

Гематологические аспекты в морфологии. В 2.



Для ФУВ.

Трошина Н.В.



ГЕМОБЛАСТОЗЫ.

- Гемобластозы — опухолевые заболевания кроветворной и лимфатической ткани.
- Гемобластозы подразделяют на системные заболевания — *лейкозы*, регионарные — *лимфомы*.
- Отличия между лейкозами и лимфомами заключаются не только в наличии или отсутствии системности поражения.
- Известно, что в терминальной стадии лимфомы дают обширное метастазирование, в том числе и в костный мозг.
- Другим важным отличием лейкозов от лимфом является то, что при лейкозах опухоль первично возникает на "территории" костного мозга, а при лимфомах костный мозг поражается вторично в результате метастазирования.

- При лейкозах опухолевые клетки, как правило, обнаруживаются в крови, поэтому в литературе используется термин для обозначения лейкозов, предложенный еще К.Вирховым, "лейкемия".
- В последние годы в литературе широко обсуждается вопрос о существовании предопухолевой стадии лейкозов и лимфом.
- Предлагаются термины "предлейкоз" и "предлимфома" для обозначения состояний с различными качественными и количественными изменениями кроветворной ткани, нередко предшествующими развитию гемобластозов



Эпидемиология.

- Опухоли кроветворной и лимфоидной ткани в числе пяти самых распространенных опухолей человека. Среди опухолей детей первых 5 лет жизни на их долю приходится 30 % случаев.

Этиология.

- Как все опухоли, гемобластозы могут вызываться разнообразными мутагенными факторами экзогенного и эндогенного происхождения, действующими на стволовые и полустволовые клетки-предшественницы.
- Большое значение в возникновении ряда гемобластозов имеет наследственный фактор.
- Роль ионизирующей радиации в возникновении гемобластозов доказывается наблюдениями за пациентами, заболевшими лейкозами и лимфомами через определенное время после атомной бомбардировки Японии, аварий на АЭС, ядерных испытаний.
- Описаны случаи заболеваний у людей, получавших радиотерапию, а также у врачей-радиологов.
- Известен цитогенетический маркер радиационного поражения — *кольцевидная хромосома*.

- Роль химических канцерогенов доказывается данными экспериментов, наблюдениями за пациентами, работавшими на вредных предприятиях с использованием бензола,
- а также за больными, получавшими цитостатическую терапию по поводу других онкологических заболеваний.
- Использование таких цитостатических препаратов, как мелфалан, азатиоприн, лейкеран, миелосан, антибиотика левомецетина, может приводить к возникновению острого и хронического миелолейкоза, острого миеломонобластного лейкоза и эритромиелоза.

- Роль вирусов в качестве этиологического фактора гемобластозов трактуется неоднозначно.
- В развитии гемобластозов человека доказано участие лишь двух вирусов: вируса Эпштейна — Барр (африканская лимфома Беркитта) и Т-лимфоцитарного вируса лейкоза человека первого типа (Т-клеточная лимфома и Т-клеточные лейкозы).
- Имеются экспериментальные данные, доказывающие прямое канцерогенное действие вирусов на гемопоэтические клетки посредством вирусных онкогенов.
- Однако в большинстве ситуаций внедрение вирусов в клетку вызывает лишь иммортализацию (бессмертие) последней, на фоне которой возникают дополнительные перестройки генома, ведущие к злокачественной трансформации (многоступенчатый канцерогенез).

- Роль наследственности в развитии гемобластозов подтверждается частым развитием лейкозов у людей с наследственными заболеваниями со спонтанными разрывами хромосом (болезни Дауна, Блума, анемия Фанкони),
- с нерасхождением половых хромосом (болезни Клайнфелтера, Тернера),
- а также существованием "лейкозных семей".
- Нередко лейкозы развиваются у пациентов с наследственными дефектами иммунитета (атаксия-телеангиэктазия, или синдром Луи-Бар, синдром Вискотта — Олдриджа, болезнь Братона).



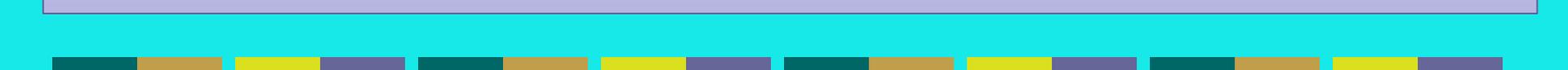
Патогенез.

- Множество этиологических факторов, воздействуя на стволовые и полустволовые гемопоэтические клетки, приводят к одинаковым результатам — злокачественной трансформации.
- Следовательно, существует так называемое узкое место, через которое могут осуществлять свое воздействие различные агенты.
- Такое место, вероятнее всего, находится в геноме клеток, где располагаются протоонкогены и антионкогены.

- 
- При этом могут происходить усиление экспрессии, амплификация, точечная мутация или другие изменения протоонкогенов, превращение их в клеточные онкогены, что приводит к развитию опухоли.
 - Хромосомные перестройки могут привести к передислокации протоонкогена в зону влияния *гена-энхансера*, превращению его в клеточный онкоген и усилению экспрессии.
- 

- Так, при лимфоме Беркитта происходит реципрокная транслокация между хромосомами 8 и 14g32.
- Клеточный онкоген c- тус из хромосомы 8 перемещается на хромосому 14 и попадает в зону действия генов, регулирующих синтез тяжелых цепочек иммуноглобулинов.
- Описанные изменения сочетаются также с точечной мутацией N- ras.

- При хроническом миелолейкозе нередко встречается филадельфийская хромосома, образовавшаяся в результате реципрокной транслокации между хромосомами 9 и 22.
- Образуется новый ген-гибрид *c-abl-bcr*, белковый продукт которого обладает тирозинкиназной активностью

- 
- Онкогены обычно встраиваются в разрывы хромосом.
 - Так, при В-лимфоцитарных лимфомах и лейкозах происходят разрывы в хромосоме 14 в локусе 32q, где локализируются гены тяжелых цепочек иммуноглобулинов.
 - При Т-лимфоцитарных лейкозах и лимфомах — в локусе 11q гена α -цепочек рецепторов Т-лимфоцитов.
- 



Морфогенез.

- Развитие гемобластозов начинается с малигнизации одной стволовой или полустволовой клетки, дающей пул опухолевых клеток.
- Это означает, что все гемобластозы имеют моноклоновое происхождение

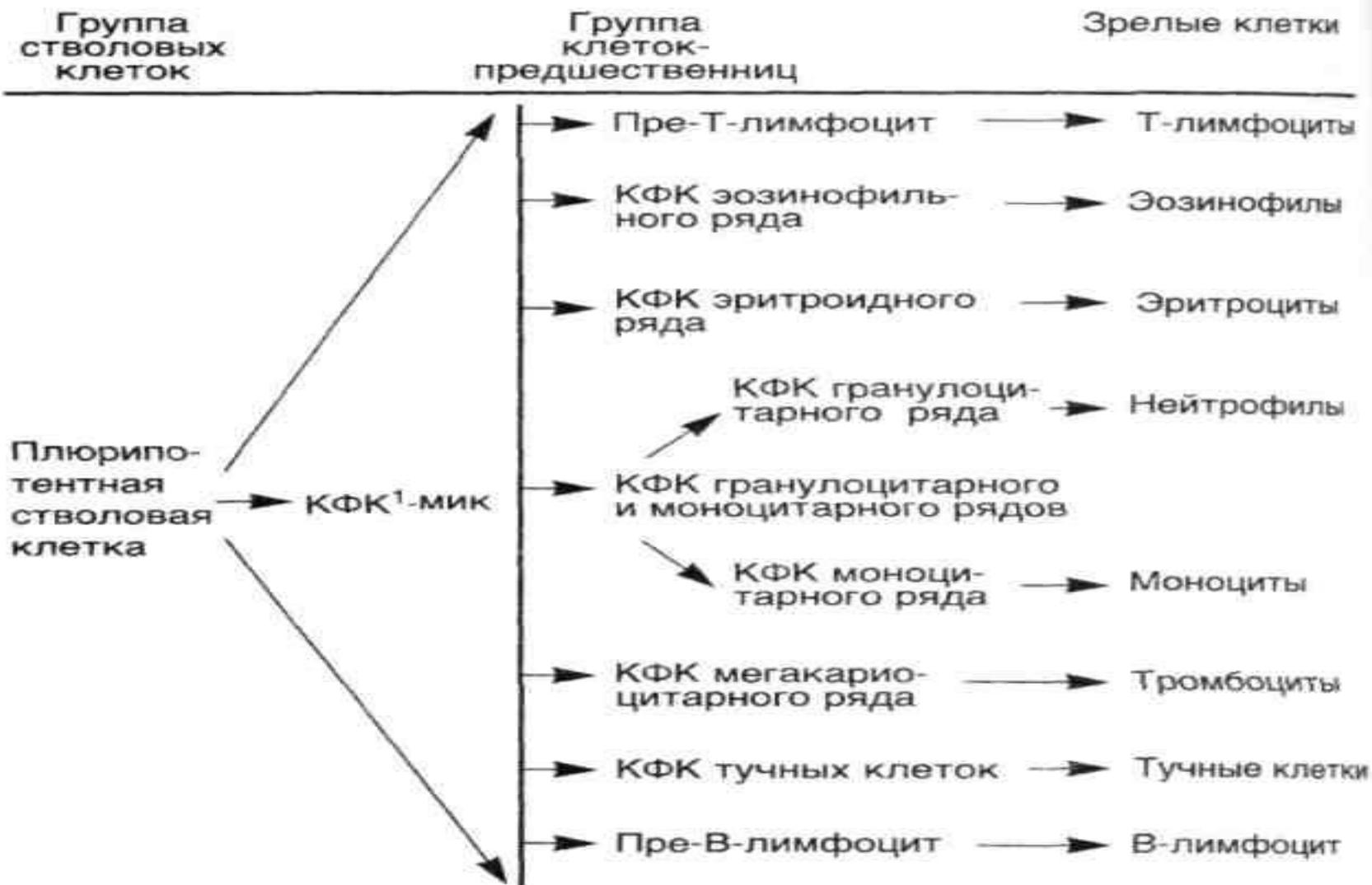
Моноклоновость.

- подтверждается экспериментальными и клиническими данными по обнаружению во всех опухолевых клетках одного и того же больного клоновой метки — хромосомной или изоферментной.
- Например, во всех опухолевых клетках при хроническом миелолейкозе присутствует филадельфийская хромосома.

Стволовые клетки.

- составляют примерно 0,01—0,001 % всей популяции костномозговых клеток.
- Рост и дифференцировка стволовых и полустволовых клеток-предшественниц управляются факторами роста и стромальным микроокружением, что подтверждается экспериментами с клеточными культурами, где рост и дифференцировка клеток происходят только в присутствии факторов роста или стромальных клеток.
- Стромальные клетки, вероятно, также выделяют факторы роста, связанные с их клеточными мембранами, а также гепарансульфатами стромы, обеспечивая тем самым локальный рост.

Структура гемопоэтической системы



ЛЕЙКОЗЫ.

- При лейкозах опухолевая ткань первоначально разрастается на "территории" костного мозга и постепенно замещает нормальные ростки кроветворения.
- Вероятно, речь идет не о простом механическом вытеснении, а скорее о подавлении нормальных ростков клоном лейкозных клеток с участием особых факторов и контактного торможения.
- В результате этого процесса у больных лейкозами закономерно развиваются различные варианты цитопений — анемия, тромбоцитопения, лимфоцитопения, гранулоцитопения, что приводит к повышенной кровоточивости, кровоизлияниям, подавлению иммунитета с присоединением инфекционных осложнений.

Принципы классификации лейкозов.

- Выделяют пять основных принципов классификации:
- 1. по характеру течения лейкозов;
- 2. по степени дифференцировки опухолевых клеток;
- 3. в соответствии с цитогенезом;
- 4. на основе иммунного фенотипа опухолевых клеток;
- 5. по общему числу лейкоцитов и наличию бластных клеток в периферической крови.



По характеру течения

- выделяют острые, протекающие менее года, и хронические, существующие длительное время.

По степени дифференцировки опухолевых клеток

- выделяют недифференцированные, бластные и цитарные лейкозы.
- При **высоком блоке** дифференцировки лейкозные клетки могут напоминать стволовые и бластные клетки первых четырех классов клеток-предшественниц.
- Поэтому по степени дифференцировки эти лейкозы называют *бластными и недифференцированными*.
- Поскольку они протекают остро, то можно говорить, что острые лейкозы — это бластные и недифференцированные лейкозы.

- 
- При **низком блоке** дифференцировки лейкозные клетки напоминают процитарные и цитарные клетки-предшественницы, лейкозы протекают менее злокачественно, хронически и называются *цитарными*.



Цитогенетические варианты лейкозов

- основываются на представлениях о кроветворении.
 - Острые лейкозы по цитогенезу подразделяются на лимфобластный, миелобластный, монобластный, миеломонобластный, эритромиелобластный, мегакариобластный, недифференцированный.
- 

- **Хронические лейкозы** представлены лейкозами
 - миелоцитарного происхождения (хронический миелоцитарный лейкоз, хронический нейтрофильный лейкоз, хронический эозинофильный лейкоз, хронический базофильный лейкоз, миелосклероз),
 - лимфоцитарного происхождения (хронический лимфолейкоз,
 - парапротеинемические лейкозы: миеломная болезнь, первичная макроглобулинемия Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей Франклина; лимфоматоз кожи — болезнь Сезари),
 - моноцитарного происхождения (хронический моноцитарный лейкоз, гистиоцитоз X).



Иммунный фенотип опухолевых клеток.

- В настоящее время стало возможным проводить более точное типирование опухолевых клеток в зависимости от их иммунного фенотипа по экспрессии CD19, CD20, CD5, легких цепочек иммуноглобулинов и других антигенных маркеров.

По общему числу лейкоцитов в периферической крови и наличию лейкозных клеток

- выделяют лейкемические (более $50—80 \cdot 10^9/\text{л}$ лейкоцитов, в том числе бластов),
- сублейкемические ($50—80 \cdot 10^9/\text{л}$, в том числе бласты),
- лейкопенические (содержание лейкоцитов в периферической крови ниже нормы, то есть бласты),
- алейкемические (содержание лейкоцитов в периферической крови ниже нормы, бласты отсутствуют).



Морфологическое исследование

- имеет большое значение в диагностике лейкозов.
- Основными методами прижизненной морфологической диагностики являются исследования мазков периферической крови и биоптатов костного мозга, которые получают при трепанации гребешка подвздошной кости или пункции грудины, а также других органов.

Острые лейкозы.

- Различные формы острого лейкоза имеют стереотипные морфологические проявления: лейкозная инфильтрация костного мозга в виде очаговых и диффузных инфильтратов из клеток с крупными светлыми ядрами, содержащими по несколько ядрышек.

- 
- Размеры и очертания ядер, а также ширина ободка цитоплазмы могут варьировать.
 - Бласты составляют 10—20 % костномозговых клеток.
 - Цитогенетическую принадлежность бластов, как правило, можно выявить только с помощью специальных методов исследования — цитохимических и иммуногистохимических

- Применяются реакции на пероксидазу, окраска на липиды Суданом черным, ШИК-реакция, гистоферменто-химические реакции на выявление неспецифической эстеразы, хлорацетатэстеразы, кислой фосфатазы.
- Иммуногистохимически возможно определение маркеров В-, Т- лимфоцитов, клеток миелоидного и моноцитарного рядов.

- В периферической крови и в костном мозге описывается феномен лейкемического провала , развивающийся за счет наличия только бластных и дифференцированных клеток и отсутствия промежуточных форм.
- В костномозговой ткани происходят вытеснение нормальных клеток гемопоэза опухолевыми, истончение и резорбция ретикулярных волокон, нередко развивается миелофиброз.
- При цитостатической терапии происходит опустошение костного мозга с гибелью бластных форм, увеличивается число жировых клеток и разрастается соединительная ткань.

- Лейкозные инфильтраты в виде диффузных или очаговых скоплений обнаруживаются в лимфатических узлах, селезенке и печени.
- Это приводит к увеличению размеров этих органов. В печени характерно развитие жировой дистрофии.
- В связи с лейкозной инфильтрацией слизистых оболочек полости рта и ткани миндалин появляются некротический гингивит, тонзиллит — некротическая ангина.
- Иногда присоединяется вторичная инфекция и развивается сепсис, приводящий больных к смерти.

- В результате тромбоцитопении, повреждения печени и стенок сосудов у больных острыми лейкозами нередко возникает геморрагический синдром вплоть до развития смертельных осложнений — кровоизлияний в головной мозг и желудочно-кишечных кровотечений.
- Использование активной цитостатической терапии повлияло на течение острых лейкозов, т.е. привело к индуцированному лекарственному патоморфозу.

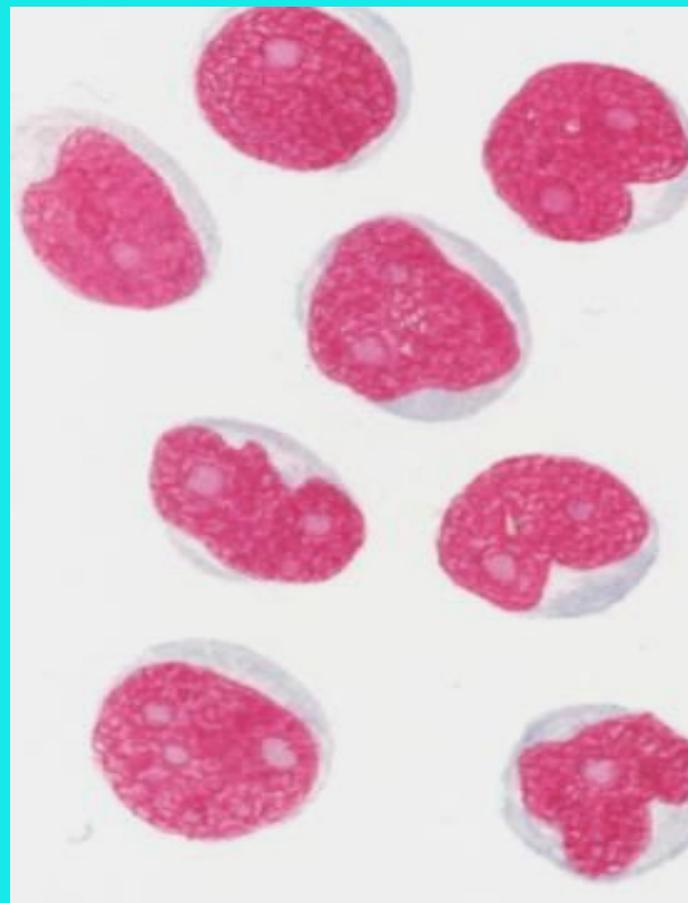
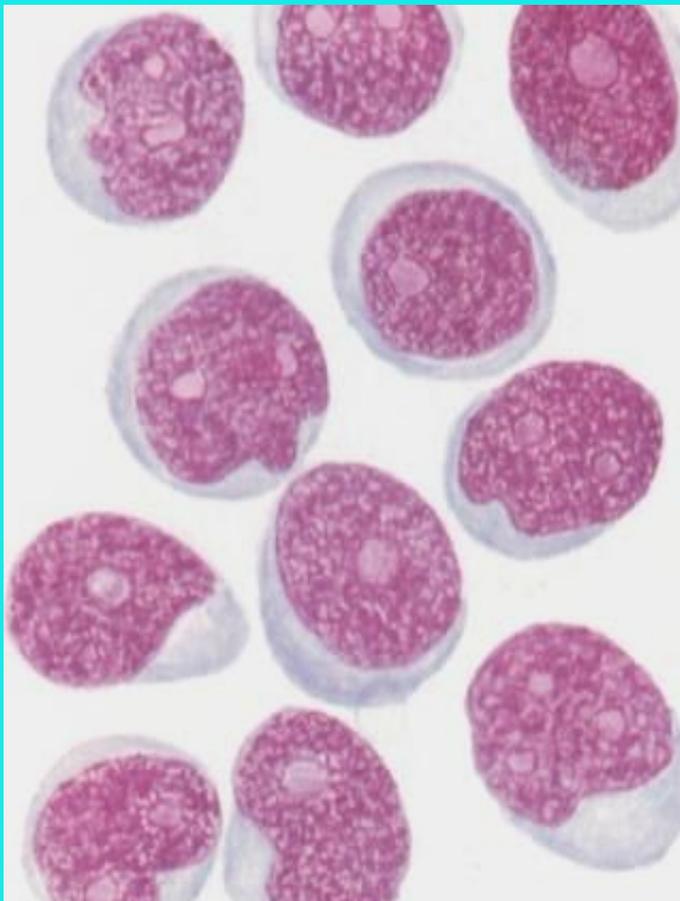


В связи с этим в настоящее время выделяют следующие клинические стадии заболевания:

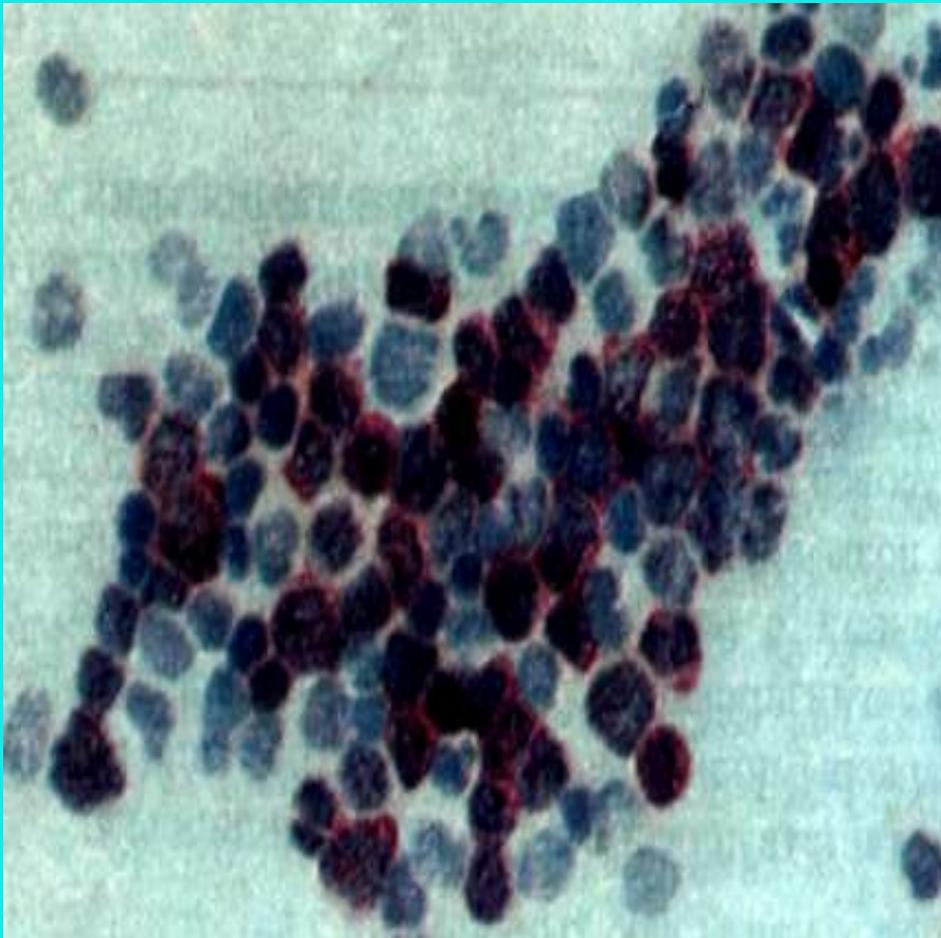
- *первая атака,
- *ремиссия (полная или неполная),
- *рецидив (первый, повторный).

Наибольшее значение среди острых лейкозов имеют острый лимфобластный и острый миелобластный лейкозы.

Клетки лимфобластного лейкоза.

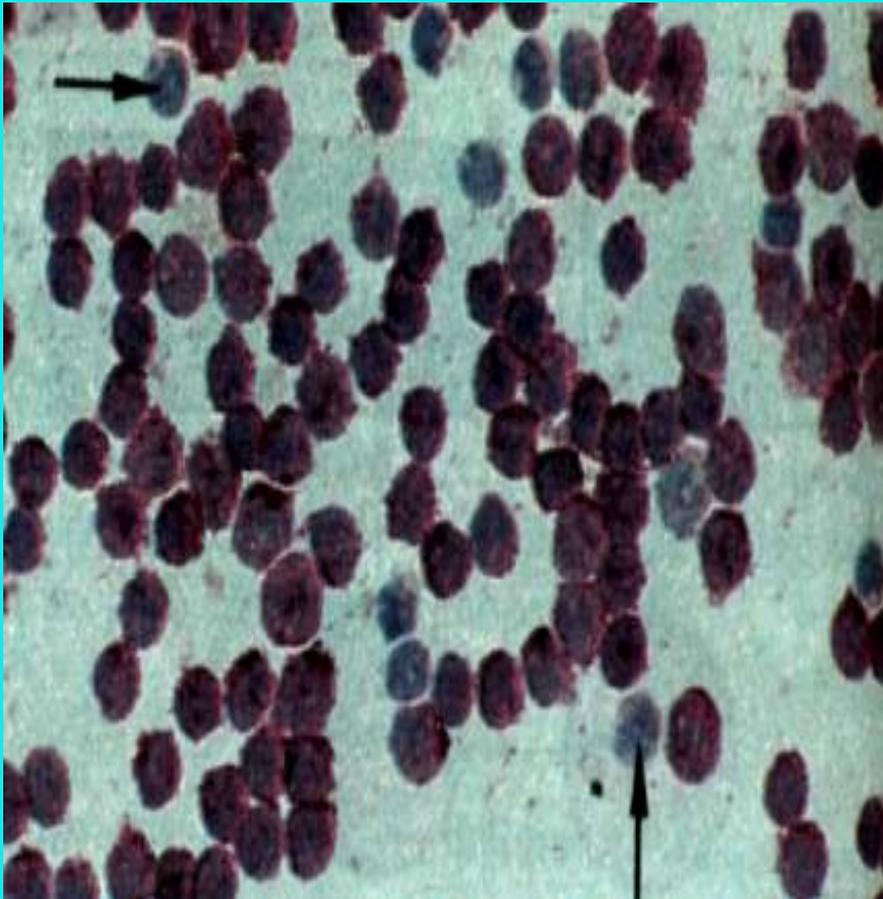


Выявление лимфобластов у больного острым лимфобластным лейкозом.



- После центрифугирования клетки окрашивали на терминальную дезоксирибонуклеотидилтрансферазу (TdT) (вначале их обрабатывали мышиными моноклональными антителами к TdT,
- затем - антителами к мышиным Ig и после этого - иммунными комплексами мышиных антител к щелочной фосфатазе с самой фосфатазой;
- в заключение проводили цветную реакцию на фермент, дающую красно-фиолетовое окрашивание).
- Среди немеченых нормальных клеток костного мозга видны многочисленные лимфобласты.

Выявление общего антигена острого
лимфобластного лейкоза (CALLA) в клетках
костного мозга больного.

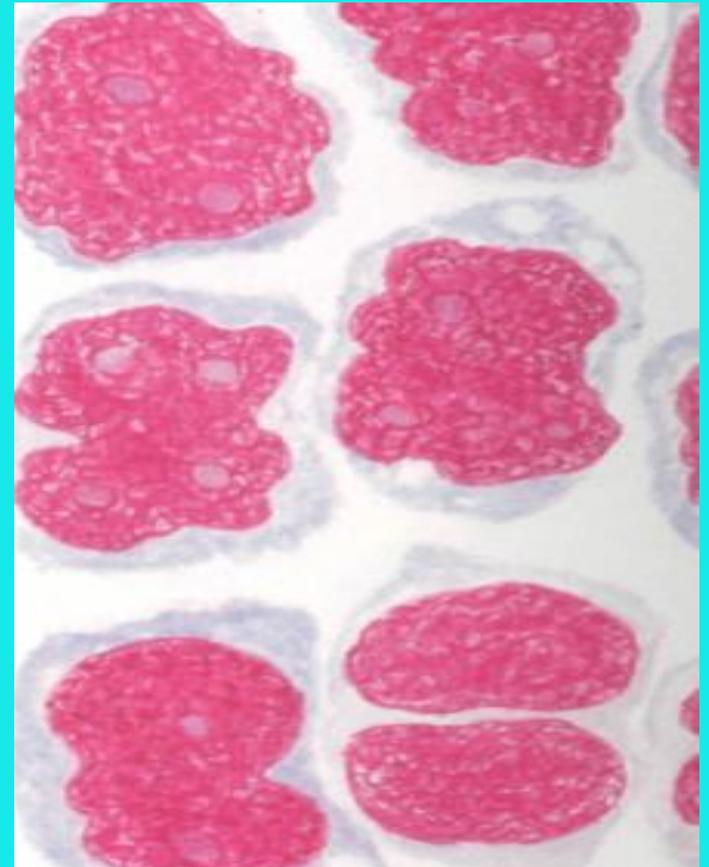
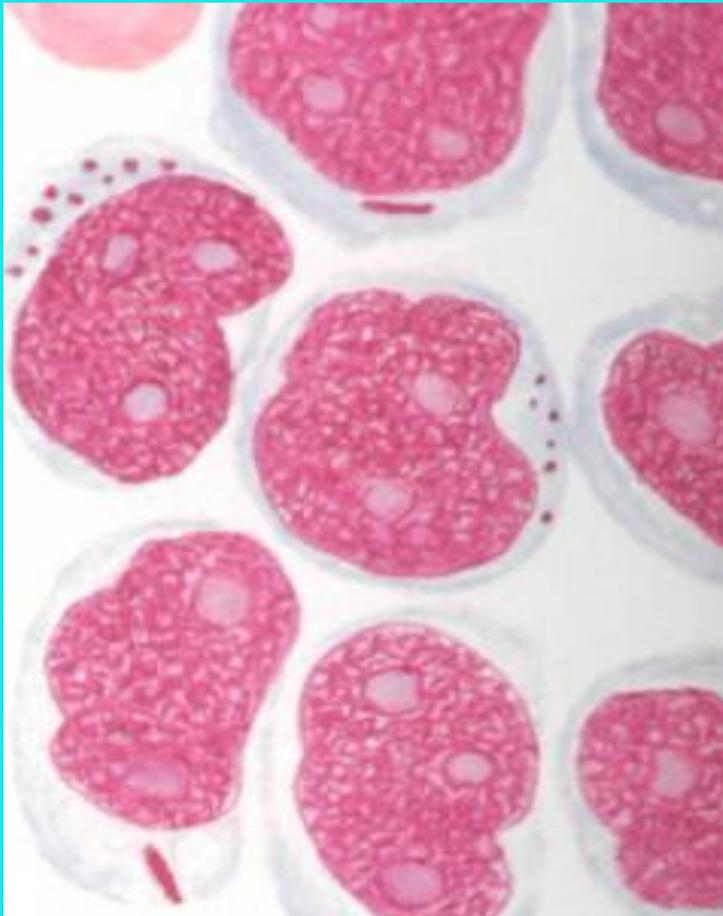


- иммунофосфатазный метод, с помощью специфических моноклональных антител к CALLA (антитела 15).
- Большинство клеток интенсивно окрашены. Две неокрашенные клетки отмечены стрелками.

- Самый распространенный лейкоз в детском и юношеском возрасте.
- Пик заболеваемости приходится на возраст от 1 года до 6 лет. Протекает с поражением костного мозга, лимфатических узлов, селезенки, вилочковой железы, а также других органов.
- Центральная нервная система обычно вовлекается при рецидивах заболевания после химиотерапии.
- В костном мозге, периферической крови и в других органах обнаруживаются опухолевые клетки типа лимфобластов с ШИК-положительными гранулами в цитоплазме, не дающие реакций на пероксидазу, эстеразы и не содержащие липиды.
- В 2/3 случаев в опухолевых клетках обнаруживаются цитогенетические нарушения в виде полиплоидии, филадельфийской хромосомы и реципрокной транслокации между хромосомами 8 и 14.

- Цитогенез острого лимфобластного лейкоза связан с предшественниками Т- и В- лимфоцитов. На Т- клеточные лейкозы в странах Европы приходится 10—15 % наблюдений.
- Преобладают В- клеточные лейкозы. Руководствуясь иммунологическими фенотипами опухолевых клеток, выделяют несколько форм лимфобластного лейкоза, что имеет значение для выбора терапии и прогноза.
- Преобладающие В- лимфобластные лейкозы представлены ранним, промежуточным и поздним вариантами, отличающимися по экспрессии параглобулина CD 10, поверхностного иммуноглобулина и активности терминальной диоксинуклеотид-трансферазы.
- Маркерами Т- лимфобластного лейкоза являются антигены С7 и Т-рецепторов.
- У детей преобладает промежуточный вариант, у взрослых — ранний и промежуточный.
- Прогноз у детей значительно лучше, чем у взрослых. Выживаемость составляет соответственно 60 и 30 %.
- Наихудший прогноз при Т- лимфобластном лейкозе.

Острый миелобластный лейкоз. Клетки миелобластного лейкоза.

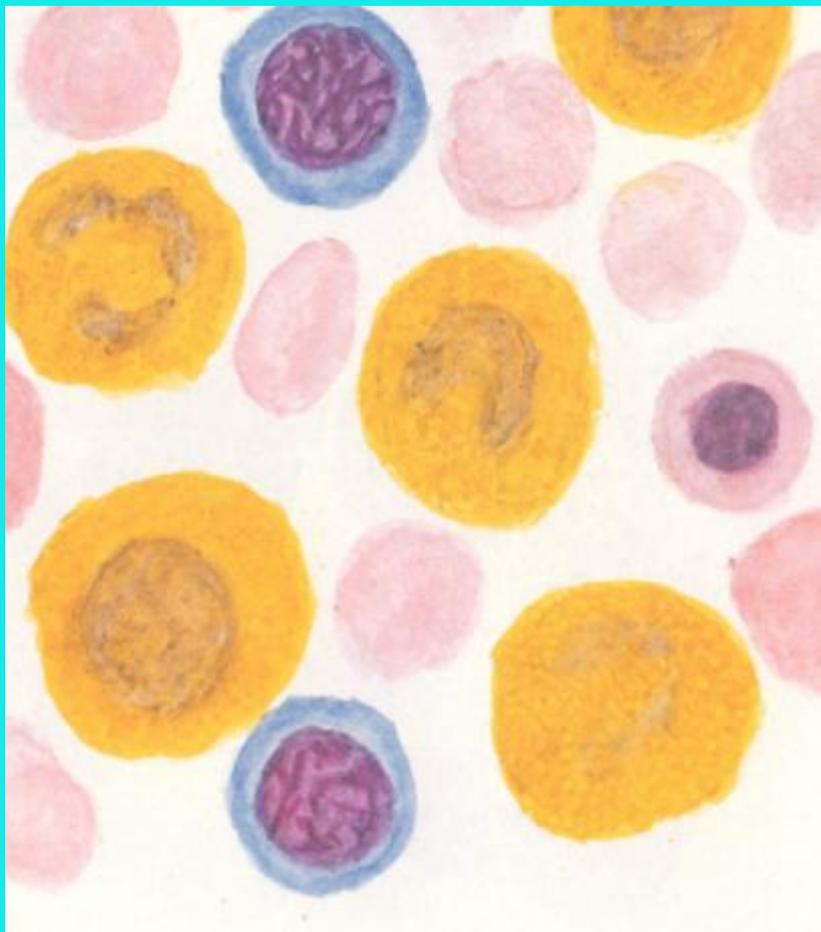


Трошина Н.В.

презентация для ФУВ, Вг МУ.

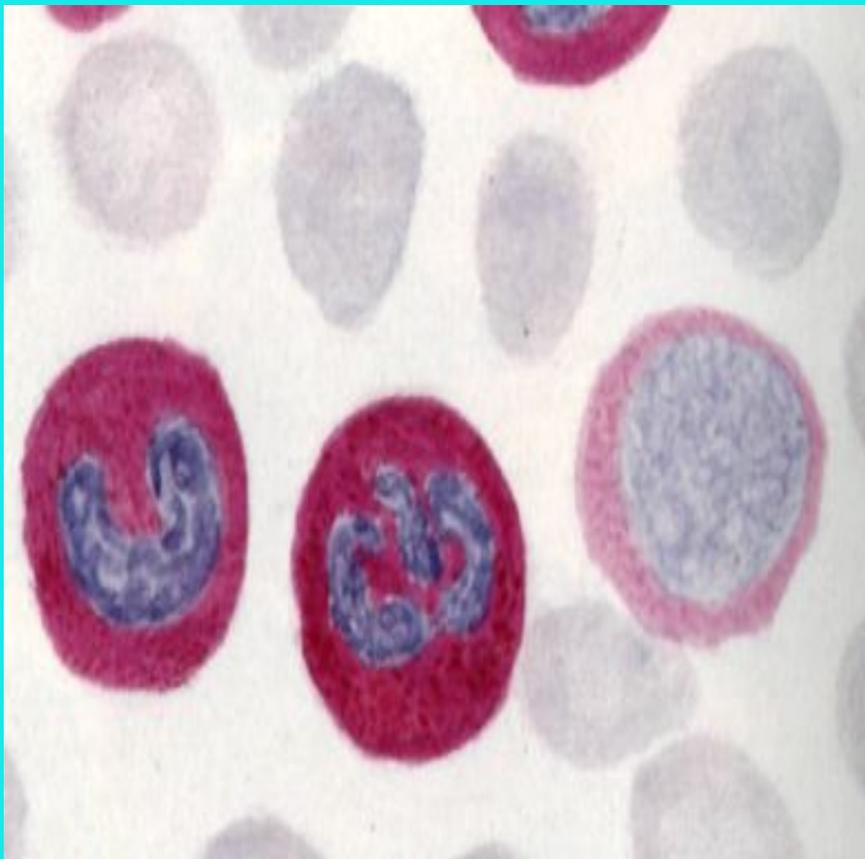
- Наиболее частая форма заболевания у взрослых с относительно хорошим прогнозом — ремиссии наступают у 70—80 % больных, полные ремиссии — у 25 % больных.
- Описываются наблюдения развития острого миелобластного лейкоза у людей, подвергшихся радиационному воздействию, контактирующих с бензолом (кожевенная индустрия в Турции, производство синтетических клеев и др.), принимавших цитостатические препараты, а также у страдающих наследственными заболеваниями — болезнью Дауна, анемией Фанкони, синдромом Блума.

Опухолевые клетки имеют типичные для миелобластов цитохимические маркеры: ШИК -положительную диффузно окрашенную цитоплазму, содержат липиды, пероксидазу, эстеразы.



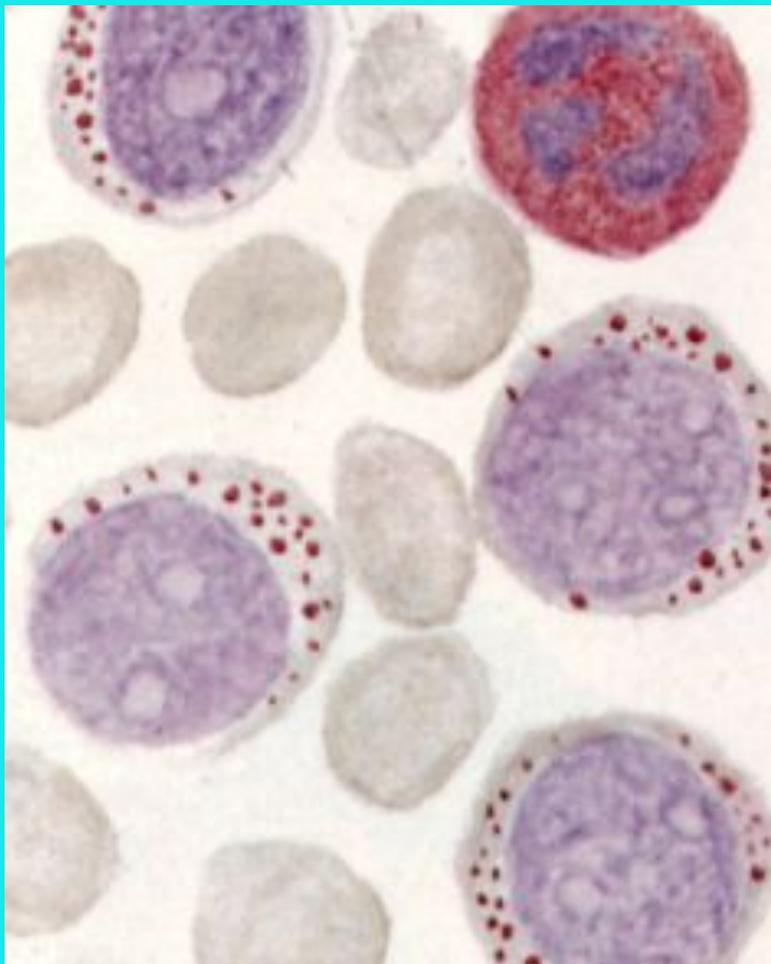
- Реакция на миелопероксидазу.
- Цитоплазма всех клеток нейтрофильного ряда окрашена в желтый цвет.

ШИК-реакция нейтрофилов.



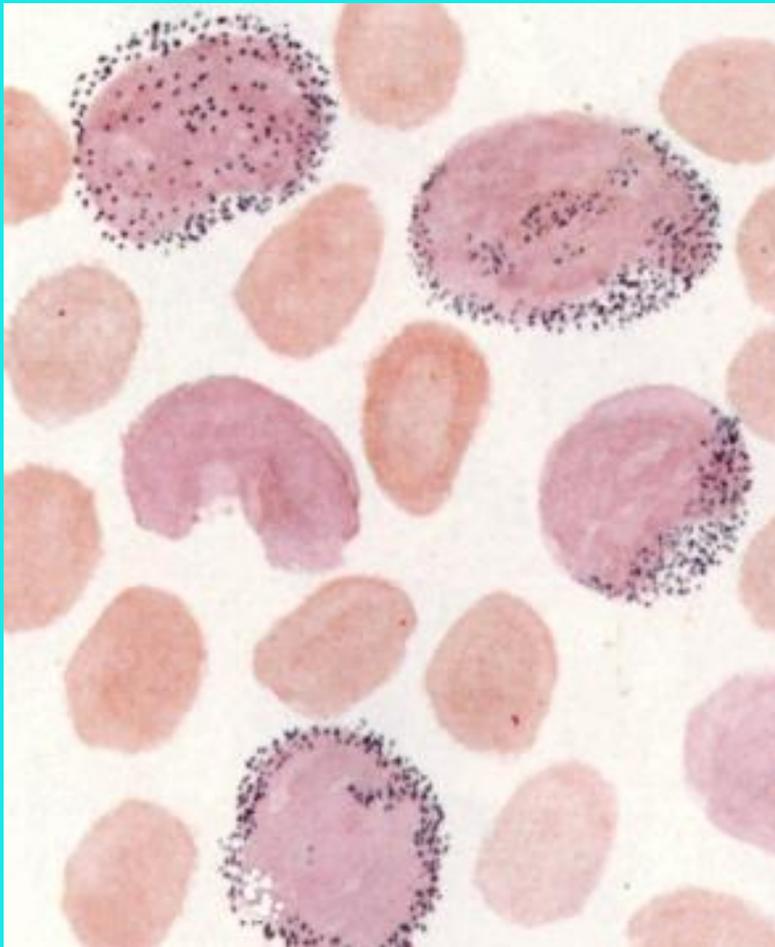
- Ядра окрашены в синий цвет, цитоплазма заполнена мельчайшей красной зернистостью, создающей впечатленью сплошной окраски.

ШИК реакция лимфоцитов.



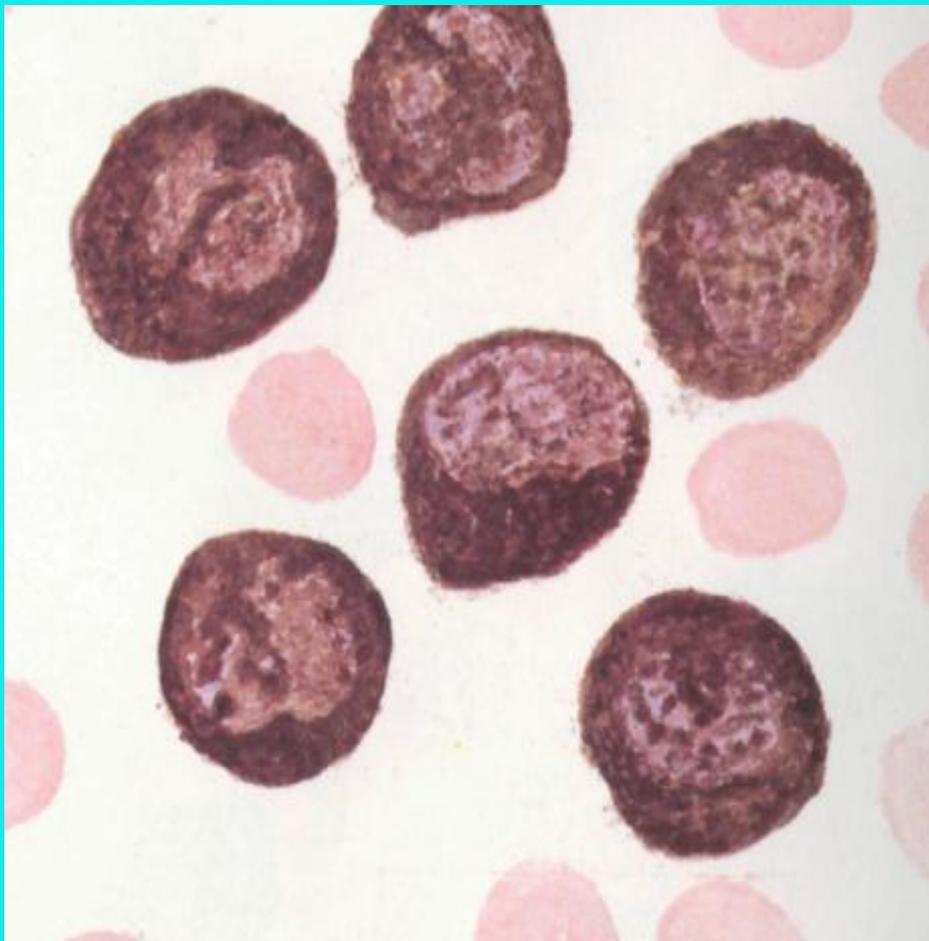
- В цитоплазме видна сравнительно крупная, не сливающаяся зернистость красного цвета.

Реакция на хлорацетатэстеразу.



- В цитоплазме клеток миелоидного ряда определяется мелкая синяя зернистость, более слабо выраженная при остром миеломонобластном лейкозе.

Реакция на липиды с Суданом черным.



- Цитоплазма клеточных элементов приобретает коричнево-черную окраску.

- Опухолевые клетки инфильтрируют костный мозг, приобретающий макроскопически пиеидный вид, селезенку, печень, лимфатические узлы, слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта, что сопровождается язвенно-некротическими и геморрагическими осложнениями.
- В 1/3 случаев лейкозные инфильтраты обнаруживаются в легких ("лейкозный пневмонит"), в 1/4 — в оболочках мозга ("лейкозный менингит").
- По иммунологическим фенотипам выделяют 6 вариантов заболевания.
- Больные умирают от кровоизлияний в головной мозг, желудочно-кишечных кровотечений и инфекционных осложнений.
- Лечение цитостатиками изменило проявления заболевания, удлинит жизнь больным.



Хронические лейкозы.

- Хронические лейкозы отличаются от острых цитарной дифференцировкой опухолевых клеток, более длительным стадийным течением.
- *Первая стадия* заболеваний характеризуется присутствием одного клона опухолевых клеток, течет годами, относительно доброкачественно, хронически и называется моноклоновой, доброкачественной.
- *Вторая стадия* обусловлена появлением вторичных опухолевых клонов, характеризуется быстрым, злокачественным течением с появлением множества бластов и называется злокачественной, поликлоновой стадией, или стадией бластного криза. 80% больных хроническими лейкозами погибают в стадии бластного криза.

- Результаты цитогенетических исследований показали, что злокачественная трансформация кроветворных клеток при хронических лейкозах может происходить на очень ранних стадиях — на стадиях стволовых клеток.
- Цитарный характер лейкозов обусловлен низким блоком дифференцировки в опухолевых клетках.
- При хронических лейкозах лейкозные инфильтраты обнаруживаются в костном мозге, где в связи с длительными течением и цитостатической терапией нередко развивается миелофиброз в печени, селезенке и лимфатических узлах, которые иногда достигают значительных размеров.



Хронические лимфоцитарные лейкозы.

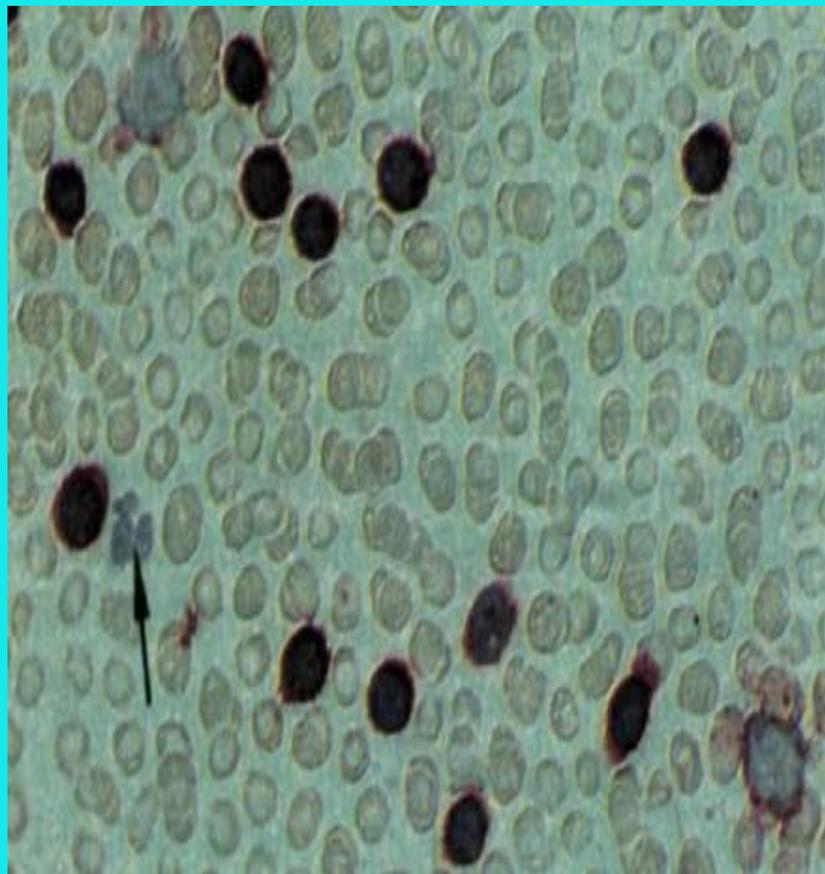
- Эти формы лейкозов объединяются в две группы.
- Первая — хронический лимфолейкоз и примыкающие к нему болезнь Сезари (лимфоматоз кожи), Т-клеточный лимфоцитарный лейкоз, пролимфоцитарный лейкоз (В-клеточный), волосато-клеточный лейкоз (В-клеточный).
- Вторая группа — парапротеинемические лейкозы. Наибольшее значение имеет хронический лимфолейкоз.

Хронический лимфолейкоз.

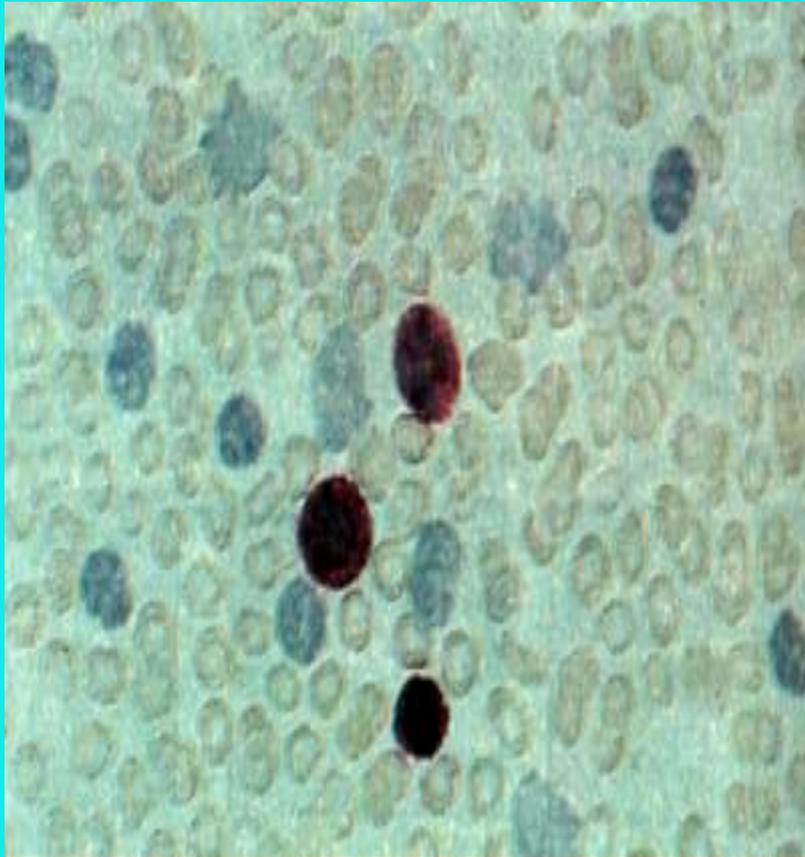
- Встречается обычно у лиц старше 40 лет, чаще в пожилом возрасте. Мужчины болеют в два раза чаще женщин.
- Заболеваемость достигает 6 случаев на 100 000 населения. Цитогенез — в 95 % случаев из ранних В-клеток.
- Опухолевые клетки напоминают пролимфоциты и малые лимфоциты и экспрессируют параглобулины CD19, CD20, CD5.
- В клинической картине преобладают лимфаденопатия, анемия (нередко аутоиммунная), тромбоцитопения, гранулоцитопения, имеются выраженная иммунодепрессия и предрасположенность к инфекционным осложнениям.
- Прогноз относительно хороший, заболевание протекает длительно с высокими показателями выживаемости.
- Однако в финале может развиваться бластный криз.

- Лейкозные инфильтраты диффузно поражают костный мозг, лимфатические узлы, которые могут достигать значительных размеров, образуя мягкие или плотноватые пакеты, а также сдавливать соседние органы.
- Селезенка резко увеличена, в отдельных случаях ее масса составляет несколько килограммов.
- Печень увеличена в меньшей степени.
- Больные умирают обычно от инфекционных осложнений.
- Описаны наблюдения трансформации хронического лимфолейкоза в неходжкинские лимфомы.

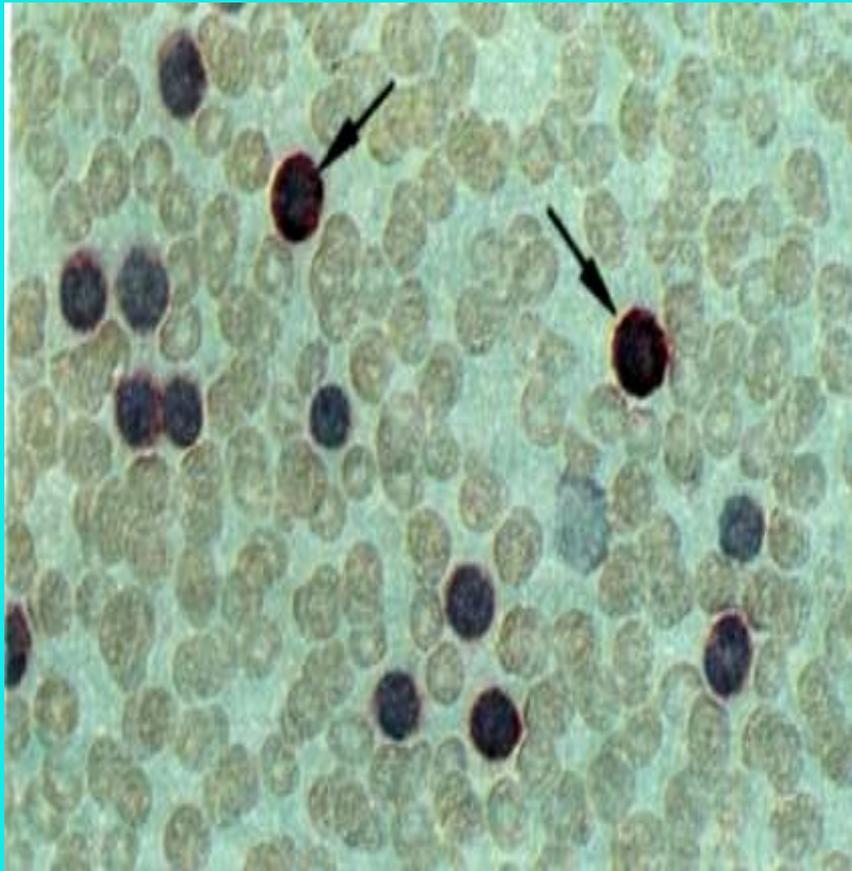
Выявление трех антигенных маркеров на клетках крови больного хроническим лимфолейкозом с помощью трех препаратов моноклональных антител (антитела к антигенам HLA- DR, T3 и T1).



- Антиген HLA-DR обнаруживается на всех лейкозных клетках и отсутствует на полиморфно-ядерных лейкоцитах (отмечены стрелками).



- Хорошо видны три нормальных Т-лимфоцита, окрашенные на антиген Т3;
- на лейкозных клетках этот антиген не выявляется.

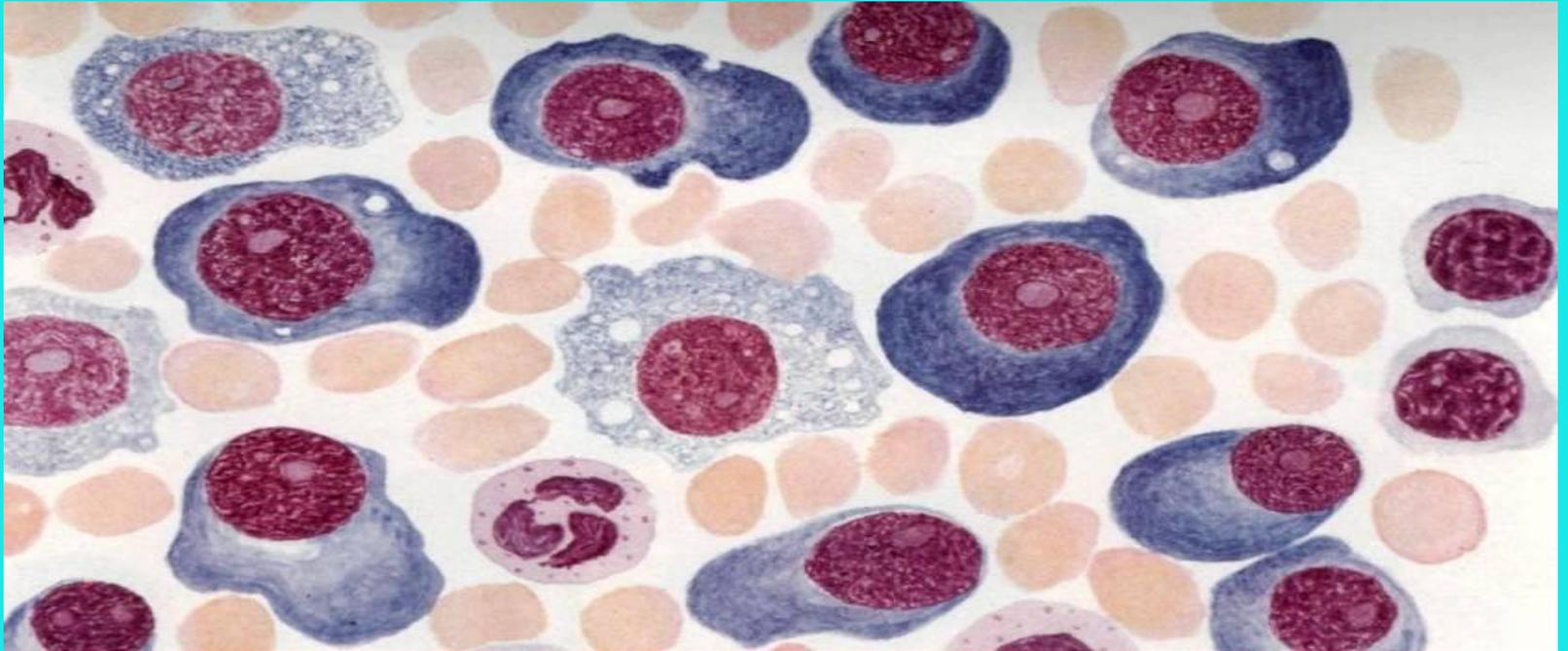


- Антиген Т1 интенсивно экспрессируется на двух нормальных лимфоцитах (отмечены стрелками) и слабо экспрессируется лейкозными клетками. Эта картина характерна для хронического лимфолейкоза.



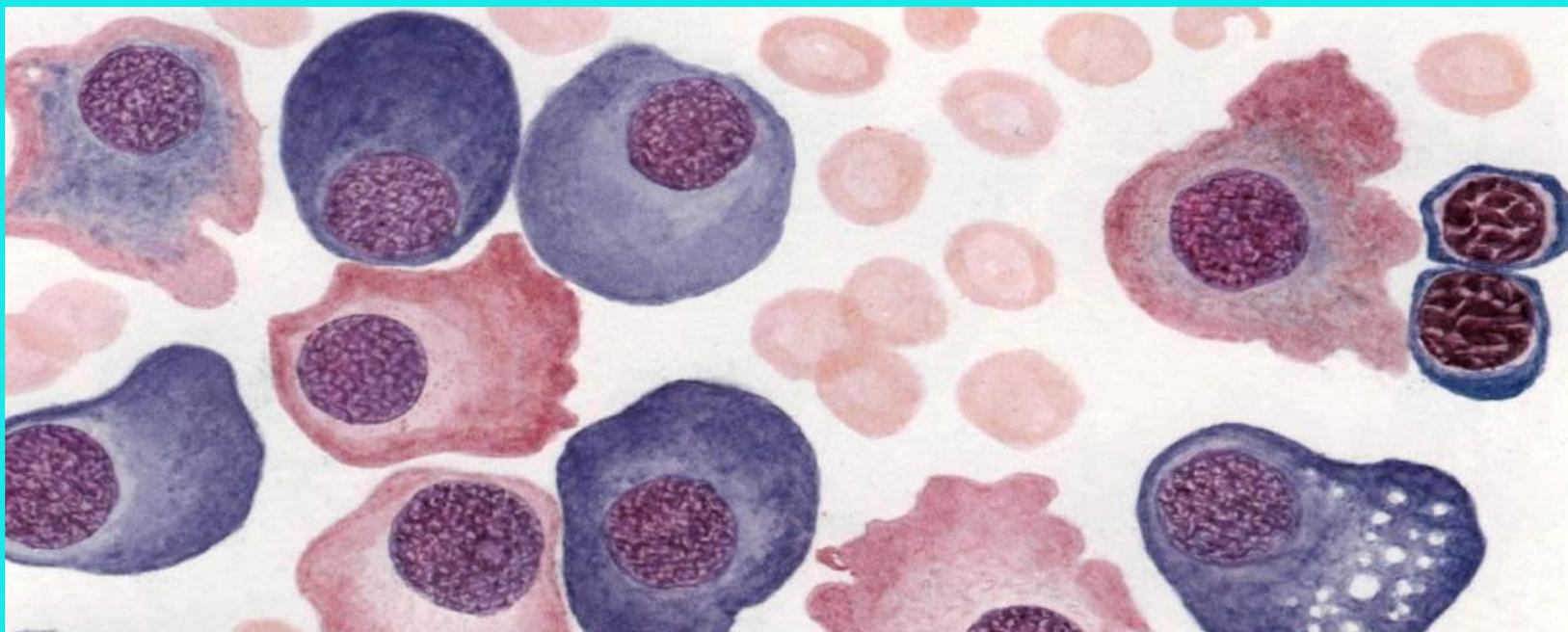
Парапротеинемические лимфолейкозы.

- В эту группу входят три заболевания —
миеломная болезнь,
- первичная макроглобулинемия
Вальденстрема,
- болезнь тяжелых цепей Франклина.



- Тотальная метаплазия костного мозга миеломными клетками.

- Обилие «пламенеющих» (фуксифильных) клеток при миеломной болезни в пунктате костного мозга.



- Особенностью парапротеинемических лейкозов, которые также называются злокачественными иммунопролиферативными заболеваниями, является способность опухолевых клеток синтезировать однородные иммуноглобулины или их фрагменты — парапротеины, что связано с цитогенезом опухолевых клеток.
- Опухолевые клетки при парапротеинемических лейкозах дифференцируются по плазмоцитарному типу, сохраняя в извращенной форме особенность плазматических клеток синтезировать иммуноглобулины.
- Наибольшее значение среди парапротеинемических лейкозов имеет миеломная болезнь.

- 
- По данным Министерства здравоохранения РФ, в России ежегодно регистрируется до 3000 случаев вновь выявленных лейкозов только у детей младше 14 лет и около 5000 случаев – у подростков в возрасте до 18 лет.
 - Разработка и внедрение в клиническую практику современных программ терапии острых лейкозов, основной из которых является трансплантация костного мозга, привело к существенному улучшению результатов лечения, увеличению продолжительности жизни больных, а во многих случаях и к полному их излечению.
-

- 
- **Вопросы дифференциальной диагностики острых лейкозов выходят на первый план,**
 - **поскольку во многом позволяют определить своеобразие клинического течения заболевания и, как следствие, тактику лечения, а также дают возможность составить ближайший прогноз.**
 - **Несмотря на появление в последние десятилетия методов иммунофенотипирования лейкемических клеток,**
 - **цитогенетического и**
 - **молекулярногенетического анализа**
 - **цитоморфологические и цитохимические методы исследования не утратили своего значения для диагностики различных форм гемобластозов.**
-

- 
- Эти методы положены в основу современной классификации острых лейкозов FАВ (Франко-Американо-Британской, 1976 г.),
 - основанной на клоновой теории их патогенеза и на представлении о том, что каждая опухолевая клетка имеет своего «нормального» предшественника.
-



- Согласно FAB-классификации, все лейкозы подразделяются на две большие группы:

- острые миелоидные (нелимфобластные – ОНЛЛ) и
 - острые лимфобластные (ОЛЛ).



- **FAV-классификация острых лейкозов. Острые миелобластные лейкозы**
 - **M0 – о. миелобластный лейкоз с минимальной миелоидной дифференцировкой бластов**
 - **M1 – о. миелобластный лейкоз без созревания**
 - **M2 – о. миелобластный лейкоз с созреванием**
 - **M3 – о. промиелоцитарный лейкоз**
 - **M4 – о. миеломонобластный лейкоз**
 - **M4эоз.- о. миеломонобластный лейкоз с эозинофилией**
 - **M5a – о. монобластный лейкоз без созревания**
 - **M5б – о. монобластный лейкоз с созреванием**
 - **M6 – о. эритромиелоз**
- **M7 – о. мегакариобластный лейкоз. Острые лимфобластные лейкозы**
 - **L1 – о. лимфобластный лейкоз с микроформой бластов**
 - **L2 – о. лимфобластный лейкоз с гетерогенными формами бластов**
 - **L3 – о. лимфобластный лейкоз с беркиттоподобными бластами.**

- 
- **Объектами цитохимического исследования могут служить**
 - **мазки периферической крови,**
 - **пунктаты костного мозга,**
 - **лейкоконцентрат венозной крови,**
 - **спинномозговой жидкости,**
 - **аспираты лимфатических узлов,**
 - **селезенки,**
 - **лейкозных инфильтратов различной локализации.**
-

- 
- **Цитохимические методы представляют собой достаточно простые, хорошо воспроизводимые, не требующие сложной аппаратуры методики, которые могут быть освоены в любой лаборатории.**
 - **Среди множества клеточных компонентов, таких как неорганические элементы, белки, аминокислоты, углеводы, различные ферменты, которые могут быть определены с помощью цитохимических реакций,**
 - **Международный совет по стандартизации в гематологии, в соответствии с FAB-классификацией острых лейкозов, рекомендовал использовать в качестве основных для их дифференциальной цитохимической диагностики следующие:**
 - **на миелопероксидазу, липиды, гликоген, неспецифическую эстеразу**
-

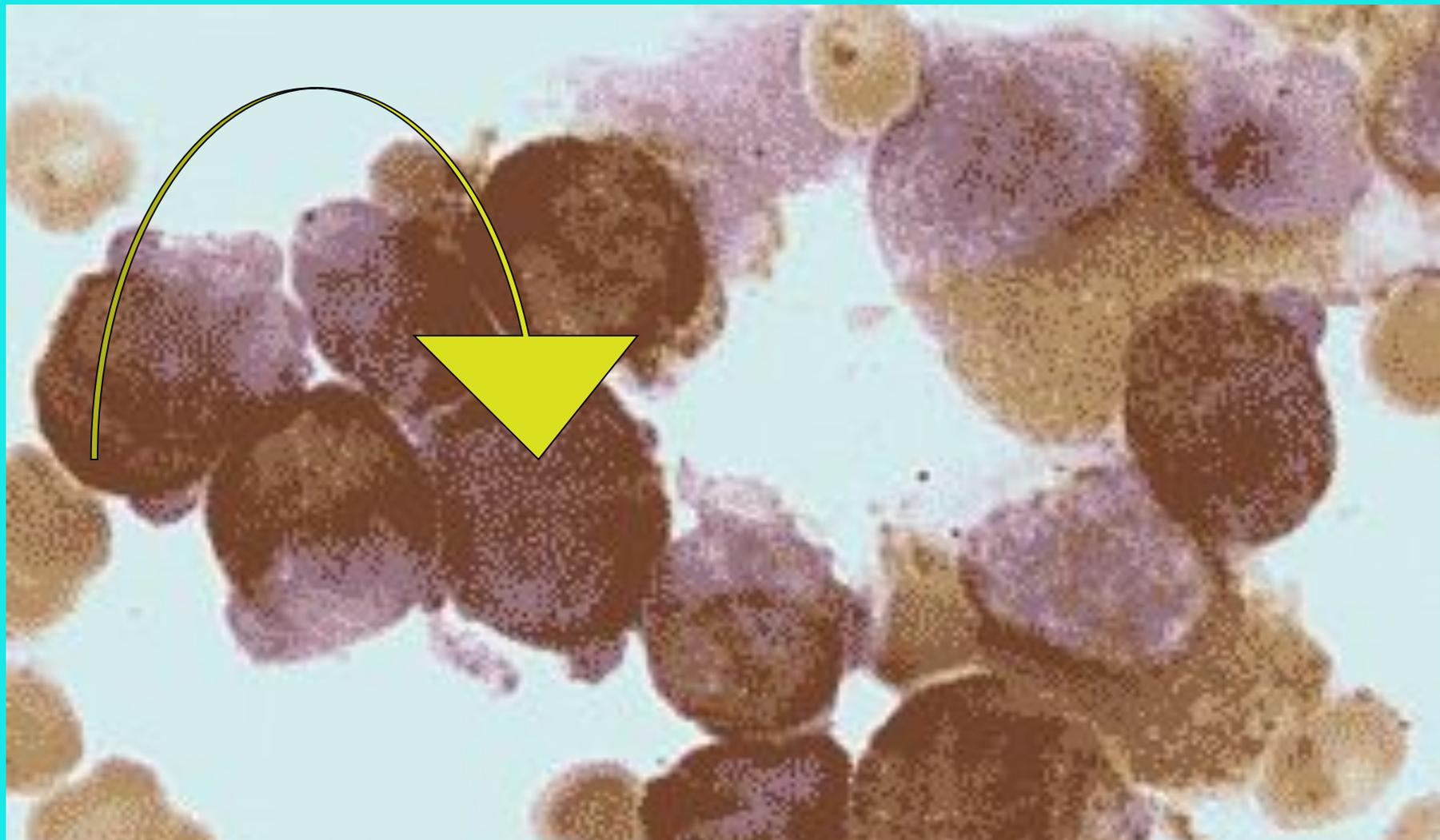


- **Миелопероксидаза (МПО).**

- **Пероксидаза является лизосомальным ферментом, катализирующим в присутствии перекиси водорода (H_2O_2) окисление различных субстратов.**
 - **Миелопероксидаза (МПО) локализуется преимущественно в специфических азурофильных гранулах в цитоплазме гранулоцитов и является маркером клеток миелоидного ряда.**
 - **В клетках МПО участвует в реакции разрушения токсичной перекиси водорода.**
 - **В цитохимических реакциях активность фермента определяется по окислению хромогенов (бензидина, о-дианизидина и др.) по методу Грехема – Кнолля.**
 - **МПО выявляется в клетках гранулоцитарного ряда начиная с миелобласта.**
 - **Активность фермента нарастает по мере созревания клеток.**
-

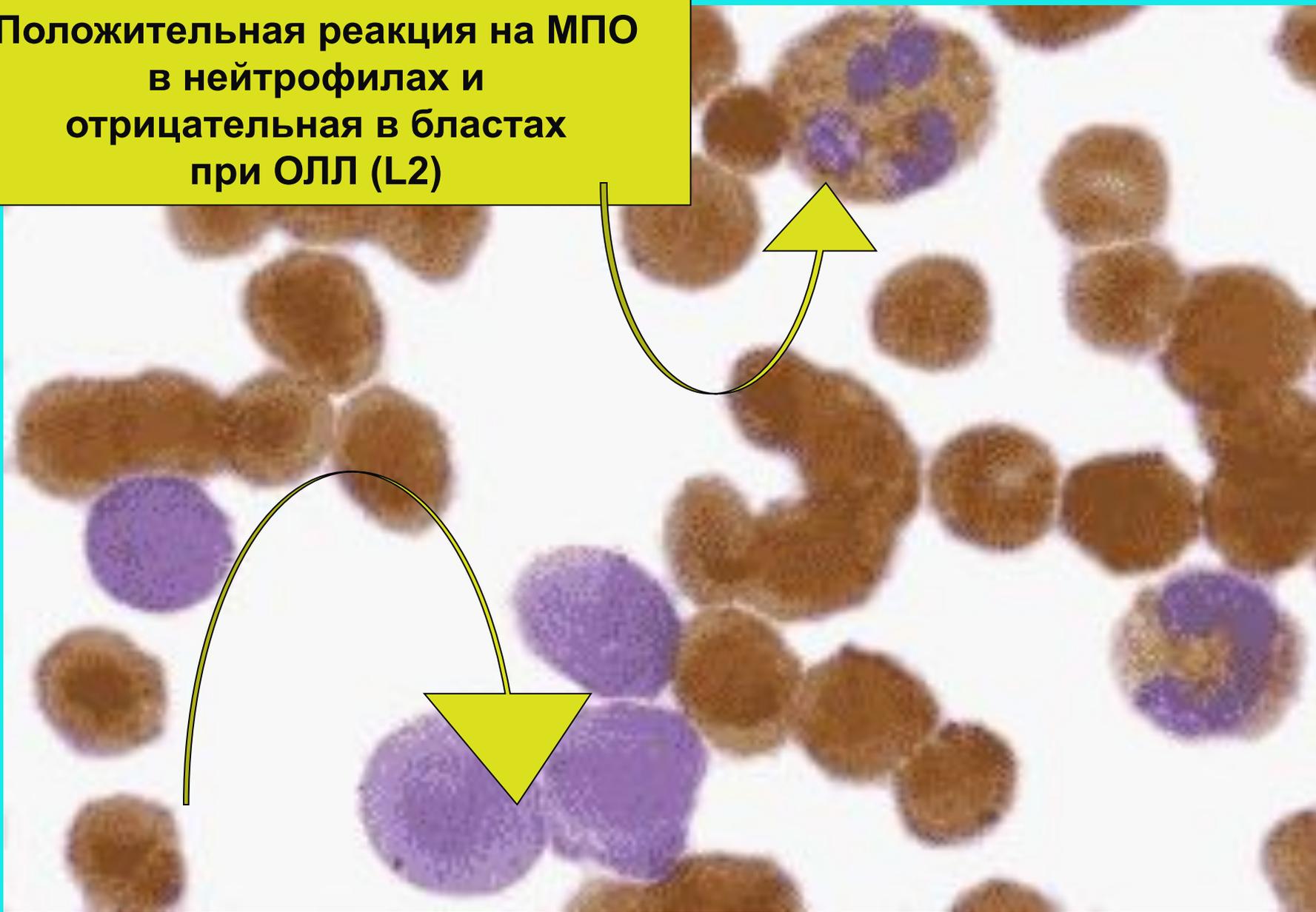
- 
- В сегментоядерных нейтрофилах здоровых людей выявляется высокая активность МПО в виде гранул, заполняющих цитоплазму.
 - Самая высокая активность фермента наблюдается в зрелых эозинофилах.
 - В базофильных промиелоцитах и миелоцитах активность МПО, как правило, высокая, однако по мере дифференцировки их в зрелые клетки активность фермента снижается.
 - Зрелые базофилы могут быть почти отрицательными по данному признаку.
 - Слабоположительная реакция на МПО наблюдается в различном проценте моноцитов в виде немногочисленных рассеянных гранул.
 - В эритрокариоцитах, лимфоцитах, и мегакариоцитах МПО не определяется.
-

- 
- **Нормальные величины.**
 - **В крови здоровых людей**
 - **3 - 16% нейтрофилов имеют резко положительную,**
 - **60–90% – умеренно положительную, остальные – слабо положительную реакцию на МПО.**
 - **СЦК нейтрофилов здоровых людей равен $2,56 \pm 0,33$.**
-



**Положительная реакция на МПО
в бластах (М3) (костный мозг).**

**Положительная реакция на МПО
в нейтрофилах и
отрицательная в бластах
при ОЛЛ (L2)**



- 
- **Клиническое значение определения МПО.**
Реакция используется главным образом с целью диагностики острых лейкозов.
 - При острых миелобластных лейкозах активность фермента в опухолевых клетках варьируется от **слабой до выраженной**, в зависимости от степени дифференцировки бластов.
 - При острых миелобластных лейкозах с низкой степенью дифференцировки (M1 по FAB-классификации) количество МПО - положительных бластов невелико (не превышает 10%), степень активности фермента в них **невысокая**.
-

- 
- При остром промиелоцитарном лейкозе (М3 по FAB-классификации) МПО выявляется практически в 100% бластных клеток, причем активность ее равноценна таковой у зрелых нейтрофилов.
 - Однако отсутствие точных количественных способов оценки цитохимических реакций не позволяет использовать их для верификации степени дифференцировки бластных клеток, следовательно, и более тонкой дифференциальной диагностики ОЛ. Таким образом, с помощью цитохимических реакций определяют линейную направленность, а не степень дифференцировки бластов.
-



- **Липиды.**

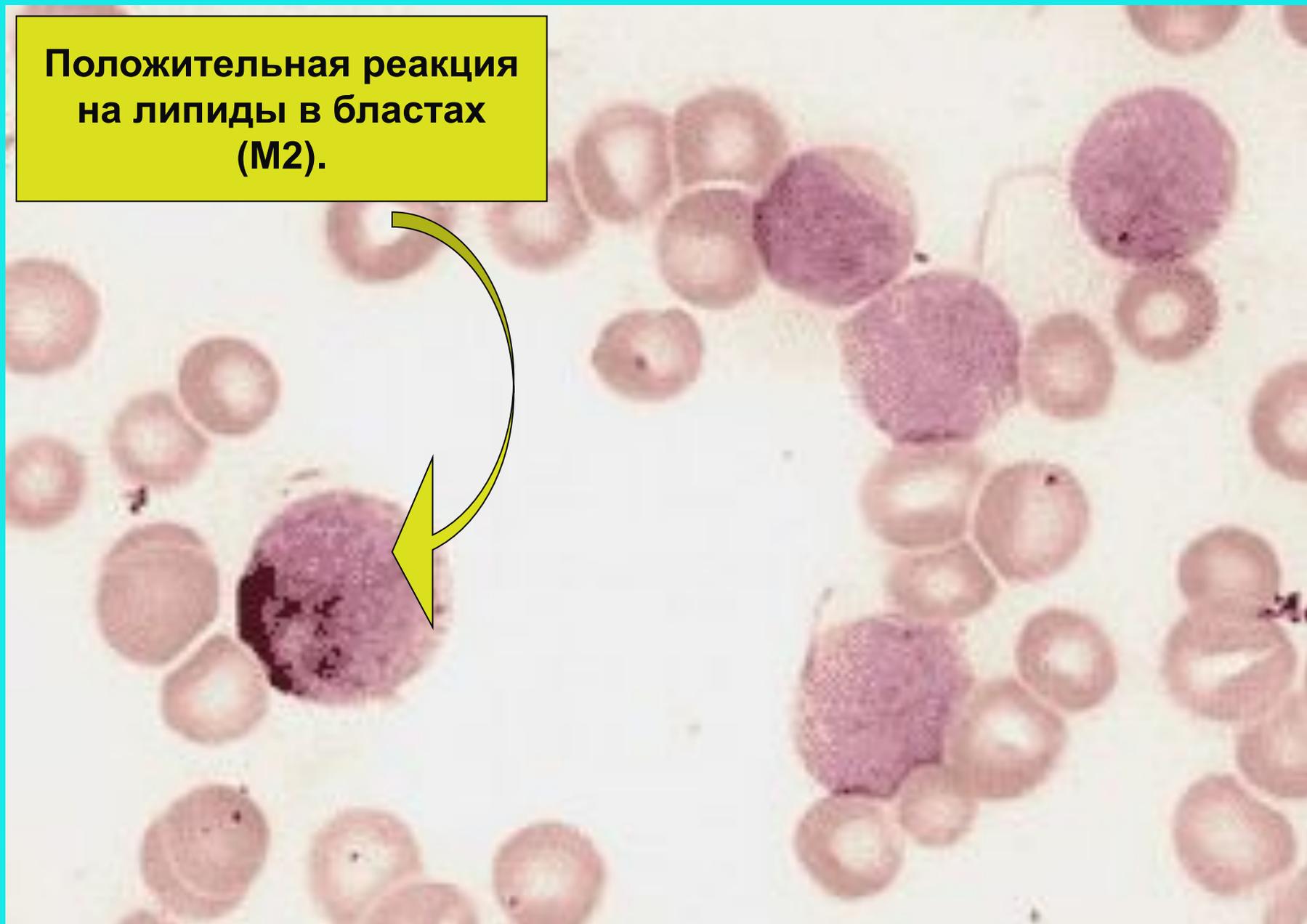
- **Липиды обнаруживаются практически во всех лейкоцитах, за исключением лимфоцитов.**
 - **Однако основная масса липидов связана с клетками гранулоцитарного ряда.**
 - **Они входят в состав специфической зернистости нейтрофильных гранулоцитов, эозинофилов и накапливаются по мере созревания клеток.**
 - **В миелобластах обычно имеется небольшое количество гранул, локализующихся в перинуклеарной зоне, в промиелоцитах их становится несколько больше, в миелоцитах и метамиелоцитах содержание суданофильных гранул высокое.**
 - **В зрелых нейтрофилах липиды заполняют всю цитоплазму.**
- 

- 
- **В клетках лимфоидного ряда липиды не выявляются.**
 - **Стабильные и хорошо воспроизводимые результаты для исследования гемопоэтических клеток получают при применении метода с суданом черным В.**
 - **Нормальные величины.**
 - **Большинство нейтрофилов**
 - **(69-80%) у здоровых людей имеет резко выраженную,**
 - **18-36% – умеренно выраженную и**
 - **10% – слабо выраженную реакцию на липиды.**
-

Положительная реакция на липиды
в нейтрофилах
и отрицательная в лимфоците.



**Положительная реакция
на липиды в бластах
(M2).**





ОММНЛ. Реакция на липиды с суданом черным В.

- 
- **Клиническое значение определения липидов.**
 - **Особую информативность реакция с суданом черным В имеет при дифференциальной диагностике острых лейкозов.**
 - **Обычно липиды выявляются параллельно с миелопероксидазой, но могут обнаруживаться и в менее зрелых миелобластах при отсутствии МПО, т.е. являются более чувствительным маркером миелоидной дифференцировки.**
 - **Однако описаны крайне редкие случаи выявления липидов в лимфобластах.**
 - **В соответствии с FAB-классификацией, при диагностике острых лейкозов для подтверждения миелоидной природы бластов необходимо наличие не менее 3% бластных клеток, положительных по МПО и/или липидам.**
-

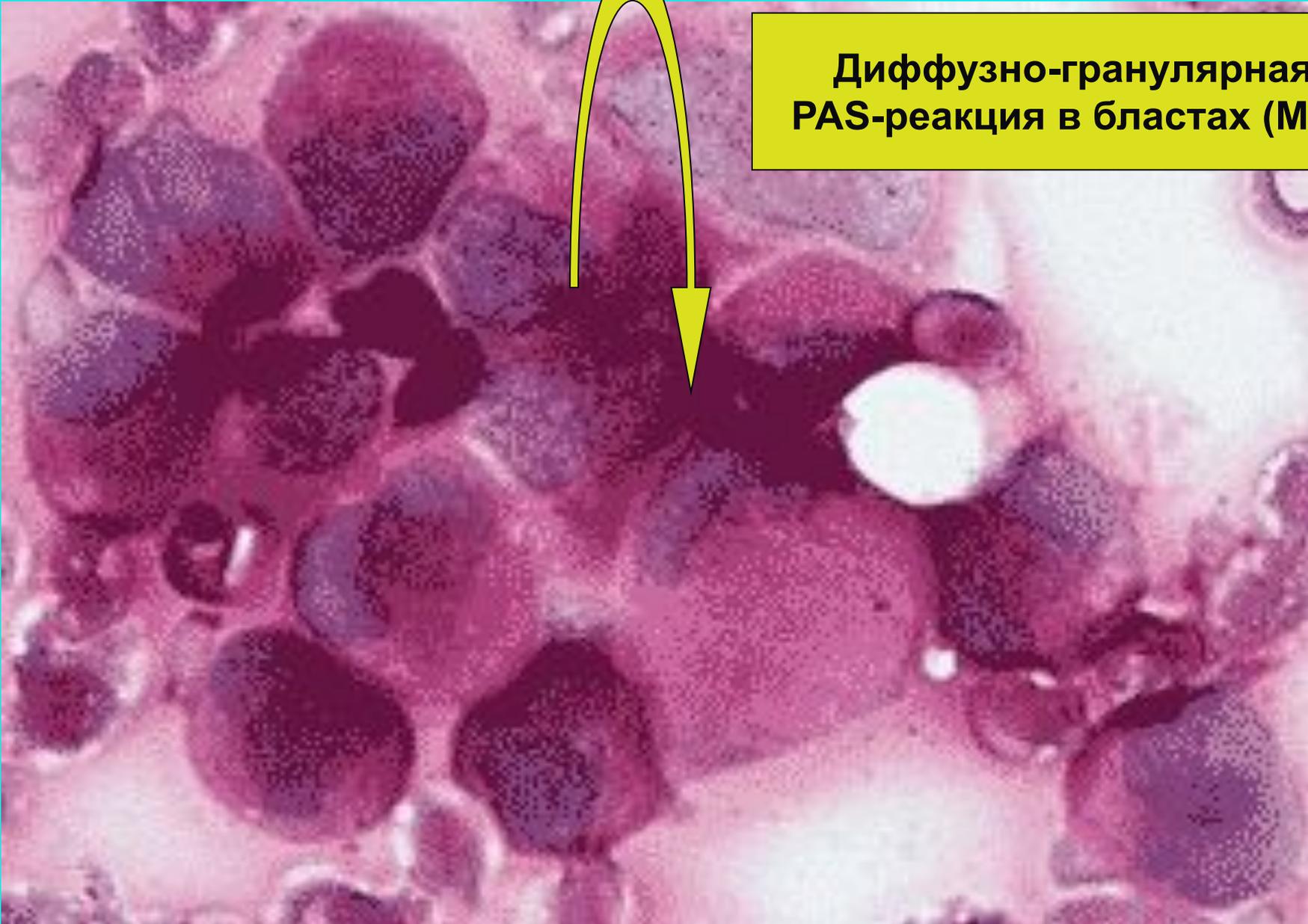
- 
- **PAS-реакция.**
 - **Механизм PAS-реакции основан на окислении йодной кислотой гликолевых групп или их амино- или алкиламино - производных до альдегидов.**
 - **Альдегидные группировки при взаимодействии с реактивом Шиффа образуют продукт красного цвета (метод Mc Manus).**
 - **Мукополисахариды (новое название – гликозамингликаны) определяются во всех морфологически идентифицируемых клетках гранулоцитарного ряда.**
 - **Концентрация PAS-положительного материала в клетках гранулоцитопоза нарастает по мере созревания клеток.**
 - **Диффузное окрашивание цитоплазмы обычно свойственно наиболее молодым клеткам гранулоцитарного ряда (миелобласты, промиелоциты, миелоциты).**
 - **В зрелых нейтрофилах содержится много PAS-положительного вещества в виде мелких гранул, упакованных так плотно, что цитоплазматический фон плохо различим.**
-

- 
- В зрелых эозинофилах и базофилах PAS-положительный материал располагается следующим образом:
 - специфические гранулы остаются неокрашенными и резко выделяются на фоне диффузного окрашивания цитоплазмы.
 - В моноцитах PAS-положительный материал чаще выявляется в виде мелкой пылевидной зернистости на фоне светло-розового диффузного окрашивания.
 - В норме от 3 до 10% клеток эритроидного ряда содержат мукополисахариды.
-

- 
- В тромбоцитах PAS-положительный материал выявляется в виде мелких рассеянных гранул по периферии клетки либо в виде интенсивного центрально расположенного пятна.
 - В лимфоцитах концентрация мукополисахаридов меньше, чем в гранулоцитах.
 - В норме 2 – 30% лимфоцитов периферической крови содержат PAS-положительный материал, располагающийся в виде гранул вокруг ядра, в 1-2% клеток гранулы могут быть интенсивно окрашены и образуют крупные блоки.
 - Нормальные цитохимические показатели содержания гликогена в лейкоцитах
 - 95–100% нейтрофилов.
 - От 2 до 30% лимфоцитов содержат PAS-положительное вещество в гранулярной форме.
-

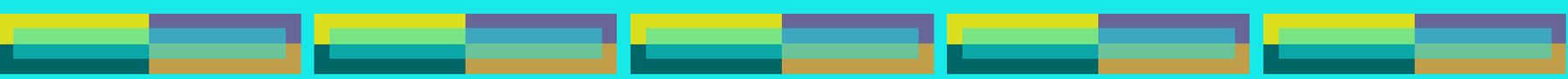


Диффузная PAS-реакция в
нейтрофилах,
гранулярная – в лимфоците



Диффузно-гранулярная
PAS-реакция в бластах (M5).

The image shows a microscopic view of blast cells. The cells are large and have a granular appearance. The granules are stained a deep purple color, indicating a positive PAS reaction. The background is a lighter pinkish-purple. A yellow arrow points from the text box to a specific cell in the center of the image.



ШИК-реакция при ОМЛ.

- 
- **Клиническое значение определения PAS – реакции.**
 - **При диагностике острых миелобластных лейкозов бластные клетки могут быть либо PAS-отрицательными, либо обнаруживать слабодиффузное окрашивание цитоплазмы.**
 - **Яркое диффузное окрашивание цитоплазмы наблюдается только при остром промиелоцитарном лейкозе.**
-



- **Неспецифические эстеразы.**

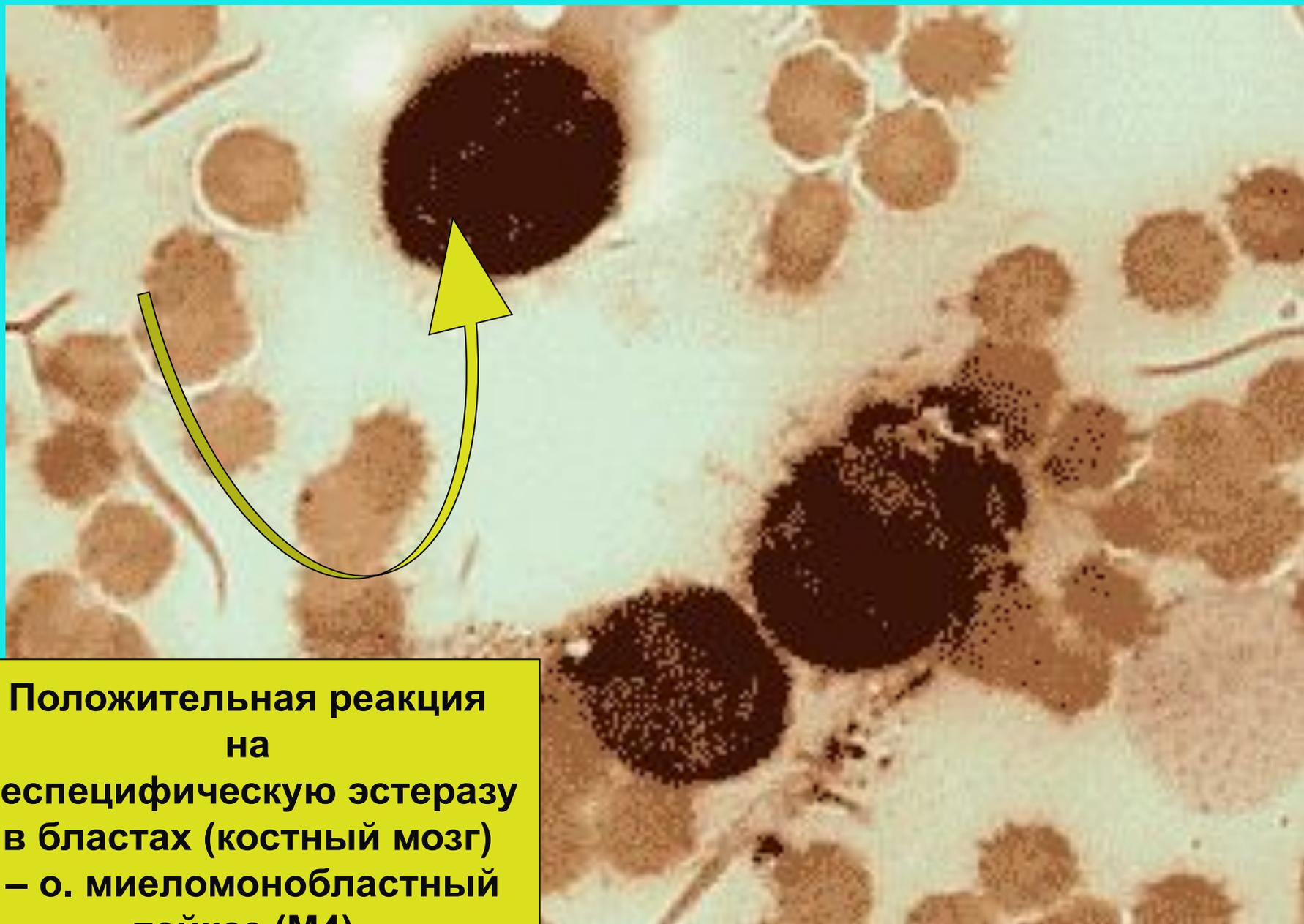
- Термином «эстераза», или «неспецифическая эстераза» обозначены ферменты, способные гидролизовать простые эфиры N-свободных спиртов и органических кислот.
 - Неспецифические эстеразы – неоднородная группа ферментов, отличающихся друг от друга по субстратной специфичности и действию активаторов и ингибиторов.
- Все неспецифические эстеразы являются лизосомальными ферментами.
 - В гематологии наиболее часто определяют
 - а-нафтилацетатэстеразу,
 - хлорацетатэстеразу,
 - кислую а-нафтилацетатэстеразу (по методу Loffler).



- 
- **а-нафтилацетатэстераза обнаруживается во всех клетках миелоидного ряда начиная с миелобласта.**
 - **Активность ее выявляется в эозинофилах вне всякой связи с их специфической зернистостью, в небольшом числе лимфоцитов, эритрокариоцитах, мегакариоцитах и тромбоцитах.**
 - **Самую интенсивную реакцию дают моноциты и макрофаги.**
 - **Особенно высокая активность выявляется в моноцитах.**
-

- 
- **Активность неспецифической эстеразы в клетках моноцитарного ряда легко ингибируется фторидом натрия, но не подавляется в гранулоцитах.**
 - **Этот феномен позволяет отличить клетки системы мононуклеарных фагоцитов от клеток других ростков кроветворения, обладающих активностью неспецифической эстеразы.**
- 

- 
- **Активность нафтил-AS-D-хлорацетат-эстеразы выражена в клетках гранулоцитарного ряда и отсутствует в клеточных элементах моноцитарного и лимфоцитарного ряда.**
 - **Кислая а-нафтилацетатэстераза рано выявляется в процессе дифференцировки Т-лимфоцитов и локализуется в виде фокального пятна в цитоплазме этих клеток.**
- 



**Положительная реакция
на
неспецифическую эстеразу
в бластах (костный мозг)
– о. миеломонобластный
лейкоз (M4).**



**Частичное подавление
неспецифической эстеразы
в бластах фторидом
натрия (костный мозг) –
о. миеломонобластный лейкоз
(M4).**