимиотерапии данный параметр снижался в два раза до $6,0 \pm 1,0\%$. После завершения ПХТ он восстанавливался и превосходил контрольные значения - $32,5 \pm 3,61\%$. Обратная тенденция отмечалась в отношении стимулированной активности нейтрофилов. На первом этапе данный показатель оставался в пределах значений контрольной группы - $22,0 \pm 0,1\%$. На этапах ПХТ стимулированная активность нейтрофилов достоверно увеличивалась до $30,0 \pm 0,06\%$, а на третьем этапе - ещё выше - $52,0 \pm 5,78\%$.

Таким образом, иммунный профиль детей с инфекционными осложнениями ОЛЛ и ЛГМ, до начала ПХТ характеризовался снижением абсолютного числа лейкоцитов, основных субпопуляций CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CD16+, дефицитом антител классов IgA, IgM и IgG. Фагоцитарная и метаболическая активность нейтрофилов была повышена, как у спонтанно-фагоцитирующих клеток, так и при их стимуляции. При проведении ПХТ резервные возможности нейтрофильных лейкоцитов у детей с развившимися позже инфекционными осложнениями ОЛЛ и ЛГМ резко повышались, в отличие от группы контроля.

При исследовании цитокиновых параметров определена сывороточная концентрация ФНО α и эритропоэтина. В связи с тем, что случаи выявления диагностически значимых титров противоионфекционных антител в группе детей с ЛГМ были единичными, что не позволяло сделать достоверных выводов, анализ цитокиновых параметров проводился только в группе детей с ОЛЛ. Выявлено достоверное снижение концентрации эритропоэтина у этих детей по сравнению с группой условно-здоровых – в 2,6 раза. У детей с ОЛЛ, в сыворотке которых выявлялись антитела IgG-класса к грибам *Candida albicans* и *Aspergillus fumigatus*, концентрация эритропоэтина была с высокой степенью достоверности снижена: в 4,29 раза при диагностически значимых титрах антител к *Aspergillus fumigatus* и в 3,5 раза при диагностически значимом титре антител к *Candida albicans*.

Концентрация сывороточного ФНО α у детей с ОЛЛ, в отличие от эритропоэтина, была достоверно повышена ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой условно-здоровых детей. При этом, у детей с ОЛЛ без выявленных противоионфекционных антител IgG-класса сывороточная концентрация ФНО α составила $33,82 \pm 3,71$, что в 5,4 раза превышало значения контрольной группы. У детей с ОЛЛ, имевших IgG-антитела против *Aspergillus fumigatus* – в 4,8 раза.

При исследовании цитокинового профиля детей с ОЛЛ и ЛГМ была выявлена инверсия соотношения концентрации ФНО α и эритропоэтина в сыворотке, что в сочетании с другими иммунологическими методами позволяет дополнить диагностический процесс при гемобластозах, а также уточнить прогноз заболеваний в зависимости от этиологического пейзажа.

Полученные данные позволили сделать следующие выводы.

ВЫВОДЫ

1. За исследуемые десять лет с 1996-2006 гг. число больных гемобластозами детей в Амурской области увеличилось в 1,4 раза, составив

7,08 на 100000 детского населения, при этом ведущее место в структуре заняли ОЛЛ (68%) и ЛГМ (18%).

2. В этиологической структуре инфекционных осложнений у детей с гемобластозами в Амурской области за период 2004-2006 гг. лидировали возбудители микозов (*Aspergillus fumigatus* и *Candida albicans*), которые составили 52,1% детей с гемобластозами, а также возбудители бактериальных инфекций (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staph. epidermidis*), составившие 47,5%.

3. У детей с В-линейным острым лимфобластным лейкозом, независимо от наличия инфекционного осложнения и выраженности нейтропении, достоверно снижено общее количество лейкоцитов, Т-лимфоцитов CD3+, их субпопуляций CD4+, CD8+, а также CD16+, CD25+лимфоцитов, активность фагоцитоза в НСТ-тесте спонтанном и индуцированном; при возникновении инфекционных осложнений – характерно увеличение относительного количества CD19+лимфоцитов и снижение концентрации сывороточного IgG.

4. Иммунный профиль при смешанно-клеточном варианте ЛГМ отличался лейкоцитозом, за счет увеличения числа CD3+, CD4+, CD8+ и CD16+лимфоцитов, CD19+лимфопенией; ЛГМ с нодулярным склерозом – напротив, CD3+лимфопенией.

5. У детей с ОЛЛ и ЛГМ выявлены прогностически значимые изменения иммунологических параметров в отношении развития инфекционных осложнений грибковой и бактериальной этиологии: снижение абсолютного числа лейкоцитов и лимфоцитов при обеих нозологических формах, снижение относительного содержания CD19+лимфоцитов, антител классов IgA, IgM, IgG при ОЛЛ и CD3+, CD14+ и CD16+лимфоцитов при ЛГМ; предвестником развития инфекций грибковой этиологии, наиболее тяжело протекающих, может являться снижение фагоцитарной и метаболической функции нейтрофилов в сочетании со снижением сывороточной концентрации антител классов IgA, IgM, IgG.

6. Признаками иммунодефицита у детей с ОЛЛ и ЛГМ являлось развитие грибковых инфекций, неэффективный иммунный ответ (отсутствие специфических противогрибковых антител) и инверсия соотношения ФНО α и эритропоэтина.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Учитывая полученные результаты исследования, предлагается:

1. При разработке лечебно-профилактических мероприятий в регионе принимать во внимание существенный рост числа заболевших гемобластозами детей в Амурской области по двум нозологическим формам ОЛЛ и ЛГМ.

2. На диагностическом этапе у детей с лимфогранулематозом проводить оценку клеточных параметров иммунитета: CD16+, CD3+, CD19+ лимфоцитов и соотношения CD3+/CD19+, имеющих существенные отличия их значений при различных гистологических вариантах ЛГМ.

3. С целью прогнозирования развития возможных инфекционных осложнений у детей, до начала полихимиотерапии оценивать следующие параметры иммунитета: абсолютные и относительные значения лимфоцитов, а также CD3+, CD8+, CD4+, CD19+, CD16+лимфоцитов периферической крови; концентрацию антител класса IgA, IgM и IgG; метаболическую активность нейтрофилов в НСТ; соотношение ФНО α и эритропоэтина в сыворотке.

4. У детей с диагнозами ОЛЛ и ЛГМ при развитии нейтропении и/или лихорадки проводить антимикробную терапию с учётом наиболее часто встречающихся возбудителей: *Aspergillus fumigatus*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Pseudomonas aeruginosa* при ОЛЛ и *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* при ЛГМ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК

1. Ермаков Г.А. Параметры клеточного звена иммунитета у детей Амурской области больных лимфогранулематозом / Г.А. Ермаков, Г.И. Чубенко // Дальневосточный медицинский журнал. - 2007. - № 1. - С. 73-75.

2. Ермаков Г.А. Иммунологический статус как интегральный компонент диагностического процесса у детей с лимфогранулематозом / Г.А. Ермаков, Г.И. Чубенко // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2006. - № 21. – С. 92-94.

3. Ермаков Г.А. Прогностическая значимость определения сывороточного ФНО α и эритропоэтина у детей с острым лимфобластным лейкозом // Медицинская иммунология. – 2009. - № 4-5. – С. 427.

Публикации в других периодических изданиях, учебных пособиях, сборниках статей и т.п.

4. Ермаков Г.А. Иммунологический аспект применения нейросетей в диагностике гемобластозов / Г.А. Ермаков, И.А. Тузанкина // Математическая морфология. - Электронный математический и медико-биологический журнал, 2009 – Т.8, вып.3. Идентификационный номер 0420900004\0023

5. Ермаков Г.А. Динамика заболеваемости гемобластозами детей за 1996-2006 гг. в Амурской области / Г.А. Ермаков, Г.И. Чубенко // Рак желудка в Амурской области: материалы конф. – Благовещенск, 2006. – С.54-57.

6. Ермаков Г.А. Структура детской гематологической патологии в Амурской области / Г.А. Ермаков, Г.И. Чубенко // Материалы IX съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. - М., 2007. – Т.1. - С. 221.

7. Yermakov G. Response of acute lymphoblastic leukemia to treatment according to modern protocols ALL-BFM-90 in children (1992-2003) / G. Yermakov, N. Sheina, G.Chubcnko // Abstracts II Russia and China international pharmaceutical forum. - Russia, Blagoveschensk, 2005. - P. 177-178.

8. Yermakov G. Frequency of infections complications in structure of oncohematological diseases of children of Amur region / G. Yermakov, N. Sheina, G.Chubcnko. // The XII Symposium of the Russia-Japan Medical Exchange. – 2005. - С.274.

9. Ермаков Г.А. Динамика показателей клеточного звена иммунитета у детей Амурской области страдающих острым лимфобластным лейкозом / Г.А.Ермаков. Молодежь XXI века: шаг в будущее: материалы VII регионал. науч.-практ. конф. – Благовещенск, 2006. – С. 32-33.

10.Ермаков Г.А. Структура гемобластозов у детей Амурской области // Молодежь XXI века: шаг в будущее: материалы VI регионал. науч.-практ. конф. - Благовещенск, 2005.- С. 64-65.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВМЕ-ALL-90	- протокол терапии ОЛЛ немецко-австрийской группы (Берлин, Мюнхен и Франкфурт)
ICAM	- межклеточные молекулы адгезии
IFN	- интерферон
Ig G, M	- иммуноглобулин G, M
IL	- интерлейкин
LT	- лейкотриены
NK	- натуральные киллеры
АСП	- фагоцитарная активность нейтрофилов спонтанная
АСТ	- фагоцитарная активность стимулированная
ВПГ	- вирус простого герпеса
ИФА	- иммуноферментный анализ
ЛГМ	- лимфогранулематоз
ЛПЗ	- лимфопролиферативные заболевания
МКАТ	- моноклональные антитела
ММ	- множественная миелома
НСТ-тест	- тест нитросиний-тетразоловый
НХЛ	- неходжкинские лимфомы
ОЛЛ	- острый лимфобластный лейкоз
ОМЛ	- острый миелобластный лейкоз
ОНЛ	- острый нелимфобластный лейкоз
ПХТ	- полихимиотерапия
РНК	- рибонуклеиновая кислота
СПИ	- субпопуляционный индекс
ТАА	- опухоль (tumor) - ассоциированные антигены
ФИ	- фагоцитарный индекс
ФНО	- фактор некроза опухолей
ФЧ	- фагоцитарное число
ХЛ	- хронический лейкоз
ЦМВ	- цитомегаловирус
ЭПО	- эритропоэтин

Подписано в печать __.09.2009. Формат 60x84 1/16.

Усл. печ. л. 1,0. Тираж 120 экз.

Заказ № 143

Отпечатано в ИПК «Приамурье»

675000, Благовещенск, ул. Калинина д.12.