Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Институт последипломного образования

Кафедра кардиологии, функциональной и клинико-лабораторной диагностики ИПО

РЕФЕРАТ

На тему: «Современные аспекты лабораторной диагностики острых лейкозов»

Выполнил:

Врач-ординатор

Тупилко. И.С.

Проверила:

Анисимова Е.Н.

Красноярск, 2022г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Введение, характеристика, определение 3-4

2. Теория возникновения лейкозов 4

3.Классификации 5-7

4. Современные методы диагностики 7-12

6.Список литературы 13

**Современные аспекты лабораторной диагностики острых лейкозов**

**Введение, характеристика, определение**

Острый лейкоз — злокачественная опухоль кроветворной ткани, характеризующаяся замещением нормального костного мозга незрелыми бластными клетками без дальнейшей их дифференциации в нормальные зрелые клетки крови. Термин «лейкемия» (лейкоз) был введен в 1856 г. немецким патологом Р. Вирховом, который методом световой микроскопии описал избыточное количество белых кровяных телец у больных с гепатоспленомегалией и изменением цвета и консистенции крови.

Диагноз острого лейкоза впервые был поставлен русскими и немецкими врачами E. Freidreich (1857), К. Славянским (1867), B. Kussner (1876), которые сообщили о быстро прогрессирующем течении лейкозного процесса с характерными клиническими проявлениями.

В 1877 г. П. Эрлих разработал способ окраски мазков крови, что позволило ему детально описать патологические клетки при остром лейкозе. Но лишь в 1889 г. после анализа В.Эбштейном 17 наблюдений острого течения лейкоза острый лейкоз был признан самостоятельной нозологической формой. Терапия острого лейкоза изначально складывалась из симптоматических мер, что только облегчало состояние больных. Предпринимались попытки лечения мышьяком, которые не принесли результатов. До40-х гг. ХХ в. выживаемость больных с острым лейкозом оставалась крайне низкой. Начиная с1948 г., отмечается значительный прогресс в лечении острых лейкозов, что связано с широким внедрением в лечебную практику цитостатических препаратов. На долю острых лейкозов приходится около 3 % среди всех злокачественных опухолей человека, среди гемобластозов— 1/3. Заболеваемость острых лейкозов составляет 3–5 случаев на 100 тыс. человек в год. В детском возрасте в 80–90 % случаев диагностируется лимфобластный вариант острого лейкоза, в то время как у взрослых пациентов соотношение нелимфобластных (миелоидных) и лимфобластных лейкозов в среднем составляет 6/1. Прогресс в лечении острых лейкозов, благодаря использованию программной полихимиотерапии и трансплантации гемопоэтической стволовой клетки позволяет достигнуть выздоровления (безрецидивная ремиссия более 5 лет) у 30–40 % взрослых пациентов с ОЛЛ и у 15–20 % — с острым миелобластным лейкозом и до 90% у детей с ОЛЛ.

**Теория возникновения лейкозов:**

В настоящее время общепризнанной считается клоновая теория патогенеза острого лейкоза, согласно которой лейкозные клетки являются потомством одной мутировавшей гемопоэтической клетки-предшественницы. Мутация родоначальной клетки происходит под влиянием различных этиологических факторов (радиация, химические вещества, вирусы, ионизирующее излучение и др.) и заключается в обширном повреждении ДНК, генетического аппарата клетки. В результате этого в лейкозных клетках происходит нарушение процессов пролиферации и дифференцировки. Одна мутировавшая клетка после деления дает огромное количество бластных клеток, и при их общем числе 1012 и более начинаются клинические проявления заболевания. Основные клинические синдромы острого лейкоза: гиперпластический, геморрагический, анемический, инфекционно-токсический.

**Классификации**

С целью объединения морфологических и цитохимических основ дифференциации острого лейкоза в 1976 г. франко-американо-британской группой гематологов была разработана FAB-классификация острых лейкозов, пересмотренная и дополненная в 1991 г. в соответствии с которой острые лейкозы разделены на две большие группы:

1) Нелимфобластные (миелоидные)

2) Лимфобластные лейкозы.

Данная классификация до сих пор остается наиболее распространенной и широко используемой в клинической практике за исключением классификации ОЛЛ, основанной исключительно на морфологических отличиях бластных клеток, в связи с отсутствием ее прогностической значимости. Острые лимфобластные лейкозы со зрелым В-фенотипом (Л3) относится к группе неходжкинских лимфом.

FAB-классификация острых лейкозов (1976 г., 1991 г.)

- Нелимфобластные(миелоидные) лейкозы:

- М0 — острый миелобластный лейкоз с минимальной миелоидной дифференцировкой(3–5 %);

- М1 — острый миелобластный лейкоз без признаков созревания бластов(15–25 %);

- М2 — острый миелобластный лейкоз с признаками созревания клеток (25–35 %);

- М3 — острый промиелоцитарный лейкоз (6–10 %);

- М3м (подтип) — микрогранулярный промиелоцитарный лейкоз;

- М4 — острый миеломонобластный (миеломоноцитарный) лейкоз(15–17 %);

- М5 — острый монобластный (моноцитарный) лейкоз(3–8 %);

- М5а(подтип) — без созревания клеток;

- М5б(подтип) — с частичным созреванием клеток;

- М6 — острый эритромиелоз (эритролейкоз) (4–6 %);

- М7 — острый мегакариобластный лейкоз(2–5 %);

Лимфобластные лейкозы:

- Л1 — острый микролимфобластный лейкоз;

- Л2 — острый лимфобластый лейкоз;

- Л3 — острый макролимфобластный лейкоз (типа лимфомы Беркитта).

 В 1999 г. международной группой экспертов была создана новая классификация гематологических опухолей— классификация ВОЗ, согласно которой варианты острых лейкозов дифференцируются с учетом их генотипа, иммунофенотипа, возникновения после предшествующей химиорадиотерапии. Так, острый миелобластный лейкоз в этой классификации подразделяется на четыре категории:

1) ОМЛ, ассоциированный со стабильно выявляемыми транслокациями;

2) ОМЛ с мультилинейной дисплазией;

3) ОМЛ после предшествующей химиотерапии;

4) Другие формы ОМЛ

**В первую категорию включены следующие лейкозы:**

- ОМЛ с транслокацией (8;21)

(q22; q22) и химерным транскриптомAML1-ETO; ОМЛ с инверсией 16 (p13;q22) или транслокацией(16;16) (p13;q22) и химерным транскриптом CBFbeta-MYH1 и увеличением числа аномальных эозинофилов;

- Острые промиелоцитарные лейкозы с транслокацией(15;17) (q22;q12) и химерным транскриптом PML-RARa и другими транслокациями;

- ОМЛ с аномалиями 23 сегмента длинного плеча 11 хромосомы (11q23) или тандемными повторами MLL-гена.

Во вторую категорию входят ОМЛ, которые морфологически характеризуются мультилинейной дисплазией костного мозга, развившиеся либо на фоне предшествующего миелодиспластического синдрома, миелопролиферативного заболевания либо как первичные лейкозы.

К третьей категории относят ОМЛ, возникшие после терапии алкилирующими препаратами, ингибиторами топоизомеразы II и после других видов химиолучевого воздействия.

Четвертая категория представляет собой

Фактически FAB-классификацию (МО–М7), в которую также включены :

- Острый базофильный лейкоз,

- Острый миелофиброз

- Миелоидная саркома

В связи с ограниченной доступностью молекулярно-генетического исследования данная классификация острых лейкозов пока не получила широкого применения в клинической практике.

**Современные методы диагностики**

В соответствии с последними рекомендациями ВОЗ (1999 г.), основным диагностическим критерием острых лейкозов является обнаружение бластных клеток в костном мозге более 25 % . В световом микроскопе при окраске мазка костного мозга или периферической крови по Романовскому- Гимзе бластные клетки характеризуются нежно-сетчатой структурой ядерного хроматина, базофилией цитоплазмы и присутствием в ядре четко очерченных голубоватых ядрышек. Морфологический метод при диагностике острых лейкозов является лидирующим, однако он позволяет определить принадлежность опухолевых клеток к миелоидной или лимфоидной линиям кроветворения лишь в 70 % случаев при обнаружении азурофильной зернистости и палочек Ауэра у миелобластов. Для более точной дифференцировки необходимы другие диагностические подходы: иммунофенотипирование, цитохимическое, цитогенетическое и молекулярно-биологическое иследования.

Картина ПК при остром лейкозе вариабельна. В большинстве случаев выявляется анемия, тромбоцитопения и нейтропения. Анемия обычно нормохромная, нормоцитарная, гипорегенераторная, более выражена при ОМЛ (в частности, при М6), чем при ОЛЛ. Глубокая инициальная тромбоцитопения особенно характерна для острого промиелоцитарного лейкоза (М3).

В 1–2 % случаев при ОМЛ наблюдается тромбоцитоз. Количество лейкоцитов может колебаться в достаточно широких пределах— от 1,0×10 9 г/л до100,0×10 9 г/л и более. Зачастую в периферической крови определяется феномен «провала»: отсутствие промежуточных форм между бластными клетками и зрелыми нейтрофильными гранулоцитами.

Хотелось бы обратить внимание на то, что в 6 % случаев инициальные проявления ОЛЛ в детском возрасте, по данным анализа периферической крови, характеризуются исключительно лимфоцитозом.

В 60-е гг. прошлого века наряду с морфологическим методом диагностики острых лейкозов получает свое развитие цитохимический метод исследования. И уже в 70-е гг. морфологические и цитохимические характеристики бластных клеток становятся основным критерием лабораторной диагностики варианта острых лейкозов. Благодаря цитохимии удается охарактеризовать линейную направленность дифференцировки лейкозных клеток ОМЛ (гранулоцитарная, моноцитарная, эритроидная линии) и определить ее степень.

Цитохимические реакции, используемые для дифференциальной диагностики варианта ОЛ, включают:

1) Выявление миелопероксидазы и (или) липидов в реакции с суданом черным;

2) Исследование активности неспецифических эстераз (альфанафтилацетатэстераза (АНАЭ) и (или) альфа-нафтилбутиратэстераза(АНБЭ)) с оценкой чувствительности к ингибированию фторидом натрия;

3) ШИК-реакции с гликогеном;

4) Кислой фосфатазы.

ШИК-реакция позволяет отдифференцировать ОЛЛ от ОМЛ: при ОЛЛ выявляется гранулярный продукт реакции, при ОМЛ— диффузная реакция. МПО и ЛП— высокоспецифичные маркеры миелоидной дифференцировки, выявление которых необходимо для подтверждения ОМЛ. Выявление НЭ (чувствительной к фториду натрия) указывает на моноцитарную природу лейкозных клеток.

Определение КФ может указывать на Т-клеточный ОЛЛ (90 % случаев) или на М3-вариант ОМЛ. При ОЛЛ у всех типов лимфобластов реакции на ЛП, МПО, НЭ являются отрицательными.

Открытие в конце 70-х гг. ХХ в. на поверхности гемопоэтических клеток специфических антигенов явилось новым этапом в диагностике острых лейкозов с использованием метода иммунофенотипирования бластных клеток. К настоящему времени на мембране и в цитоплазме гемопоэтических клеток определено более 150 специфических белков-антигенов, сгруппированных в так называемые кластеры дифференцировки (CD). Каждый из CD-антигенов с помощью моноклональных антител выявляется на нормальных гемопоэтических клетках соответствующей линейной принадлежности и на определенных стадиях дифференцировки. Обнаружение одномоментной экспрессии на клетке антигенов, в норме вместе не встречающихся, свидетельствует об аберрантном (лейкемическом) иммунофенотипе**.**

**К задачам иммунофенотипирования как современного метода диагностики можно отнести следующие:**

1) Подтверждение диагноза;

2) Установление варианта острого лейкоза в том случае, когда цитоморфологический метод не достаточно информативен (например, при установлении диагноза острый миелоидный лейкоз с минимальной дифференцировкой— М0-вариант);

3) Определение бифенотипических и билинейных вариантов острых лейкозов;

4) Характеристика аберрантного иммунофенотипа в дебюте заболевания с целью дальнейшего мониторинга минимальной остаточной популяции клеток в период ремиссии острого лейкоза;

5) Выделение прогностических групп.

Бластные клетки считаются позитивными по экспрессии того или иного антигена, если 20 % и более экспрессируют его. К антигенам, определяемым на клетках лимфоидной принадлежности, относят CD 1, CD 2, CD 3, CD 4, CD 5, CD 7, CD 8, CD 9, CD 10, CD 19, CD 20, CD 22, CD 23, CD 56, CD 57; CD79а, миелоидной— CD 11, CD 13, CD 14, CD 15, CD 33, CD 36, CD 41, CD42, CD 65. Определенное сочетание указанных антигенов на бластных клетках, позволяет разделять острые лейкозы в рамках лимфоидной линии дифференцировки на несколько субвариантов.

В настоящее время широкое применение получила классификация ОЛЛ, разработанная в 1995 году Европейской группой по иммунологической характеристике лейкемий (European Group for the Immunological characterisation of Leukemias, EGIL) .

Для ОЛЛ иммунофенотипирование стало особенно принципиальным диагностическим методом, поскольку программы лечения различных подтипов ОЛЛ существенно различаются. Для ОЛЛ В-линии факторами определения тактики лечения являются возраст, инициальный лейкоцитоз и цитогенетические аномалии. Для Т-клеточного ОЛЛ нет признаков, влияющих на выбор терапии, он сам по себе является прогностически неблагоприятным и требует более интенсивного лечения. Дифференцированный подход к терапии различных иммунофенотипических вариантов ОЛЛ позволил добиться значительных успехов как в достижении полных ремиссий, так и получении длительной выживаемости больных.

Для подтверждения миелоидной (гранулоцитарной и моноцитарной) природы лейкоза наиболее распространенными и широко применяемыми являются антигены кластеровCD13 и CD33. Оценка этих маркеров позволяет подтвердить миелоидную природу бластных клеток в 98 % случаев ОМЛ.

Использование стандартной панели моноклональных антител в 1–2 % не имеет признаков линейной дифференцировки и попадает в группу острого недифференцированного лейкоза (ОНдЛ), что представляет собой достаточно серьезную проблему на современном этапе диагностики и лечения острых лейкозов.

В 20–35 % случаев ОМЛ или ОЛЛ встречается бифенотипический ОЛ, диагноз которого устанавливается в тех ситуациях, когда при иммунофенотипировании на мембране этих клеток экспрессируются принципиально значимые маркеры (как лимфоидные, так и миелоидные) в сумме 2 и более баллов для каждой из присутствующих линий

Прогностическая значимость аберрантной экспрессии маркеров при острых лейкозах пока недостаточно ясна. Существуют данные, например, что обнаружение миелоидных маркеров как при В-клеточном, так и при Т-клеточном ОЛЛ не влияет на результаты лечения. И, наоборот, наличие лимфоидных маркеров при ОМЛ является неблагоприятным фактором в плане терапии. С другой стороны, есть публикации, доказывающие, что выявление CD2, CD7 антигенов на миелоидных клетках свидетельствует о благоприятном течении ОМЛ. Результаты лечения бифенотипических ОЛ существенно хуже, нежели ОЛЛ или ОМЛ.

Заключительный этап диагностики ОЛ включает цитогенетическое и молекулярно-биологическое исследования бластных клеток, позволяющие оценить состояние хромосомного аппарата. Практическое значение цитогенетического анализа при острых лейкозах в последнее десятилетие стало общепризнанным, поскольку его данные позволяют уточнить вариант заболевания, проводить динамическое наблюдение за больным в период ремиссии и (или) рецидива, оценивать прогноз. Последнее особенно важно для планирования адекватной, в том числе и высокодозовой терапии.

Аномалии кариотипа (числовые и структурные) выявляются примерно у 60–80 % пациентов с ОЛ. В настоящий момент устанолено влияние определенных цитогенетических аберраций на течение и прогноз различных вари-антов ОЛ. Например, инверсия16 хромосомы часто определяется у больных с миеломонобластным лейкозом и высокой эозинофилией в костном мозге (более3 %), транслокация(15, 17) — типичный маркер острого промиелоцитарного лейкоза, транслокация (8; 21) — определяется у 40 % больных с М2-вариантом острого миелоидного лейкоза. Данные транслокации характеризуют группу благоприятного прогноза при ОМЛ. Для ОМЛ с t (8; 21) и t (15; 17) созданы программы дифференцированного лечения, которые позволяют практически у 70 % пациентов добиться длительной безрецедивной ремиссии.

Вторичные лейкозы, индуцированные химиотерапией и (или) радиотерапией, чаще всего характеризуются изменениями 5 и 7 пар хромосом, аномалиями q23 сегмента11 хромосомы и свидетельствуют о крайне неблагоприятном прогнозе в плане выхода в ремиссии.

При ОЛЛ принципиальным является обнаружение транслокации (9;22) ВСR/АВL и аномалии региона 11q23 или(4; 11) как факторов резконеблагоприятного прогноза.

К группе с хорошим прогнозом относится транслокацияt (12; 21) ТЕL/АМL1и гипердиплоидии. Лейкозы сt (9; 22) (q34; ql1) (Ph-позитивные) составляют до5 % ОЛЛ у детей и15–30 % у взрослых.

Данная транслокация как и при хроническом миелолейкозе приводит к обмену между участками q34 хромосомы 9 и q11 хромосомы22. Участок гена АВL (аbelson proto-oncogene, 9q34) транслоцируется вBCR-ген (breakpoint cluster region gene, 22ql1), образуя химерный генBCR/ABL. Его производным является белок с тирозинкиназной активностью, которая значительно превышает активность нормального белка АВL и является ключевым звеном в патогенезе острых лейкозов с t (9; 22) (q34; ql1). В зависимости от точки разрыва гена BCR может синтезироваться химерный белок с молекулярной массой 210-kD (характерен для хронического миелолейкоза) или 190-kD (характерен для ОЛЛ). Оба белка можно оп-ределить с помощью полимеразной цепной реакции. Ph-позитивный ОЛЛ является прямым показанием к проведению аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, так как частота достижения полных ремиссий при использовании стандартных схем полихимиотерапии при данном варианте ОЛЛ колеблется от 50 до75 % при продолжительности их менее 10 месяцев, а3-летняя выживаемость составляет 5–20 % как у детей, так и у взрослых. Выявление клональных аномалий, характерных для клеток опухоли конкретного пациента, позволяет отслеживать эти клетки в динамике заболевания на молекулярно-генетическом уровне и определять минимальную резидуальную клеточную популяцию. Идентификация и молекулярная характеристика генов, поврежденных в результате хромосомных изменений, приводит к пониманию молекулярных основ злокачественной трансформации и к разработке в дальнейшем направленной терапии.

**Список литературы:**

1. Клиническая онкогематология. Острые лейкозы/ М. А. Волкова. — М.: Медицина, 2001. — Гл. 6. — С. 96–161.

2. Руководство по гематологии: в3 т. / А. И. Воробьев под общ. ред. А. И. Воробьева. — М.: Ньюдиамед, 2002. —

3. Основы клинической гематологии. Острые лейкозы/

В. Г. Радченко. — СПб.: Диалект, 2003. — Гл. 5. — С. 92–107.

4. Гематология. Острые лейкозы: новейший справочник/

К. М. Абдулкадыров. — М.: Эксмо; СПб.: Сова, 2004. — Гл. 16. —

С. 402–460.

5. Ключи к диагностике острых лейкозов/ В. М. Погорелов, Г. И. Козинец// Гематология и трансфузиология. — 2008. — .

6. Принципы и возможности стандартизации морфоцитохимической диагностики острых лейкозов/ В. М. Погорелов[и др.] // Кли-ническая лабораторная диагностика. — 2006. — №7. — С. 20–22.

7. Betz, B. L.Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century / B. L. Betz // Arch Pathol Lab Med. — 2010. — Vol. 34, (перевод )

8. Modern diagnostics in acute leukemias / T. Haferlach [et al.] //

Crit Rev Oncol Hematol. — 2005. — Vol. 56, №2. — Р. 223–234.

9. Френкель, М. А. Современная диагностика острых лейкозов/ М. А. Френкель// Клиническая лабораторная диагностика. — 1999. — №1. — С. 25–32.

10. Совершенствование комплексной диагностики острых

лейкозов у детей в Республике Беларусь/ О. В. Алейникова[и др.] //

Гематология и трансфузиология. — 2002. — Т. 47, №2. — С. 42–44.

11. Molecular markers in hematology and oncology / А. Schmidt //

Praxis (Bern 1994). — 2010. — Vol. 99, №19. — Р. 1143–1452.