

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова»
ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ

Кафедра лабораторной медицины и генетики

ОДОБРЕНО
Учебно-методическим советом
ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»
Минздрава России

Протокол № 1/2022
«25» января 2022 г.

УТВЕРЖДАЮ
Директор Института медицинского
образования
ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»
Минздрава России
Е.В. Пармон
«25» января 2022 г.

Черныш Н.Ю., Жиленкова Ю.И., Вавилова Т.В.

**ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ
В ОНКОГЕМАТОЛОГИИ**

учебно-методическое пособие для обучающихся
по дисциплине «Лабораторные методы диагностики в онкогематологии»
по направлению подготовки 06.04.01 Биология (уровень магистратуры)
профиль: «Медицинские лабораторные исследования»

Санкт-Петербург
2022

УДК 616-006
ББК 55.6

Черныш Н.Ю., Жиленкова Ю.И., Вавилова Т.В. Лабораторные методы диагностики в онкогематологии: учебно-методическое пособие / Н.Ю. Черныш, Ю.И. Жиленкова, Т.В. Вавилова – Издательство ... – СПб, 2021. – 23 с.

Авторы:

Черныш Н.Ю. – доцент кафедры лабораторной медицины и генетики ИМО ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, к.м.н.;

Жиленкова Ю.И. – доцент кафедры лабораторной медицины и генетики ИМО ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, к.м.н.;

Вавилова Т.В. – заведующий кафедрой лабораторной медицины и генетики ИМО ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, д.м.н., профессор.

Рецензент:

Гайковая Л.Б. – заведующая кафедрой биологической и общей химии им. В.В. Соколовского ФГБОУ ВО СЗГМУ им И.И. Мечникова Минздрава России, д.м.н., доцент

Учебно-методическое пособие «Лабораторные методы диагностики в онкогематологии» предназначено для проведения практических занятий как одного из этапов дисциплины «Лабораторные методы диагностики в онкогематологии» для обучающихся по направлению подготовки 06.04.01 Биология (уровень магистратуры).

Обсуждено на заседании кафедры лабораторной медицины и генетики
Института медицинского образования
ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России
протокол № 1 от 21.01.2022 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
Раздел 1. Гематологические методы в диагностике онкогематологических заболеваний.....	7
1.1. Микроскопическое исследование мазка крови.....	7
1.2. Микроскопическое исследование аспирата костного мозга с подсчетом миелограммы. Цитохимическое исследование	11
Раздел 2. Проточная цитометрия в онкогематологии.....	17
2.1. Иммунофенотипирование при острых лейкозах.....	17
2.2. Иммунофенотипирование при лимфопролиферативных заболеваниях.....	19
Раздел 3. Цитогенетика в онкогематологии.....	21
3.1. Цитогенетические исследования в онкогематологии.....	21

ВВЕДЕНИЕ

Продолжительность изучения дисциплины «Лабораторные методы диагностики в онкогематологии» – 72 часа

Лекции – 8 часов

Практические занятия – 24 часа

Самостоятельная работа – 40 часов

Цель дисциплины – ознакомить обучающихся с основами автоматизированных и морфологических методов лабораторной диагностики периферической крови и костного мозга, а также цитогенетических исследований для диагностики онкогематологических заболеваний.

В результате освоения дисциплины, обучающиеся должны овладеть навыками морфологических и цитогенетических исследований, а также освоить работу оборудования, используемого для проведения данной группы исследований.

Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения учебной дисциплины: УК 1.1, УК-1.2, ОПК2.1, ОПК-2.2, ОПК-2.3, ОПК-3.3, ОПК-7.3, ОПК-8.1, ОПК-8.2, ОПК 8.3, ПК 4.1, ПК-4.2, ПК-4.3, ПК-5.1, ПК-5.2, ПК-5.3, ПК-5.4, ПК-6.1, ПК-6.2, ПК-6.3.

Конкретные задачи

Компетенция	Индикатор	Показатели достижения освоения компетенции
УК-1. Способен осуществлять критический анализ проблемных ситуаций на основе системного подхода, вырабатывать стратегию действий	УК-1.1. Анализирует проблемную ситуацию на основе системного подхода, выявляя ее составляющие и связи между ними	Знает: схемы диагностического поиска гематологических и онкогематологических изменений. Умеет: использовать лабораторные технологии для поиска гематологических и онкогематологических отклонений.
	УК-1.2. Формулирует цели и рассматривает различные варианты решения проблемной ситуации	Знает: алгоритм проведения лабораторных тестов для выявления гематологических и онкогематологических заболеваний. Умеет: применять на практике технологии лабораторного гематологического анализа для выявления гематологических и онкогематологических состояний.
ОПК-2. Способен творчески использовать в профессиональной деятельности знания фундаментальных и прикладных разделов дисциплин (модулей), определяющих направленность программ магистратуры	ОПК-2.1. Применяет фундаментальные и прикладные знания в сфере профессиональной деятельности для постановки и решения новых задач	Знает: патогенез развития гематологических и онкогематологических изменений, особенности изменений кроветворения при гематологических и онкогематологических заболеваниях. Умеет: сопоставить теоретические основы эритро, лейко и тромбоцитопоза с клиническими и лабораторными данными, полученными в результате диагностического поиска.

	ОПК-2.2. Использует современные методы молекулярной биологии в сфере профессиональной деятельности для постановки и решения новых задач	Знает: основы современных диагностических возможностей поиска патологических особенностей, связанных с нарушением кроветворения. Умеет: использовать современные методы молекулярной биологии для оценки патологических процессов, связанных с нарушением кроветворения.
ОПК-3. Способен использовать философские концепции естествознания и понимание современных биосферных процессов для системной оценки и прогноза развития сферы профессиональной деятельности	ОПК-3.3. Способен осуществить прогноз последствий реализации социально значимых проектов в сфере профессиональной деятельности	Знает: современные тенденции развития диагностического поиска гематологических заболеваний, способен дать оценку актуальных проектов диагностики онкологических заболеваний. Умеет: провести диагностический поиск пациентов с гематологическими отклонениями и онкогематологическим диагнозом с целью раннего оказания специализированной онкологической помощи.
ОПК-7. Способен в сфере своей профессиональной деятельности самостоятельно определять стратегию и проблематику исследований, принимать решения, в том числе инновационные, выбирать и модифицировать методы, отвечать за качество работ и внедрение их результатов, обеспечивать меры производственной безопасности при решении конкретной задачи	ОПК-7.3. Обеспечивает меры производственной безопасности при решении конкретной задачи	Знает: требования к безопасному проведению лабораторных исследований, способен выбрать наиболее значимые методы и технологии диагностики в интересах пациента для достижения оптимального результата в кратчайшие сроки. Умеет: разработать диагностический план с выбором оптимальных технологических и лабораторных решений в интересах пациента с соблюдением техники безопасности и проведением контроля качества на всех этапах диагностического поиска.
ОПК-8. Способен использовать современную исследовательскую аппаратуру и Вычислительную технику для решения инновационных задач в профессиональной деятельности	ОПК-8.1. Способен использовать Современную исследовательскую аппаратуру для решения инновационных задач в профессиональной деятельности	Знает: особенности лабораторной диагностики патологии крови Умеет: давать лабораторную интерпретацию результатов высокотехнологичных методов диагностики патологии крови
	ОПК-8.2. Способен использовать вычислительную технику для решения инновационных задач в профессиональной деятельности	Знает: требования к работе и возможности современных компьютерных и информационных систем в лабораторной и клинической практике. Умеет: использовать лабораторную и медицинскую информационные системы для получения, анализа и передачи данных пациента с целью оптимизации диагностического поиска.
	ОПК-8.3. Способен осваивать новые методы	Знает: основные положения нормативных документов, регламентирующих проведение методов исследования

	Исследования разрабатывать инновационные подходы для решения профессиональных задач	заболеваний системы крови Умеет: использовать современные технологии морфологических, цитогенетических исследований, проточной цитометрии в диагностике онкогематологических заболеваний
ПК-4. Способен использовать знание нормативных документов, регламентирующих организацию проведения научно-исследовательских и лабораторных работ	ПК-4.1. Составляет общий план исследования с учетом нормативных документов, регламентирующих организацию проведения научно-исследовательских и лабораторных работ in vitro и/или in vivo	Знает: требования законодательства РФ и нормативных документов оказания медицинской помощи пациентам с гематологическими и онкогематологическими диагнозами Умеет: провести анализ нормативно-правовой базы для грамотного планирования диагностического лабораторного исследования при гематологических изменениях.
	ПК-4.2. Осуществляет организацию и проведение исследований с учетом нормативных документов, регламентирующих организацию проведения лабораторных работ	Знает: стандарты и требования к организации проведения диагностических мероприятий гематологических и онкогематологических пациентов, а также требования к работе гематологического отдела диагностических лабораторий. Умеет: осуществить лабораторное исследование для диагностики гематологической и онкогематологической патологии.
	ПК-4.3. Способен реализовать исследования и проведение лабораторных работ in vitro и/или in vivo	Знает: требования к проведению лабораторных исследований при выявлении гематологических и онкогематологических заболеваний. Умеет: проводить лабораторные исследования при выявлении гематологических и онкогематологических заболеваний.
ПК-5. Способен разрабатывать и внедрять новые методы медицинских лабораторных исследований и медицинских изделий для диагностики in vitro	ПК-5.1. Обеспечивает условия для выполнения новых видов медицинских лабораторных исследований, внедрения новых медицинских изделий для диагностики in vitro	Знает: требования для внедрения и использования в лабораторной практике новых видов медицинских лабораторных исследований для решения гематологических и онкогематологических задач. Умеет: внедрять в лабораторную практику новых видов медицинских лабораторных исследований для диагностики гематологических и онкогематологических заболеваний.
	ПК-5.2. Осуществляет контроль качества новых медицинских лабораторных исследований	Знает: требования по проведению контроля качества и систему управления качеством лабораторных исследований Умеет: организовать управление системой контроля качества лабораторных исследований и проводить вне- и внутрилабораторный контроль качества.
	ПК-5.3. Разрабатывает стандартные операционные процедуры по новым методам медицинских лабораторных исследований и эксплуатации новых	Знает: требования и стандарты для создания лабораторных процессов и внедрения новых технологий в соответствии со стандартами операционных процедур.

	медицинских изделий для диагностики in vitro	Умеет: разрабатывать стандартные операционные процедуры для внедрения новых технологий в работу гематологического отдела лаборатории.
	ПК-5.4. Оценивает аналитические характеристики и клиническую информативность новых методов медицинских лабораторных исследований	Знает: правила для аналитической оценки информативности, диагностической чувствительности и специфичности гематологических лабораторных тестов Умеет: оценить информативность, значимость, чувствительность и специфичность лабораторных тестов в соответствии с целью их применения у гематологических и онкогематологических пациентов
ПК-6 Способен выполнять диагностические медицинские лабораторные исследования и интерпретацию их результатов	ПК-6.1. Организует контроль качества медицинских лабораторных исследований на преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах.	Знает: требования к организации контроля качества на преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах для технологий гематологического анализа, а также морфологических исследований Умеет: организовать проведение контроля качества работы лаборатории с гематологическими пациентами на преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах
	ПК-6.2. Способен выполнять медицинские лабораторные исследования с использованием медицинских изделий для диагностики in vitro, для выполнения которых требуется специально подготовленный персонал	Знает: стандарты выполнения гематологических исследований и особенности технологических процессов и технологий Умеет: выполнять гематологические исследования и выбирать для диагностики онкогематологических заболеваний технологии, выполнение которых требует специально подготовленного персонала
	ПК-6.3. Анализирует результаты и формулирует лабораторное заключение химико-микроскопических, гематологических, цитологических, биохимических, коагулологических, иммунологических, иммуногематологических, химико-токсикологических, молекулярно-биологических, генетических, микробиологических, паразитологических и вирусологических исследований.	Знает: требования к формированию лабораторных заключений гематологических исследований. Умеет: составить заключение и проанализировать результаты полученных данных, консультировать пациентов и врачей при гематологических и онкогематологических изменениях

Место проведения занятий и оснащение: учебные аудитории кафедры лабораторной медицины и генетики, мультимедийная аппаратура, методические материалы, световые микроскопы, счетные машинки, препараты крови и костного мозга (мазки фиксированы, окрашены), цитологические препараты.

Междисциплинарные и внутридисциплинарные связи: для изучения данной дисциплины обучающимся необходимо владение знаниями из ранее освоенных дисциплин: «Биология Клетки», «От цитологии к цитогенетике».

Основная литература:

Справочник врача-гематолога / А. А. Рукавицын, О. А. Рукавицын. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. - Текст : электронный // URL : <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970458075.html>

Гематология / под ред. Рукавицына О. А. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. - Текст : электронный // URL : <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970452707.html>

Гематологические методы исследования. Клиническое значение показателей крови: Руководство для врачей / В.Н. Блиндарь, Г.Н. Зубрихина, Н.Е. Кушлинский. - 2-е изд., испр. - М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2020. - Текст : электронный // URL : <https://www.medlib.ru/library/library/books/?subject=3226>

Клиническая лабораторная диагностика: учебное пособие / Кишкун А. А. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. - Текст : электронный // URL : <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970448304.html>

Биохимические исследования в клинической практике / А. А. Кишкун. - 2-е изд., перераб. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Текст : электронный // URL : <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970463710.html>

Дерматоонкология и онкогематология. Атлас / под ред. Олисовой О. Ю. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. - Текст : электронный // URL : <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970454138.html>

Дополнительная литература:

Руководство по лабораторным методам диагностики / А. А. Кишкун — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - Текст : электронный // URL : <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970431023.html>

Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы / под ред. А. И. Карпищенко — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - Текст : электронный // URL : <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970429587.html>

Назначение и клиническая интерпретация результатов лабораторных исследований / А. А. Кишкун — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. - Текст : электронный // URL : <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970438732.html>

Опухолевые маркеры / Кишкун А. А. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2019. - Текст : электронный // URL : <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970451748.html>

РАЗДЕЛ 1

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

1.1. Микроскопическое исследование мазка крови

Цель: научиться дифференцировать молодые клетки различных ростков кроветворения в препаратах периферической крови. Проводить начальную дифференциальную диагностику различных онкогематологических состояний в рамках анализа крови.

Конкретные задачи: познакомиться с особенностями отклонений клинического анализа крови на этапе морфологической оценки лейкоцитарной формулы. Сопоставить полученные показатели морфологических исследований препаратов крови с результатами гематологических анализаторов и составить лабораторное заключение по имеющимся данным.

Форма проведения практического занятия: практическое занятие.

Продолжительность занятия: 4 академических часа.

Основные понятия

Появление автоматических счетчиков крови в лабораторной диагностике изменило представление об общем анализе крови (ОАК). Возможности аналитических систем меняются год от года и позволяют на ранних этапах диагностики проводить дифференциальный диагноз между реактивными и опухолевыми процессами. «Флаги» ОАК позволяют выявить пробы с онкогематологической настороженностью и принять решение о проведении дополнительного морфологического скрининга лейкоцитарной формулы и формировании диагностической траектории для исключения или выявления онкогематологического диагноза. На первых этапах в алгоритм обследования пациента входят следующие параметры:

- подсчет количества лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов в анализаторе;
- определение концентрации гемоглобина и гематокрита;
- оценка расчетных показателей гематологического анализатора по трем росткам кроветворения;
- подсчет лейкоцитарной формулы и оценка морфологических характеристик эритроцитов (анизоцитоз, пойкилоцитоз, гипо/гиперхромия, наличие включений) и тромбоцитов.

Однако при подозрении на онкогематологические изменения по результатам анализатора или в случае сомнительных результатов необходимо проводить оценку лейкоцитарной формулы.

ЛЕЙКОЦИТАРНАЯ ФОРМУЛА

Процентное соотношение отдельных форм лейкоцитов называют лейкоцитарной формулой. Оценка соотношения различных лейкоцитов осуществляется в мазке, окрашенном по Романовскому, методом иммерсионной микроскопии с окуляром 10 и объективом 100. Соотношение клеток оценивают из расчета на 100, 200 или при необходимости большего количества лейкоцитов. При отсутствии изменений в лейкоцитарной формуле выявляется 6 групп лейкоцитов: палочкоядерные нейтрофилы, сегментоядерные нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, лимфоциты и моноциты. При изменениях клеточный состав меняется и могут появиться молодые клеточные формы или клеточные ростки (плазматические клетки), измениться соотношение обычно встречаемых элементов (табл. 1).

Таблица 1

Референтные значения лейкоцитарной формулы

Клетки	Референтные значения %
Палочкоядерные нейтрофилы	1.0-6.0
Сегментоядерные нейтрофилы	47.0-72.0
Эозинофилы	0-5.0
Базофилы	0-1.0
Моноциты	3.0-11.0
Лимфоциты	19.0-39.0

ВАЖНО!

Бласты, промиелоциты, миелоциты, метамиелоциты В НОРМЕ НЕ ВСТРЕЧАЮТСЯ в периферической крови.

Выявление морфологических изменений, указывающих на развитие пролиферативных изменений в костном мозге, будет показанием к продолжению обследования для исключения, подтверждения или уточнения диагноза.

Дальнейшее обследование включает:

- определение количества ретикулоцитов и оценку ретикулоцитарного ростка;
- проведение исследования костного мозга (миелограмма и трипанобиопсия);
- цитохимическое исследование;
- проточная цитометрия;

- цитогенетическое исследование;
- молекулярно-генетические методы исследования.

Совокупность данных, полученных при использовании всех лабораторных возможностей, позволяет в кратчайшие сроки оценить полученные данные, провести дифференциальную диагностику, а главное поставить не только основной диагноз, но и выявить наиболее прогностически важные цитогенетические аномалии, от чего зависит тактика ведения пациента и проводимая терапия.

Но в то же время, морфологическая оценка клеток крови остается важным этапом исследования в «сложных» случаях, когда анализатор не может дифференцировать клетки, а также при гематологической патологии, когда оценка окрашенных мазков является обязательной в большинстве случаев и требует «наработки» практического опыта от врача-морфолога. Морфологическое исследование пунктата костного мозга с подсчетом миелограммы – более сложное исследование, требующее от специалиста лаборатории обширных знаний в области гематологии.

Задания для выполнения

1. Рассказать об изменениях в ОАК, которые характерны для острых и хронических лейкозов.
2. Привести примеры «флагов» гематологических анализаторов, указывающих на онкогематологический диагноз.
3. Оценить результаты ОАК, выполненного на анализаторе, посчитать лейкоцитарную формулу и сделать лабораторное заключение у пациента с анемическим синдромом.
4. Оценить результаты ОАК, выполненного на анализаторе, посчитать лейкоцитарную формулу и сделать лабораторное заключение у пациента с подозрением на лейкоз.
5. Оценить результаты ОАК, выполненного на анализаторе, посчитать лейкоцитарную формулу и сделать лабораторное заключение у пациента с высоким уровнем тромбоцитов.

Задания для самоподготовки (контрольные вопросы текущего контроля)

1. Общий анализ крови. Преаналитический этап, параметры, референтные интервалы, технологии выполнения исследования. Морфологическая картина клеток периферической крови.
2. Автоматизированные методы анализа в гематологии: принципы, виды гематологических анализаторов, параметры.

3. Гемопоз. Морфологические особенности клеток костного мозга.
4. Исследование пунктата костного мозга: подготовка материала, оценка миелограммы.
5. Особенности гемограммы при острых лейкозах.
6. Особенности миелограммы при хронических лейкозах.
7. Изменения гемограммы при лейкомоидных реакциях.
8. Изменения эритроцитарного и тромбоцитарного ростков в ОАК при онкогематологических заболеваниях.

Наглядные материалы для выполнения работы по теме: микроскопы, предметные стекла, окрашенные препараты крови и костного мозга.

Литература:

1. Луговская С.А. Гематологический атлас / Луговская С.А., Почтарь М.Е. – М.: Триада, 2016. – 434 с.: ил.
2. Клиническая лабораторная диагностика Учебник : в 2-х томах. / под ред. профессора В. В. Долгова. — М. : Лабдиаг, Том 1 — 688 с, 2017., Том 2. - 780 с., 2018 г. Режим доступа:
3. Руководство по лабораторным методам диагностики [Электронный ресурс] / Кишкун А.А. - 2-е изд., перераб. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. – Режим доступа: <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970431023.html>

1.2. Микроскопическое исследование аспирата костного мозга с подсчетом миелограммы. Цитохимическое исследование

Цель: ознакомиться с изменениями в костном мозге при онкогематологических заболеваниях. Научиться определять вариант лейкоза на основе данных цитохимических реакций.

Конкретные задачи: изучить причины изменений лейкоцитарного, эритроцитарного и тромбоцитарного ростков при лейкозах. Оценить мазки костного мозга при лейкозах, миелодиспластических процессах, парапротеинемиях. Дифференцировать мазки крови при острых и хронических лейкозах. Научиться оценивать изменения в клетках при проведении цитохимических реакций.

Форма проведения практического занятия: практическое занятие.

Продолжительность занятия: 4 академических часа.

Основные понятия

Объектом изучения специалиста морфолога является фиксированная и окрашенная клетка, морфология которой определяется соразмерно возрасту и функции, которую она выполняет в организме.

МИЕЛОГРАММА – исследование пунктата костного мозга, позволяющее дать характеристику костномозгового кроветворения. Включает в себя:

- оценку клеточности костного мозга;
- процентного состава миелокарицитов;
- индексов миелограммы;
- описание миелограммы;
- морфологических особенностей гемопоэза.

Позволяет оценить:

1. основные отклонения от референтных значений клеточного состава исследуемого пунктата, в частности:

- бластную трансформацию;
- гиперплазию ростков: миелоидного, лимфоидного, плазмочитарного, мегакариоцитарного или эритроидного на различных стадиях кроветворения.

2. сохранность или подавление ростков миелоидного кроветворения (эритропоэза, мегакарицитопоэза, гранулопоэза);

3. костномозговые индексы: миело/эритро, индекс созревания нейтрофилов, индекс созревания эритрокариоцитов;

4. показатели миелограммы и сопоставить их с результатами исследования жидкой части костного мозга (количество миелокариоцитов и мегакариоцитов в 1 мкл костного мозга) и показателями периферической крови.

Полученные результаты подсчета количества миелокариоцитов, мегакариоцитов, миелограммы и индексов мозгового кроветворения сравниваются с референтными значениями состава клеток пунктата костного мозга. В большинстве отечественных руководств используют референтные значения результатов исследования пунктата костного мозга, полученные Соколовым В.В. и Грибовой И.А. в 1972 г. и Грибовой И.А., Воробьевым А.И., 2002 г. (табл. 2).

Таблица 2

Клетки нейтрофильного ряда:	миелобласты	0,2-1,7
	промиелоциты	1,0-4,1
	миелоциты	7,0-12,2
	метамиелоциты	8,0-15,0
	палочкоядерные	12,8-23,7
	сегментоядерные	13,0-24,1
Всего клеток нейтрофильного ряда:		52,7 до 68,9% (в среднем 60,8%)
Базофильные гранулоциты		0-0,5
Эозинофильные гранулоциты:	эозинофильный миелоцит	0-0,2
	эозинофильный метаиелоцит	0,1-0,4
	эозинофилы	0,4-5,2
Эозинофилы всех генераций		0,5 - 5,8
Клетки эритроидного ряда:	эритробласты	0,2- 1,1
	пронормоциты	0,1-1,2
	базофильные нормоциты	1,4- 4,6
	полихроматофильные нормоциты	8,9-16,9
	оксифильные нормоциты	0,8-5,6
Всего клеток эритроидного ряда		14,5-26,5 (в среднем 20,5%)
Всего клеток лимфоидного ряда		4,3-13,7 (в среднем 9%)
Плазматические клетки		0,1-1,8
Всего клеток моноцитарного ряда		0,7-3, 1 (в среднем 1,9%)
Клетки стромы		0,1-1,6
Макрофаги		0,1-0,4
Мегакариоциты		0,2-0,6

ЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Цитохимический анализ – это изучение химико-морфологического строения клеток в микроскопических препаратах с помощью гистохимических реакций, в процессе которых происходит окрашивание исследуемого субстрата.

При цитохимическом исследовании чаще пользуются полуколичественной оценкой результатов, используя принцип Астальди, основанный на выявлении различной степени интенсивности специфической окраски. В зависимости от нее исследуемые элементы делят на 4 группы:

- с отрицательной реакцией (—);
- слабоположительной (+);
- положительной (+ +);
- резко положительной (+ + +).

Для количественного выражения результатов подсчитывают 100 клеток определенного вида, дифференцируя их по указанному принципу, затем число клеток с одинаковой интенсивностью окраски умножают на соответствующее данной группе число плюсов, сумма этих произведений составляет условные единицы.

Метод полуколичественной оценки является ориентировочным, но позволяет сравнить распределение исследуемых веществ в различных клеточных элементах или в одних и тех же клетках при тех или иных патологических состояниях. Следует, однако, иметь в виду, что цитохимический метод может использоваться только в качестве дополнения к другим методам исследования – морфологическим, иммунологическим, цитогенетическим.

НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫЕ ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

Гликоген

За счет гликогена в основном обеспечиваются энергетические потребности клеток. В частности, за счет реакций гликогенолиза образуется энергия, необходимая для осуществления функции фагоцитоза. Локализуется гликоген в цитоплазме клеток. Для цитохимического выявления гликогена чаще всего применяют PAS-реакцию, или ШИК-реакцию (по названию реактива — шифф-йодная кислота).

Липиды

Липиды локализуются в цитоплазме клеток, главным образом, в мембранах органелл и обнаруживаются преимущественно в нейтрофильных гранулоцитах. Играют важную роль в проницаемости мембран. Клетки костного мозга и периферической крови содержат простые липиды в виде нейтральных жиров, свободных жирных кислот, а также сложные

липиды – фосфолипиды. В гематологических исследованиях чаще применяется окраска мазков Суданом III.

Пероксидаза (миелопероксидаза)

В реакции, катализируемой пероксидазой, перекись водорода восстанавливается за счет соединений, выступающих в качестве доноров электронов, таких как аскорбат, хиноны или цитохром С. Пероксидаза локализуется преимущественно в специфической зернистости цитоплазмы гранулоцитов, является маркером клеток миелоидной природы. Она отсутствует в лимфоидных клетках. Ввиду специфичности для нейтрофилов, начиная с ранних фаз созревания, фермент получил название миелопероксидаза. Активность пероксидазы подвержена большим колебаниям.

Определение активности миелопероксидазы как маркера миелоидного ряда используется для дифференциальной диагностики острых миелобластных и лимфобластных лейкозов.

Щелочная фосфатаза

Активность щелочной фосфатазы выявляется впервые на стадии метамиелоцита, повышается по мере дифференцировки до сегментоядерного нейтрофила, а затем по мере старения клетки вновь снижается. Активность фермента определяется в специфических гранулах цитоплазмы.

Кислая фосфатаза

Активность кислой фосфатазы обнаруживается преимущественно в нейтрофилах и лимфоцитах крови (максимально в нейтрофильных миелоцитах); локализацию связывают с лизосомами цитоплазмы клеток. Кислая фосфатаза является гидролитическим ферментом (оптимум действия при pH 5,2).

Неспецифические эстеразы

Неспецифические эстеразы – это группа ферментов (гидролаз) с невысокой специфичностью, расщепляющих эфиры карбоновых кислот с короткой углеродной цепью. Локализуются в цитоплазме клеток, главным образом, в лизосомах. Активность этих ферментов в той или иной степени выявляется во всех видах лейкоцитов (максимально в незрелых гранулоцитах и моноцитах). Наибольшая активность обнаружена в моноцитах крови.

Задания для выполнения

1. Провести микроскопическое исследование препаратов периферической крови и костного мозга пациентов с различными вариантами лейкозов. Посчитать лейкоцитарную формулу, описать изменения морфологии всех клеточных линий. Рассказать, к какой группе могут относиться данные изменения (морфологические, патогенетические особенности).

Оценить результат цитохимических реакций.

2. Провести микроскопическое исследование препаратов периферической крови пациентов с острыми лейкозами. Посчитать лейкоцитарную формулу, описать изменения лейкоцитарного звена (и других клеток при необходимости). Рассказать, каким состояниям могут соответствовать выявленные изменения. Составить алгоритм дальнейшего лабораторного поиска. Оценить результат цитохимических реакций.

3. Провести микроскопическое исследование препаратов периферической крови пациентов с хроническими лейкозами. Посчитать лейкоцитарную формулу, описать изменения лейкоцитарного звена (и других клеток при необходимости). Рассказать, каким состояниям могут соответствовать выявленные изменения. Составить алгоритм дальнейшего лабораторного поиска. Оценить результат цитохимических реакций.

4. Провести микроскопическое исследование препаратов периферической крови пациентов с миелодиспластическим синдромом. Посчитать лейкоцитарную формулу, описать изменения лейкоцитарного звена (и других клеток при необходимости). Рассказать, каким состояниям могут соответствовать выявленные изменения. Составить алгоритм дальнейшего лабораторного поиска. Оценить результат цитохимических реакций.

5. Провести микроскопическое исследование препаратов костного мозга пациентов с острыми лейкозами. Посчитать миелограмму, описать изменения всех ростков кроветворения. Рассказать, каким состояниям могут соответствовать выявленные изменения. Составить алгоритм дальнейшего лабораторного поиска. Оценить результат цитохимических реакций.

6. Провести микроскопическое исследование препаратов костного мозга пациентов с хроническими лейкозами. Посчитать миелограмму, описать изменения всех ростков кроветворения. Рассказать, каким состояниям могут соответствовать выявленные изменения. Составить алгоритм дальнейшего лабораторного поиска. Оценить результат цитохимических реакций.

7. Провести микроскопическое исследование препаратов костного мозга пациентов с парапротеинемией. Посчитать миелограмму, описать изменения всех ростков кроветворения. Рассказать, каким состояниям могут соответствовать выявленные изменения. Составить алгоритм дальнейшего лабораторного поиска. Оценить результат цитохимических реакций.

8. Провести микроскопическое исследование препаратов костного мозга пациентов с миелодиспластическим синдромом. Посчитать миелограмму, описать изменения всех ростков кроветворения. Рассказать, каким состояниям могут соответствовать выявленные изменения. Составить алгоритм дальнейшего лабораторного поиска. Оценить результат

цитохимических реакций.

Задания для самоподготовки (контрольные вопросы текущего контроля)

1. Современная схема кроветворения.
2. Морфологические характеристики клеток костного мозга.
3. Современная классификация острых лейкозов.
4. Классификация хронических лейкозов.
5. Окраска мазков крови и костного мозга.
6. Правила проведения цитохимических реакций.

Наглядные материалы для выполнения работы по теме: микроскопы, окрашенные препараты крови, счетчики клеток крови, бланки для записи лейкоцитарных формул.

Литература:

1. Луговская С.А. Гематологический атлас / Луговская С.А., Почтарь М.Е. – М.: Триада, 2016. – 434 с.: ил.
2. Клиническая лабораторная диагностика Учебник : в 2-х томах. / под ред. профессора В. В.Долгова. — М. : Лабдиаг, Том 1— 688 с, 2017., Том 2. - - 780 с., 2018 г.
3. Руководство по лабораторным методам диагностики [Электронный ресурс] / Кишкун А.А. - 2-е изд., перераб. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. – Режим доступа: <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970431023.html>

РАЗДЕЛ 2

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ В ОНКОГЕМАТОЛОГИИ

2.1. Иммунофенотипирование при острых лейкозах

Цель: изучение значения иммунофенотипирования (далее ИФТ) клеток костного мозга в диагностике острых лейкозов

Конкретные задачи: изучить особенности иммунофенотипа при острых миелобластных и острых лимфобластных лейкозах. Освоить трактовку результатов, полученных при проточной цитометрии при острых лейкозах.

Форма проведения практического занятия: практическое занятие.

Продолжительность занятия: 4 академических часа

Основные понятия

Острый лейкоз – это клональное злокачественное новообразование, в основе которого лежит дефект стволовых клеток различного уровня, либо поражение клеток-предшественников. Морфологическим субстратом заболевания являются неопластически трансформированные клетки, обладающие способностью к подавлению нормального гемопоэза и инфильтрирующие костный мозг, постепенно вытесняя и угнетая нормальные ростки кроветворения. Алгоритм диагностики острых лейкозов в современной клинике основан на пяти базовых компонентах:

- получение клинических данных;
- морфологический анализ бластов;
- цитохимический анализ бластов;
- иммунофенотипирование методом проточной цитометрии;
- цитогенетическое/молекулярно-генетическое исследование.

Революционное значение для диагностической иммунологии и гематологии оказала разработка методов получения моноклональных антител, что было подтверждено в 1984 году присуждением Нобелевской премии Kohler и Milstein вместе с Jerne за вклад в развитие теоретической иммунологии и биотехнологии. Иммунодиагностика гемобластозов основана на сопоставлении морфофункциональных характеристик лейкозных бластов и нормальных/нетрансформированных клеток гемопоэза. По набору мембранных и цитоплазматических антигенов можно установить линейную принадлежность, стадию зрелости и функциональное состояние клетки. С начала 80-х годов XX века, когда развитие

моноклональных антител пошло по экспоненте, стало возможным нарастающее по сложности иммунофенотипирование. К настоящему времени ИФТ превратилось в быстрый и полезный способ получения подробной характеристики опухолевых клеток, необходимой для диагностики острых лейкозов.

Для иммунофенотипирования острых лейкозов достаточна оценка экспрессии маркеров скрининговой панели (BCSH, 2002):

(a) миелоидные маркеры: МПО, CD13, CD33;

(b) Лимфоидные маркеры:

1. Маркеры Т-лимфоцитов — CD2, CD7, cyCD3 и sCD3;

2. Маркеры В-лимфоцитов — CD10, CD19, cyCD22 и sCD22.

3. Незрелость клетки характеризуют TdT, CD34, HLA-DR.

Задания для выполнения

1. Рассказать об особенностях иммунофенотипирования различных вариантов острых лейкозов.

2. Провести трактовку полученных данных от пациентов с острыми миелолейкозами и сопоставить с данными миелограммы и цитохимических исследований.

3. Провести трактовку полученных данных от пациентов с острыми лимфолейкозами и сопоставить с данными миелограммы и цитохимических исследований.

Задания для самоподготовки (контрольные вопросы текущего контроля)

1. Понятие кластеров дифференцировки.

2. Схема кроветворения с основными фенотипическими характеристиками.

3. Иммуноцитохимические исследования.

4. Иммунофенотипирование: показания, трактовка.

5. Проточная цитометрия в практике современной лаборатории.

Литература:

1. Луговская С.А. Гематологический атлас / Луговская С.А., Почтарь М.Е. – М.: Триада, 2016. – 434 с.: ил.

2. Клиническая лабораторная диагностика Учебник : в 2-х томах. / под ред. профессора В. В.Долгова. — М. : Лабдиаг, Том 1— 688 с, 2017., Том 2. - - 780 с., 2018 г.

3. Руководство по лабораторным методам диагностики [Электронный ресурс] / Кишкун А.А. - 2-е изд., перераб. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. – Режим доступа: <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970431023.html>

2.2. Иммунофенотипирование при лимфопролиферативных заболеваниях

Цель: изучение значения иммунофенотипирования клеток костного мозга в диагностике при различных лимфопролиферативных заболеваниях

Конкретные задачи: изучить особенности иммунофенотипа при различных лимфопролиферативных заболеваниях. Освоить трактовку результатов полученных при проточной цитометрии при различных лимфопролиферативных заболеваниях.

Форма проведения практического занятия: практическое занятие.

Продолжительность занятия: 4 академических часа.

Основные понятия

Проточная цитометрия является интегральным инструментом изучения различных биологических систем с помощью регистрации флюоресценции и использования флюоресцентных красителей, способных связываться с различными компонентами клетки. Диагностика лейкозов, лимфом в настоящее время одна из наиболее передовых областей использования проточной цитометрии. Иммунофенотипирование клеток крови и костного мозга обеспечивает ключевой информацией для качественной диагностики и оценки прогноза заболевания.

Иммунофенотипирование клеток – это определение маркеров, кластеров дифференцировки на поверхности клеток и внутриклеточно с целью определения линейной принадлежности опухолевых лимфоидных клеток (Т- или В-), стадии их дифференцировки.

Иммунофенотипирование проводится с применением моноклональных антител к различным кластерам дифференцировки. По набору выявленных мембранных и цитоплазматических антигенов можно установить фенотип пролиферации клеток и возможно определение варианта лимфопролиферативного заболевания в соответствии с классификацией ВОЗ.

В настоящее время для диагностики лимфопролиферативных заболеваний методом проточной цитометрии стандартизованного набора моноклональных антител не существует. Иммунофенотипирование включает набор для диагностики:

1. В- клеточные маркеры: CD19, CD22, CD10, CD20, CD23, FMC7; CD10;
2. Т- клеточные маркеры: CD7, CD2, CD1a, CD5, CD3, CD4, CD8;
3. Определение клональности - легкие цепи иммуноглобулинов Kappa, Lambda; тяжелая цепь иммуноглобулинов M;
4. CD25, CD11c- для диагностики волосатоклеточного лейкоза;
5. CD138, CD56, CD38 - для диагностики миеломы, плазмоклеточного лейкоза.

Задания для выполнения

1. Рассказать об особенностях иммунофенотипирования В-клеточных лейкозы.
2. Рассказать об особенностях иммунофенотипирования Т-клеточных лейкозов.
3. Рассказать об особенностях иммунофенотипирования для диагностики миеломы.
4. Освоить трактовку результатов, полученных при проточной цитометрии при В-клеточных лейкозах.
5. Освоить трактовку результатов, полученных при проточной цитометрии при Т-клеточных лейкозах.

Задания для самоподготовки (контрольные вопросы текущего контроля)

1. Понятие кластеров дифференцировки.
2. Схема кроветворения с основными фенотипическими характеристиками.
3. Проточная цитометрия как метод дифференцировки различных вариантов лейкозов.
4. Иммунофенотипирование при лимфопролиферативных процессах.

Литература:

1. Луговская С.А. Гематологический атлас / Луговская С.А., Почтарь М.Е. — М.: Триада, 2016. — 434 с.: ил.
2. Клиническая лабораторная диагностика Учебник: в 2-х томах. / под ред. профессора В. В.Долгова. — М.: Лабдиаг, Том 1— 688 с, 2017., Том 2. - - 780 с., 2018 г.
3. Руководство по лабораторным методам диагностики [Электронный ресурс] / Кишкун А.А. - 2-е изд., перераб. и доп. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. — Режим доступа: <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970431023.html>

РАЗДЕЛ 3

ЦИТОГЕНЕТИКА В ОНКОГЕМАТОЛОГИИ

3.1. Цитогенетические исследования в онкогематологии

Цель: познакомиться с основами цитогенетических методов при диагностике онкогематологических заболеваний.

Конкретные задачи: изучить показания к проведению цитогенетических исследований, правила проведения, требования к выполнению данной группы исследований у пациентов с подозрением на онкогематологические заболевания, при подтверждении диагноза, контроле за течением заболевания и для оценки результата терапии.

Форма проведения практического занятия: семинар.

Продолжительность занятия: 6 академических часов

Основные понятия

Молекулярно-биологические методы применяются для установления диагноза, составления прогноза, оценки эффективности и определения тактики лечения гемобластозов. Результаты исследований, проведенных при помощи молекулярных методов, не противоречат, но существенно дополняют канонические цитоморфологические и цитохимические критерии диагностики. Аномальный иммунофенотип определяют при помощи проточной цитофлуориметрии. Использование широкой панели антител дает возможность определить природу опухолевых клеток, установить правильный диагноз, без чего невозможно проведение адекватного лечения. Кроме того, проточная цитофлуориметрия применяется и для мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ).

Достижения в области молекулярной биологии в последние годы позволили расшифровать или значительно прояснить патогенез многих гематологических заболеваний. Молекулярные методы стали широко применяться в практической гематологии. В диагностике и мониторинге опухолей клеток костного мозга они имеют особое значение. Помогает в диагностике наличие уникально перестроенных генов вариабельного региона антигенных рецепторов в каждой клеточной линии. Гемобластозы часто сопровождаются высокоспецифичными генетическими аномалиями, определение которых имеет диагностическое значение.

Классические методы цитогенетического анализа позволяют получить неоценимую информацию при установлении диагноза в дебюте заболевания. Диагностика гемобластозов

стала более надежной с появлением специфических молекулярных зондов, при помощи которых можно проводить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) и выявлять хромосомные aberrации даже в неделящихся клетках. Кроме того, метод FISH позволяет с высокой чувствительностью обнаруживать остаточные опухолевые клетки, что крайне необходимо при мониторинге МОБ. Применение молекулярных методов, в особенности метода ПЦР, для диагностики гемобластозов стало возможным в результате накопления данных о молекулярных механизмах возникновения этих заболеваний. В настоящее время охарактеризованы многие генетические дефекты, которые приводят к неопластической трансформации кроветворных клеток. Были исследованы на молекулярном уровне области слияния материала разных хромосом, которые обмениваются своими частями в результате многочисленных повторяющихся транслокаций – маркеров гемобластозов, которые ранее были исследованы и классифицированы с помощью цитогенетических методов. Современные цитогенетические методы, включая флуоресцентную *in situ* гибридизацию, обладают большой диагностической и научной ценностью, которая раскрывается в открытии новых хромосомных перестроек, в точной идентификации вовлеченных в перестройки хромосом и генов, а также в контроле хода течения заболевания. Не последнее место в работе занимает геномное секвенирование, которое способно распознать не только точечные мутации, tandemные повторы, но и сложные распады на кусочки отдельных хромосом и сегментов с последующим их беспорядочным воссоединением, получившее специальное название хромотрипсиса.

Задания для выполнения

1. Определить роль метода ПЦР в диагностике гемобластозов.
2. Дать характеристику методу FISH гибридизации, представить примеры изменений для различных вариантов лейкозов.
3. Провести стандартное кариотипирование – оценить его роль в диагностике гемобластозов.
4. Метод секвенирования для диагностики онкогематологических заболеваний.

Задания для самоподготовки (контрольные вопросы текущего контроля)

1. Цитогенетические исследования: показания, методы получения материала.
2. Роль молекулярно-генетических методов в онкогематологии.
3. Понятие о минимальной остаточной болезни (МОБ).
4. Современные методы оценки МОБ.

Литература:

1. Луговская С.А. Гематологический атлас / Луговская С.А., Почтарь М.Е. – М.: Триада, 2016. – 434 с.: ил.
2. Клиническая лабораторная диагностика Учебник: в 2-х томах. / под ред. профессора В. В. Долгова. — М.: Лабдиаг, Том 1— 688 с, 2017., Том 2. - - 780 с., 2018 г.
3. WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. / Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al.// IARC. Lyon.– 2017. – Revised 4th Ed. – P. 588
4. Диагностика онкогематологических заболеваний с помощью проточной цитометрии./Зуева Е.Е., Русанова Е.Б., Куртова А.В. – Спецлит 2017, 327с.

ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России

Сертификат 01D9A9C6655B6ED0000BADF200060002

Владелец Пармон Елена Валерьевна

Действителен с 28.06.2023 по 28.06.2024

