

Міністерство освіти і науки України
Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології

**ГЕМАТОЛОГІЧНІ МАРКЕРИ ГОСТРОГО ЛІМФОБЛАСТНОГО ТА
МІСЛОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗУ**

Дипломна робота
Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала:
студентка VI курсу, групи б11-М
спеціальності 091-біологія
освітня програма – біохімія та
лабораторна діагностика
Альона Гаясівна Школяр

Керівник: к.б.н., доц. О. М. Волощук

До захисту допущено:
Протокол засідання кафедри № ____
від „ ____ ” _____ 2023 р.

зав. кафедри _____ проф. Копильчук Г.П.

Чернівці-2023

АНОТАЦІЯ

Магістерська робота присвячена аналізу гематологічних показників у пацієнтів з гострим лімфобластним та мієлобластним лейкозом.

Показано, що для пацієнтів з лімфобластним лейкозом характерним є помірний лейкоцитоз, анемія, тромбоцитопенія та виражений лімфоцитоз, при цьому у мазку крові виявляється велика кількість бластних клітин. Водночас для пацієнтів з мієлобластним лейкозом характерний гіперлейкоцитоз, при якому вміст лейкоцитів у практично 100 разів перевищує показники норми, при збереженні у межах норми вмісту лімфоцитів у крові. При цьому для хворих характерна анемія та тромбоцитопенія, що зумовлено витісненням бластами нормальних елементів кісткового мозку.

Для диференційної діагностики лімфобластного та мієлобластного лейкозу проведений порівняльний аналіз морфології бластів, проте надалі необхідно використати цитохімічні методи для виявлення специфічних речовин у цитоплазмі бластів.

Ключові слова: лімфобласти, мієлобласти, тромбоцити, лейкоз

ABSTRACT

The master's thesis is devoted to the analysis of hematological indicators in patients with acute lymphoblastic and myeloblastic leukemia. It is shown that patients with lymphoblastic leukemia are characterized by moderate leukocytosis, anemia, thrombocytopenia and pronounced lymphocytosis, while a large number of blast cells are detected in a blood smear. At the same time, patients with myeloblastic leukemia are characterized by hyperleukocytosis, in which the content of leukocytes is almost 100 times higher than the norm, while the content of lymphocytes in the blood remains within the norm. At the same time, patients are characterized by anemia and thrombocytopenia, which is caused by the displacement of normal bone marrow elements by blasts. For the differential diagnosis of lymphoblastic and myeloblastic leukemia, a comparative analysis of the morphology of blasts was carried out, but in the future it is necessary to use cytochemical methods to detect specific substances in the cytoplasm of blasts.

Key words: lymphoblasts, myeloblasts, platelets, leukemia

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5	
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ		
1. Етіопатогенез гострих лейкозів.....	7	
2. Особливості клінічного перебігу гострого лейкозу.....	9	
3. Клінічні варіанти гострого лейкозу.....	13	
4. Підходи до діагностики та терапії гострих лейкозів.....	16	
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ		
2.1. Об'єкт та методи дослідження.....	23	
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....		25
ВИСНОВКИ.....	31	
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	32	
ДОДАТКИ.....	36	

ВСТУП

Гострі лейкози – різнородна група гемобластозів, що характеризуються первинним порушенням функції кісткового мозку морфологічно незрілими бластними клітинами з витісненням ними нормальних елементів та інфільтрацією різних тканин та органів, завдяки їх здатності до міграції [1].

Різного роду лейкемії складають близько 5 % від загальної кількості онкологічних захворювань. Смертність від лімфом та лейкемії становить більше 10 % смертності від онкологічних захворювань [2].

Ріст числа хворих з гострими лейкозами, висока рання летальність, низький відсоток повних клініко-гематологічних ремісій потребують від лікарів пошуку нових діагностичних і лікувальних підходів до даної категорії хворих [3]. Окрім того, на виникнення і прогресування пухлинного захворювання впливають особливості індивідуального імунного реагування.

Ситуація з лікуванням гострих лейкемії у дорослих залишається незадовільною: при частоті ремісій за кордоном на рівні 50-80 %, в Україні цей показник складає 20-40 %. У дорослих переважає гострий мієлоїдний лейкоз, який становить біля 80 % усіх лейкемічних процесів [4].

Методи діагностики лейкозів, що застосовуються в повсякденній практиці, включають використання простих цитологічних критеріїв, таких, як форма та розмір клітин, характер зернистості цитоплазми, ядерно-цитоплазматичне співвідношення, структура ядра тощо. Ці методи доповнюються також цитохімічними методами (визначення активності кислої фосфатази, мієлопероксидази, PAS-реакція) [5]. На підставі результатів, що дають ці методи, можна встановити вірогідний діагноз для більшості пацієнтів. Уточнення ж природи конкретного лейкемічного клона вимагає проведення імунофенотипування та цитогенетичного аналізу.

Першим кроком алгоритму дій є диференціація гострого лімфобластного та гострого мієлобластного лейкозу, оскільки схеми їх лікування відрізняються. Для диференційної діагностики використовують цитологічні та цитохімічні методи дослідження [6].

Показано, що “лікування гострих лейкемій – завжди етапний та тривалий процес, що складається з фази індукції ремісії, її консолідації та підтримувальної терапії, одночасно з профілактикою й, у разі необхідності, лікуванням нейролейкемії. Якщо завданням фази індукції є отримання повної клінічної ремісії, то завданням фази консолідації, найбільш агресивного та високодозового етапу лікування, – молекулярної ремісії, що означає максимальну ліквідацію мінімальної резидуальної хвороби, ознаки якої виявляють лише на цитогенетичному та молекулярно-біологічному рівнях” [7].

Метою роботи став аналіз гематологічних показників у пацієнтів з гострим лімфобластним та мієлобластним лейкозом.

Для досягнення мети були поставлені **завдання**:

1. Проаналізувати результати визначення вмісту загальної кількості лейкоцитів, лімфоцитів, тромбоцитів у крові пацієнтів з гострим мієлобластним та лімфобластним лейкозом.

2. Оцінити показники еритроцитів та гемоглобіну у крові пацієнтів з гострим мієлобластним та лімфобластним лейкозом.

3. Порівняти морфологію бластних клітин у крові пацієнтів з гострим мієлобластним та лімфобластним лейкозом.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1. Етіопатогенез гострих лейкозів

В останні роки спостерігається ріст онкологічної захворюваності, у тому числі гострим лейкозом, частота якого складає 5 випадків на 100000 населення. Серед злоякісних новоутворень кровотворної та лімфоїдної тканини, на частку лейкозів припадає до 40 %. Найвища частота захворюваності спостерігається у віці від 2 до 5 років зі зменшення кількості хворих до 7 років. Незначне підвищення захворюваності спостерігається у віці 10-13 років. Хлопчики хворіють частіше, ніж дівчатка [8].

Лейкози крові – системні пухлинні захворювання кровотворної тканини з гематогенним поширенням незрілих бластних форм в інші органи і тканини. Пухлина представлена незрілими бластними клітинами, що витісняють нормальні елементи у кістковому мозку та інфільтрують різні органи та тканини. Наслідком пухлинної трансформації клітин є зміна їх морфофункціональних властивостей. Характерною рисою мієлобластного типу проліферації є швидка дисемінація (поширення) пухлинних клітин по системі кровотворення. Внаслідок цього уже на ранніх етапах захворювання набуває системного характеру [9].

Гострий лейкоз – це клональне захворювання, що виникає з однієї мутованої клітини-попередника. За морфологічними ознаками клітин гострий лейкоз класифікується як гострий мієлобластний лейкоз (ГМЛ) і гострий лімфобластний лейкоз (ГЛЛ). Існує невисокий відсоток біклональних лейкозів – лімфобластні з експресією мієлоїдних маркерів або мієлоїдні з експресією лімфобластних маркерів [10].

Гострий недиференційований лейкоз виділяють у тих випадках, коли ідентифікація клітин сучасними методами дослідження утруднена. У дітей на ГЛЛ припадає 80 % випадків захворювання, 15-17 % – на ГМЛ.

Усі гомопоетичні клітини походять із стовбурових клітин, які в нормі саморегулюються і забезпечують безперервну продукцію клітин крові протягом життя людини. Ці клітини здатні регулювати гемопоез шляхом

диференціювання у зрілі спеціалізовані клітини, взаємодії один з одним і з клітинами мікрооточення, що дозволяє проводити постійну заміну зруйнованих клітинних елементів крові [11].

З двох дочірніх клітин одна зберігає властивості стовбурових клітин, а інша диференціюється у відповідь на потребу в окремих клітинах крові. Дозрілі клітини крові запрограмовані на апоптоз, тоді як стовбурові клітини повинні зберігатися для підтримання життя організму. Ця закономірність порушується при злоякісних пухлинах системи крові. При гострому лейкозі пухлинні клітини самовідновлюються, але не диференціюються і, як наслідок, бластні форми накопичуються без утворення з них зрілих нащадків. Приналежність бластних клітин до певної лінії кровотворення та ступінь їх диференціації зумовлює клінічний перебіг гострого лейкозу, а також терапію, ефективність проведеного лікування та прогноз захворювання [12]. При відсутності диференціювання і безконтрольної проліферації в організмі відбувається накопичення патологічних клітин, і через деякий час лейкозні клітини витісняють, а потім і заміщують кровотворну паренхіму кісткового мозку і її нормальне мікрооточення.

На сьогодні етіологія гострого лейкозу точно не встановлена [13]. Припускають існування кількох причин виникнення гострого лейкозу, причому для цього необхідно як мінімум два незалежних послідовно діючих мутагенних фактори. Значну роль відіграють генетичні фактори, на що вказують випадки родинного лейкозу, можливість захворіти лейкозом близнюками, наявність різних конституціональних змін у хромосомному апараті хворих на гострий лейкоз, виявлення хромосомних аберацій (транслокації, делеції, інверсії) у лейкозних клітинах. Ризик виникнення лейкозів вищий при захворюваннях, при яких спостерігаються спонтанні розриви хромосом: хвороба Дауна, анемія Франконі, синдром Блюма та ін. Також до етіологічних факторів гострих лейкозів відносять віруси, іонізуючу радіацію, хімічні мутагени [14].

Стадії патогенезу лейкозів відображають типову фазність виникнення пухлин [15]:

1 стадія – ініціація або пухлинної трансформації. За дії канцерогенних чинників у стовбуровій або ураженій гемопоетичній клітині кісткового мозку виникають точкові мутації генів-супресорів, а також онкогенів, при цьому блокується антибластомна програма. Завдяки таким генним порушенням мутовані клітини набувають здатність до необмеженого поділу, що вважають визначальною характеристикою пухлинного росту. Таким чином стовбурова клітина перетворюється на стовбурову лейкозну клітину;

2 стадія – промоція (моноклонова стадія лейкозу). Якщо в організмі присутні промоторні чинники, які здатні посилювати проліферацію клітин, лейкозна стовбурова клітина необмежено ділиться, наслідком чого буде утворення моноклону з наступним збільшенням його кількості. Тобто, формування пухлинної популяції базується на появі однієї злоякісної стовбурової клітини, а потім – клону лейкозних клітин;

3 стадія – прогресія (оліго-поліклонова стадія лейкозу). Під час цієї стадії виникають нові мутації, що сприяє подальшій дестабілізації геному трансформованих клітин моноклону, гіперекспресії нових онкогенів і супресії антионкогенів. Наслідком вказаних змін стає утворення агресивніших субклонів, клітини яких набувають властивості злоякісності із метаплазією нормального гемопоезу, поширенням гематогенним шляхом у інші тканини з формуванням у них інфільтратів проліферуючих бластів, осередків спотвореного гемопоезу. Лейкозна популяція стає агресивною оліго- та поліклоновою, що клінічно проявляється погіршенням перебігу гострих лейкозів і бластними кризами у динаміці хронічних лейкозів.

2. Особливості клінічного перебігу гострого лейкозу

Клінічна картина маніфестації гострих лейкозів дуже різноманітна і неспецифічна, водночас асоціюється з лейкемічною інфільтрацією кісткового мозку, коли пухлинний клон витісняє нормальні осередки кровотворення і

призводить до анемії, тромбоцитопенії, гранулоцитопенії та станів, які проявляються типовими синдромами [9, 10]:

- анемічний – розвивається внаслідок пригнічення еритроїдного осередку кровотворення лейкозними бластами, причому постгеморагічний генез діагностується у більшості хворих; характерна важка метапластична анемія;

- геморагічний – спостерігається при пригніченні мегакаріоцитарного осередку кровотворення і проявляється зниженням кількості тромбоцитів у периферійній крові різного ступеня вираженості; характерне порушення згортальної системи крові, що супроводжується масивними кровотечами і крововиливами;

- синдром пухлинної інтоксикації – виникає при наявності і розпаді великої пухлинної маси; проявляється лихоманкою, загальною слабкістю, анорексією, зниженням маси тіла, кахексією, які особливо виражені при резистентності до цитостатичної хіміотерапії;

- гіперпластичний синдром – проявляється помірним і безболісним збільшенням лімфовузлів, печінки, селезінки у 30-50 % випадків; обумовлений цей синдром утворенням екстрamedулярних інфільтратів проліферуючих бластів у органах і тканинах, що індукує регіонарну чи генералізовану лімфоаденопатію, гепатомегалію, спленомегалію, гіперплазію ясен, утворенням шкірних лейкемідів;

- синдром інфекційних ускладнень – найчастіше є першим проявом лейкозу, коли пневмонії, тонзиліти, інфекції сечовивідних шляхів слугують приводом для госпіталізації хворих в стаціонар і при обстеженні виявляється гострий лейкоз. Порушення нормального грануло-, моноцито- і лімфоцитопоезу зумовлює порушення імунних реакцій організму при лейкозі. Інфекційний синдром обумовлений виникненням панцитопенії, мієлотоксичного агранулоцитозу, що провокують важкі вірусні чи бактеріальні ураження організму;

- нейролейкемічний синдром зумовлений метастазуванням бластних клітин у мозкові оболонки головного і спинного мозку, порушенням мозкового кровообігу, появою менінгеальних і гіпертензивних станів, порушення локомоторної і сенсорної функції, бластною інфільтрацією черепномозкових і периферійних нервів з фомуванням больових відчуттів. Бластні проліферати у кістках і суглобах провокують виражений біль – осалгії та атралгії.

У периферійній крові при гострих лейкозах бласти можуть складати 90-95 % усіх лейкоцитів, вже на початку хвороби спостерігається анемія, тромбоцитопенія або панцитопенія, лейкоемічний провал.

В залежності від форми клітин, що утворюють пухлину, виділяють лейкози гострі і хронічні. Гострий лейкоз представлений в основному бластами, тоді як хронічний – зрілими і дозріваючими формами [16].

Початок гострих лейкозів не має характерної клінічної картини: хворі не відчувають себе хворими аж до повсюдного розселення пухлинних клітин по кровотворній системі і розвитку органних порушень. До основних проявів гострих лейкозів належать: часті інфекційні захворювання, інтоксикація, анемія, кровотечі, болі у кістках і суглобах, збільшення лімфатичних вузлів, спленогепатомегалія. Всі ці ознаки можуть бути приводом для звернення до лікаря, але самі по собі не мають діагностичної цінності і не є ранніми ознаками пухлинного росту. Діагноз гострого лейкозу можна встановити тільки морфологічно – шляхом виявлення бластних пухлинних клітин у крові або кістковому мозку.

У перебігу гострого лейкозу виділяють наступні періоди [17]:

- передлейкозний
- гострий
- ремісії
- рецидив
- термінальний

Передлейкозний період часто не діагностується, оскільки специфічних клінічних симптомів, характерних для цієї стадії, немає. Може спостерігатися зміна поведінки, кволість, відмова від участі у колективних іграх, можливі невмотивовані підйоми температури тіла, зниження апетиту, наростаюча слабкість, ознаки імунодефіциту. У ряді випадків в аналізі периферійної крові вдається виявити зміни у вигляді анемії, гранулоцитопенії, тромбоцитопенії. Проте частіше такі зміни виявляють у пунктаті кісткового мозку.

Гострий період лейкозу має виражений початок і характеризується поліморфізмом клінічних проявів [18]. Ранніми є симптоми інтоксикації, лихоманка, анорексія без значної втрати маси тіла. На фоні загального нездужання у дитини може виникнути біль у кістках або суглубах. Вона може бути вираженою, виникати гостро, посилюватися ночами і домінувати у клінічній картині. Кістково-суглобовий синдром зумовлений лейкемічною інфільтрацією надкiстя і суглобової капсули за рахунок збільшення об'єму кісткового мозку, остеопорозу або асептичного некрозу. Раннім симптомом гострого лейкозу є наростаюча блідість шкірних покривів і видимих слизових. Геморагічний синдром різного ступеня вираженості, зумовлений тромбоцитопенією, спостерігається майже у половини хворих. На шкірі і слизових з'являються поодинокі або множинні геморагії різної форми і величини, можуть спостерігатися кровотечі (носові, шлунково-кишкові, маткові та ін.) [19].

Один із основних симптомів гострого лейкозу у дітей – безболісне збільшення периферійних лімфатичних вузлів, найчастіше – підщелепних, шийних, пахових. Практично у всіх дітей спостерігається збільшення розмірів печінки і селезінки [20].

До рідкісних проявів гострих лейкозів у дітей належать зміни на шкірі і в підшкірній клітковині у вигляді синюшних, щільних, безболісних інфільтратів (лейкемідів). Можливі некротичні ураження шкіри та слизових оболонок ротової порожнини (гінгвіт, стоматит).

У деяких дітей уже в дебюті захворювання є екстрамедулярні осередки ураження. Специфічне ураження ЦНС – нейролейкемія, яка може протікати у вигляді менінгіту, менінгоенцефаліту, енцефаліту. Рідше осередки лейкемічної інфільтрації виявляються у яєчках, слинних залозах. Зрідка можуть вражатися нирки, легені, серце.

Повною ремісією вважається відсутність клінічних симптомів захворювання при такому стані кровотворення, коли в кістковому мозку виявляється не більше 5 % бластних клітин, відсутні екстрамедулярні осередки кровотворення, не виявляються пухлинні клітини у периферійній крові [10].

3. Клінічні варіанти гострого лейкозу

Згідно клональної теорії ріст лейкозної популяції відбувається із однієї клітини і швидкість росту залежить від частки активно проліферуючих клітин, їх генераційного часу, кількості клітин з обмеженою тривалістю життя, швидкості втрати клітин. Коли лейкемічна популяція досягає певної маси, відбувається гальмування диференціювання і проліферативна активність переважає над нормальним кровотворенням [21]. Трансформація від доброякісної до злоякісної стадії за умов різних гемобластозів спостерігається з різною частотою та інтервалом. У стовбуровій клітині з мутаціями спостерігається дисбаланс між процесами проліферації та диференціювання, і як наслідок відбувається неконтрольована проліферація злоякісної клітини, що починає переважати над нормальним клоном гемопоєзу. Коли клон трансформованих клітин досягає певної маси спостерігається порушення диференціювання нормального клоно стовбурових клітин згідно принципу зворотного зв'язку. Через такі зміни спостерігається гальмування кровотворення з появою анемії, нейтропенії, тромбоцитопенії. Відомо, що для формування 1 кг ракових клітин потрібно 3,5 року. Тому перший пік захворюваності на ракові захворювання крові у дітей характерний для дітей у 2-4 роки [3].

Важливу роль у патогенезі лейкемій відіграють процеси інвазії змінених стовбурових клітин, що можуть метастазувати на стадії як доброякісного, так і злоякісного розвитку. Потрапляючи у віддалені органи і тканини, трансформовані клітини сприяють появі екстремедулярного осередку кровотворення, що клінічно супроводжується такими проявами як гепато- та спленомегалія, лімфоаденопатія, лейкеміди на шкірі, нейтролейкемії тощо.

Етапи патогенезу гострих лейкемій:

“1. Пригнічення нормальних паростків гемопоезу.

2. Розвиток бластного кризу, при якому зменшується кількість диференційованих клітин і з’являються бласти.

3. Підвищена мінливість бластів, що веде до появи нових клонів бластів з утраченою ферментною специфічністю та зміненою морфологією, тобто поява недиференційованих клітин.

4. Метастазування – поява проліфератів лейкозних клітин поза органами гемопоезу.

5. Втрата бластними клітинами чутливості до цитостатичних препаратів, раніше ефективних.

6. Бластемія – вихід клітин кісткового мозку в периферичну кров” [6].

Всі лейкози проходять вказані фази пухлинної прогресії, проте їх послідовність у різних пацієнтів може бути різною.

Основою сучасної класифікації лейкозів є FAB-класифікація, побудована на критеріях, отриманих при морфологічному та цитохімічному вивченні бластів. За морфологічними критеріями бластних клітин гострий лімфобластний лейкоз має три типи клітин: L1, L2, L3 [9].

L1 – типові мікролімфобласти з незначною кількістю цитоплазми;

L2 – великі лімфобласти з великою кількістю помірно базофільної цитоплазми, чіткими 1-3 ядерцями неправильної форми.

L3 – клітини з вираженою базофілією цитоплазми та її вакуолізацією. Лімфобласти L3 мають поверхневі імуноглобуліни та інші маркери В-лімфоцитів. Серед хворих біля 85 % мають варіант L1, 14 % – L2, 1 % – L3.

Морфологічна класифікація гострих нелімфобластних лейкемій:

M0 – гострий мієлобластний лейкоз з мінімальним диференціюванням;

M1 – гострий мієлобластний лейкоз без ознак дозрівання;

M2 – гострий мієлобластний лейкоз з дозріванням;

M3 – гіпергранулярний промієлоцитарний лейкоз;

M4 – гострий мієломоноцитарний лейкоз;

M5a – гострий монобластний і моноцитарний лейкоз без ознак дозрівання;

M5b – гострий монобластний і моноцитарний лейкоз з ознаками дозрівання;

M6 – гострий еритроїдний лейкоз;

M7 – гострий мегакаріобластний лейкоз.

Основні імунологічні форми гострої лейкемії та їх субваріанти:

“1. В-лінійні:

a) В-1 (про-В) ГЛЛ – виявляються у 70% випадків ГЛЛ дітей та у 50% дорослих,

b) В-Н (common) ГЛЛ,

c) В-Ш (пре-В) ГЛЛ — близько 25% ГЛЛ у дітей,

d) В-IV (зрілий-В) ГЛЛ — діагностується у 2-5% випадків усіх ГЛЛ;

2. Т-лінійні:

a) Т-I (про-Т) ГЛЛ діагностуються у 15% випадків у дітей та у 20-25% у дорослих,

b) Т-Н (пре-Т) ГЛЛ,

c) Т-III (кортикальний) ГЛЛ,

d) Т-IV (зрілий-Т) ГЛЛ,

e) Т-a/p і y/8.

3. Гострі мієлоїдні лейкемії (ГМЛ):

- a) мієломоноцитарний,
 - b) еритроїдний (ранній), незрілий і зрілий,
 - c) мегакаріоцитарний,
 - d) низькодиференційований мієлоїдний (ГМЛ-М0),
 - e) TdT+ГМЛ,
 - t) ГМЛ із експресією 1 або 2 лімфоїдних маркерів (лімф+ГМЛ);
4. Біфенотипові гострі лейкемії;
5. Недиференційовані гострі лейкемії” [7].

Імунофенотипування бластних клітин при гострій лейкемії використовується для підтвердження чи постановки діагнозу за умови, якщо цитоморфологічне дослідження не дозволило встановити точний діагноз, а також для визначення біфенотипових варіантів хвороби чи встановлення прогностичних груп.

Визначальним є імунофенотипування для діагностування імунологічних субваріантів, оскільки це є ключовою основою для призначення адекватної, з урахуванням факторів ризику, хіміотерапії та досягнення позитивних результатів – отримання у більшості дітей та дорослих повної ремісії [22].

4. Підходи до діагностики та терапії гострих лейкозів

Своєчасна діагностика гострого лейкозу підвищує ефективність проведення протипухлинної терапії і дає шанс на повне одужання. Завдяки використанню міжнародних протоколів лікування гострих лейкозів виживаність дітей у віці до 18 років досягла у наш час 85 % [23].

Раніше для диференційної діагностики різних варіантів гострих лейкозів використовували цитохімічне дослідження препаратів, приготованих із матеріалу, отриманого при стерильній пункції. Цитохімічне дослідження клітин крові і пунктатів кісткового мозку базується на здатності деяких речовин і ферментів, задіяних у метаболізмі клітини, вступати у реакцію з певними барвниками і давати специфічне забарвлення.

В сучасній гематології найпріоритетнішим методом діагностики є проточна цитофлюориметрія. Використання імунофенотипування клітин методом проточної цитофлюориметрії дозволяє характеризувати клітину за кількома антигенними детермінантами, внаслідок чого визначені диференційно-діагностичні критерії гострих лейкозів, що дозволяють оцінити функціональний стан імунокомпетентних клітин [24].

Першим діагностичним заходом при підозрі на гострий лейкоз є проведення клінічного аналізу крові у динаміці, при якому можуть виявлятися: анемія, тромбоцитопенія, лейкопенія, нормальний вміст лейкоцитів, лейкоцитоз, гіперлейкоцитоз. Майже у всіх хворих у цей період виявляються бластні клітини. У лейкограмі виявляються бластні клітини при відсутності перехідних форм (промієлоцитів і мієлоцитів), є зрілі гранулоцити, число яких може бути знижено за рахунок збільшення вмісту лімфоцитів та бластних клітин [25].

Наступний етап діагностики проводиться у спеціалізованому онкогематологічному відділенні. Необхідне дослідження кісткового мозку для оцінки усіх осередків гемопоєзу, визначення кількості бластних клітин. Діагноз гострого лейкозу встановлюється при наявності у кістково-мозковому пунктаті понад 20-30 % бластних клітин. Обов'язкове цитохімічне дослідження для встановлення приналежності клітин до певної лінії диференціювання (мієло- чи лімфобластний) [26]. Після уточнення діагнозу необхідна верифікація імуноферментного варіанту захворювання, виявлення цитогенетичних поломок і визначення молекулярно-біологічного профілю клітин лейкемічного клону.

Гематологічна картина гострих лейкозів може бути представлена у двох варіантах [27]:

1. При виході бластних клітин у кров у ній зустрічаються одночасно молоді (бластні) клітини (80-90 % лейкоцитарної формули) та зрілі гранулоцити, моноцити, лімфоцити. Проте у мазку крові вміст промієлоцитів

і мієлоцитів при гострих лейкозах невеликий і “провал” у формулі між молодими і зрілими клітинами зберігається (лейкемічний провал).

2. Якщо бластні клітини не набули здатності до виходу із кісткового мозку у периферійну кров, але вже викликали деякі порушення, то їх достатньо багато у кістковому мозку. При цьому, як правило, будуть порушення у складі клітинних елементів крові: лейкопенія, анемія, тромбоцитопенія.

На другому етапі проводять цитохімічні маркерні реакції [6]:

1. Позитивна реакція на судан і пероксидазу (гострий мієлобластний лейкоз).
2. Різко позитивна реакція на неспецифічну естеразу (гострий монобластний лейкоз).
3. Позитивна реакція на глікоген (гострий лімфолейкоз).

При виникненні сумнівів проводиться пункція кісткового мозку.

Діагностичними критеріями гострої лімфобластної лейкемії є: лейкоцитоз (високий і швидко наростаючий при підтипах Т-лінії), при підтипі про-В у 25% хворих лейкоцитоз >100000 /мкл, а при деяких формах (особливо у ранній стадії) – лейкопенія, зазвичай анемія, нейтропенія, тромбоцитопенія, наявність лімфобластів у мазку крові, еозинофілія. Морфологічне дослідження та імунофенотипування кісткового мозку мають основне значення для: встановлення наявності лейкозних лімфобластів, для встановлення діагнозу необхідне виявлення ≥ 2 «маркерів» лінії В- або Т-лімфоцитів [28]. У 20% випадках переважають симптоми лімфобластної лімфоми: інфільтрати виникають в основному у лімфатичних вузлах, а у кістковому мозку лейкозні клітини складають < 20 –25%; у таких випадках може бути необхідним дослідження лімфовузла.

Для визначення ступеня залученості у патологічний процес різних органів і систем хворим показане проведення наступного дослідження:

- рентгенографія органів грудної кліки;
- УЗД органів черевної провідності;

- діагностична люмбальна пункція;
- МРТ головного мозку – при наявності показів (неврологічна симптоматика);
- біопсія яєчок при підозрі на їх ураження;
- консультація невролога, офтальмолога, отоларинголога.

Диференційну діагностику гострого лейкозу слід проводити з інфекційним мононуклеозом, інфекційним лімфоцитозом, апластичною анемією, ревматоїдним артритом, внутрішньоутробними інфекціями, остеомієлітом тощо.

Отже, алгоритм патофізіологічного аналізу гемограм при лейкозах включає [10]:

1. Встановити наявність у гемограмі лейкозних бластів, що є абсолютною ознакою лейкозу. При відсутності у периферійній крові бластів, але наявності клінічних проявів лейкозів, необхідно дослідити кістковий мозок.

2. Встановити тип лейкозу (міелоїдний чи лімфоїдний), який визначається за типом бластів. Для лімфоїдних лейкозів характерні типи бластів – Т-, В-лімфобласти; для міелоїдних лейкозів – мієлобласти, монобласти, еритробласти, мегакаріобласти, атипові промієлоцити та промоноцити.

3. Встановити тип гострих лейкозів, оцінивши характеристики бластів (морфологічна, цитохімічна, цитогенетична, імунофенотипова, генна).

4. Оцінити відсотковий вміст у крові атипових лейкозних бластів для визначення виду лейкозу: гострий чи хронічний. Якщо вміст лейкозних бластів перевищує 20 %, то це вказує на гострий лейкоз або стадію бластного кризу хронічного лейкозу.

5. Визначити тип і варіант гострого лейкозу на основі вказаних у гемограмі типу лейкозних бластів або їх характеристик, відсоткового вмісту бластів.

6. Оцінити сумарну кількість лейкоцитів периферійної крові. Якщо кількість лейкоцитів перевищує $100 \times 10^9/\text{л}$, то це достатній діагностичний критерій лейкемічного лейкозу навіть за відсутності у крові лейкозних бластів.

7. Оцінити лейкоцитарну формулу з метою встановлення типових змін при гострих і хронічних лейкозах.

8. Оцінити типові порушення лейкограми при лейкозах: встановити наявність базофільно-еозинофільної асоціації (характерне для хронічного мієлобластного лейкозу); встановити наявність гранулоцитопенії (характерне для гострих лейкозів); встановити наявність вираженого абсолютного лімфоцитозу (діагностичний критерій хронічного лімфолейкозу) тощо.

9. Оцінити сумарний вміст зрілих клітин крові (еритроцитів, тромбоцитів, лейкоцитів): наявність панцитопенії, панцитозу.

10. Оцінити порушення у системі еритроцитів за вмістом еритроцитів, гемоглобіну, гематокриту, вмісту ретикулоцитів.

11. Оцінити вміст тромбоцитів.

12. Оцінити прогностичні критерії лейкозів.

Лікування гострих лейкозів передбачає такі етапи [33]:

1. Стартова терапія: мета – зниження маси лейкозних клітин, що зменшує ймовірність синдрому лізису пухлини; застосовують преднізолон або дексаметазон.

2. Індукція ремісії: мета – видалення маси пухлини; поліхіміотерапія (найчастіше, вінкрисин, антрациклін і преднізолон/дексаметазон, аспарагіназа; як правило, протягом 4 тижнів).

3. Консолідація ремісії: мета – ліквідація залишкових проявів хвороби; послідовне введення високих або середніх доз протипухлинних препаратів.

4. Післяконсолідаційне лікування:

1) в групі стандартного ризику і у пацієнтів, які не кваліфікуються до проведення НСТ з огляду на незадовільний загальний стан, супутні захворювання або старший вік – підтримуюча терапія впродовж 2 років;

2) у групі підвищеного ризику (> 80% дорослих хворих) – allo-НСТ – від HLA-сумісного родича або неродинного донора; якщо немає донора слід розглянути auto-НСТ.

5. Лікування форм з Ph хромосоною: поєднання хіміотерапії з інгібіторами тирозинкіназ (імаїніб, дазатиніб) та кількісний моніторинг BCR-ABL1 до моменту allo-НСТ [29].

6. Профілактика і лікування змін в ЦНС: ліпосомальний цитарабін в/т. У випадку резистентності або наявності змін у паренхімі – опромінення ЦНС (на основу черепа та спинний мозок).

7. Тактика в разі неефективності препаратів першого ряду або рецидиву: нові препарати, препарати, що не мають перехресної резистентності з ЛЗ першої лінії (ідарубіцин, мітоксантрон), інші комбінації препаратів, НСТ.

Лікування гострого лімфоїдного лейкозу: протокольна хіміотерапія з урахуванням факторів ризику по даному захворюванню. Важливими прогностичними факторами є вік хворого, об'єм пухлинної маси, наявність несприятливих цитогенетичних аномалій [30].

Лікувальний протокол складається із індукції ремісії – протокол 1, консолідації – протокол М і реіндукції – протокол 2.

Лікування пацієнтів групи підвищеного ризику передбачає виконання інтенсивних елементів (блоків) хіміотерапії у якості консолідації/реіндукції ремісії (блоки HR1, HR2 і HR3) – всього 3 або 6 блоків [31]. Обо'язковим елементом лікувального протоколу є підтримуюча терапія з використанням пероральних цитостатиків. З моменту початку терапії і до закінчення інтенсивної фази терапії хворі отримують профілактичні/лікувальні інтратекальні введення хіміопрепаратів. Загальний період хіміотерапії складає 2 роки від початку лікування. Деяким групам пацієнтів проводиться профілактичне/лікувальне опромінення головного мозку в залежності від наявності ознак первинного специфічного ураження ЦНС, групи ризику і об'єму уже проведеної профілактичної терапії.

В якості основних способів лікування лейкемії визначено такі:

- Хіміотерапія – застосовуються відповідного типу медикаменти, дія яких дозволяє знищити ракові клітини.

- Радіотерапія або променева терапія – використання певного випромінювання (рентгенівського та ін.), за рахунок чого забезпечується можливість руйнування ракових клітин, крім цього зменшуються селезінка / печінка і лімфовузли. У деяких випадках цей спосіб застосовується в якості попередньої процедури для трансплантації стовбурових клітин.

- Трансплантація стовбурових клітин – за рахунок цієї процедури є можливість відновлення вироблення здорових клітин при одночасному поліпшенні роботи імунної системи. Перед трансплантацією проводять хіміо- або радіотерапію, застосування яких дозволяє зруйнувати певну кількість клітин кісткового мозку, а також звільнити під стовбурові клітини місце і послабити дію імунної системи. Слід зазначити, що досягнення останнього ефекту відіграє важливу роль для цієї процедури, інакше імунітет може почати відторгнення клітин, пересаджених пацієнту [32].

Прогноз при гострому лейкозі залежить від віку хворого та тактики терапії. Для хворих гострим лімфобластним лейкозом у віці 5-10 років ремісія спостерігається у 100 % випадків, одужання – у 90 %. Для хворих гострим лімфобластним лейкозом у віці до 30 років ремісія спостерігається у 95 % випадків, одужання – у 20 %.

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Об'єкт та методи дослідження

Дослідження крові пацієнтів з підозрою на лімфобластний чи мієлобластний лейкоз проводились на базі клініко-діагностичної лабораторії КНП "Ярмолинецька багатoproфільна лікарня". Забір крові проводився зранку, натще. Кров для дослідження брали з IV пальця лівої руки. Палець пацієнта дезинфікували сумішшю спирту з ефіром і робили прокол спеціальною голкою-скарифікатором, яку вводили збоку в пучку I фаланги на глибину 2,5-3 мм. Першу краплю крові витирали сухим ватним тампоном, а потім брали кров для дослідження. Для приготування мазків крові на предметне скло наносять краплю крові, шліфованим предметним скельцем торкаються краплі під кутом 45°, а потім достатньо швидко і без натискування просувають шліфованим скельцем справа наліво, допоки крапля не буде повністю використаною. Для приготування «товстої краплі» на предметне скло наносять краплю крові, і розширюють її до розміру однокопійкової монети. Залишають для висушування на папері.

Підрахунок лейкоцитів у камері Горяєва проводили стандартним методом. 0,02 мл крові змішували у пробірці з 0,38 мл 3% розчину оцтової кислоти, підфарбованої метиленовим синім. Отриманим розчином через 2 хв заповнюють камеру Горяєва і в 100 великих квадратах підраховують кількість лейкоцитів. Перерахунок здійснюють за формулою.

Вміст еритроцитів, гемоглобіну визначали з використанням автоматичного геманалізатора.

Для виявлення та оцінки кількості бластів у крові готували мазки стандартним методом. Мазки фіксували за Май-Грюнвальдом з подальшим фарбуванням за Романовським. Дослідження проводили з використанням імерсійної системи.

Підрахунок кількості тромбоцитів проводять у лічильних камерах або забарвлених мазках крові: "необхідно проколоти шкіру пальця й, зануривши кінець змішувача у краплю крові, набрати її до позначки 0,5. Простежити,

щоб у носику змішувача не було повітря, а стабілізаційна рідина не вилилась у краплю крові на пальці. Для цього треба тримати змішувач горизонтально. Набравши кров, занурити кінчик змішувача у пробірку з рідиною і набрати її до позначки 101. Перемішати вміст меланжера та залишити його в горизонтальному положенні на 10 хв, щоб відбувся гемоліз еритроцитів. Підготувати лічильну камеру. Заповнити її розчином з меланжера і покласти в чашку Петрі на 5 хв. Це потрібно для того, щоб тромбоцити осіли на дно. Потім вийняти з вологої камери, покласти під об'єктив мікроскопа і підрахувати тромбоцити у 25 великих квадратах сітки.

Кількість тромбоцитів у 1 мкл розраховують за такою формулою:

$$X = (a \cdot 400 \cdot 200) / 400,$$

де x – кількість тромбоцитів у 1 мкл;

a – кількість тромбоцитів у 400 малих квадратах;

200 – ступінь розведення крові;

400 – множник, що приводить результат до об'єму 1 мкл (виходячи із об'єму малого квадрата)” [33].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Microsoft Excel, використовуючи t-критерій Стьюдента. Вірогідними вважали результати, якщо $p \leq 0,05$.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ріст кількості хворих з гострими лейкозами, висока рання летальність, низький відсоток повних клініко-гематологічних ремісій потребують пошуку нових діагностичних і лікувальних підходів до даної категорії хворих [15]. До групи гострих лейкозів відносять гострий мієлобластний і гострий лімфобластний лейкоз. Першим кроком алгоритму дій є диференціація гострого лімфобластного та гострого мієлобластного лейкозу, оскільки схеми їх лікування кардинально відмінні [34]. При цьому першим діагностичним заходом при підозрі на гострий лейкоз є проведення клінічного аналізу крові.

Аналіз результатів лабораторних досліджень показав, що у пацієнтів з різними формами гострого лейкозу спостерігається виражене підвищення вмісту лейкоцитів (рис. 1). При цьому для пацієнтів з мієлобластним лейкозом характерний гіперлейкоцитоз, при якому вміст лейкоцитів у практично 100 разів перевищує показники норми.

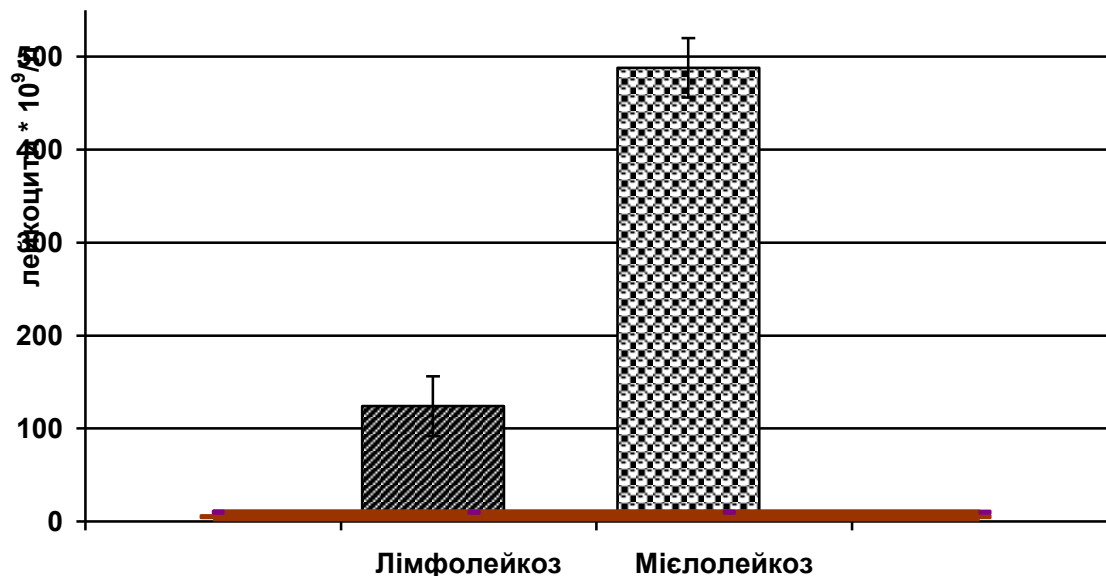


Рис. 1. Вміст лейкоцитів у крові пацієнтів з гострим лімфо- / мієлобластним лейкозом

При цьому поле зору препарату крові пацієнта з гострим мієлобластним лейкозом повністю вкрите лейкоцитами (рис. 2).

Відомо, що лейкоз – це гемобластоз, пухлинне захворювання крові, яке характеризується злоякісною та клональною проліферацією незрілих

бластних попередників, які втратили здатність до диференціювання [4]. Належність до тієї або іншої форми гострої лейкемії визначається тим, в якому локусі «гемопоетичного дерева» відбулися події, що зробили клітину-попередницю певного виду родоначальницею лейкозного клону. У кістковому відбувається неконтрольоване розмноження малігнізованих клітин-попередників з наступним їх розповсюдженням гематогенним і лімфогенним шляхом [7]. Оскільки при мієлобластному лейкоцитозі уражається гранулоцитарний осередок кровотворення, а основну частку лейкоцитів складають гранулоцити, тому гіперлейкоцитоз дозволяє запідозрити в першу чергу мієлобластний лейкоз.

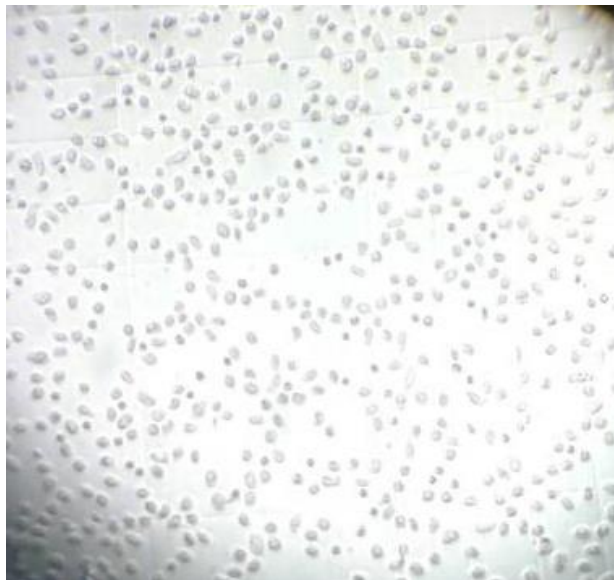


Рис. 2. Лейкоцитоз у пацієнтів з гострим мієлобластним лейкозом

Прояви гострого лейкозу переважно пов'язані з метаплазією лейкозними бластами нормальної гемопоетичної тканини кісткового мозку, що призводить до важкої кісткомозкової недостатності і формування анемічного, геморагічного та інфекційного синдромів. При гострих лейкозах бластні клітини швидко витісняють нормальні елементи кісткового мозку, що призводить до панцитонемії: еритропенії, тромбоцитопенії, нейтропенії [10].

Водночас у пацієнтів з лімфобластним лейкозом, що виникає внаслідок ураження лімфоцитарного осередку кровотворення, спостерігається

виражений лімфоцитоз (рис. 3), тоді як у пацієнтів з мієлобластним лейкозом рівень лімфоцитів у крові зберігається у межах норми.

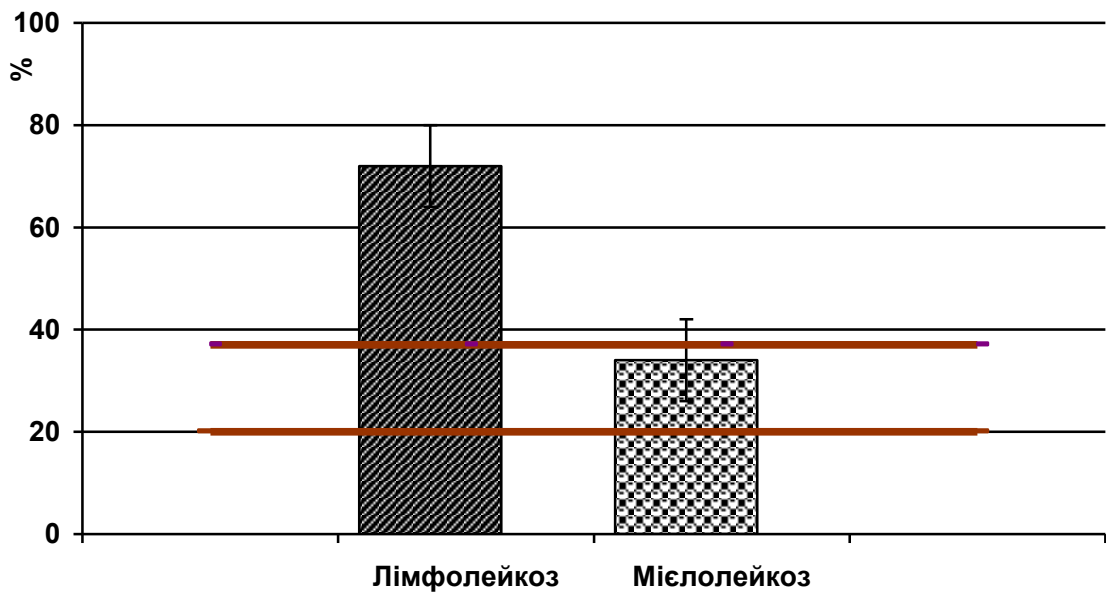


Рис. 3. Вміст лімфоцитів у крові пацієнтів з гострим лімфо- / мієлобластним лейкозом

Водночас у пацієнтів з лімфобластним та мієлобластним лейкозом спостерігається тромбоцитопенія (рис. 4).

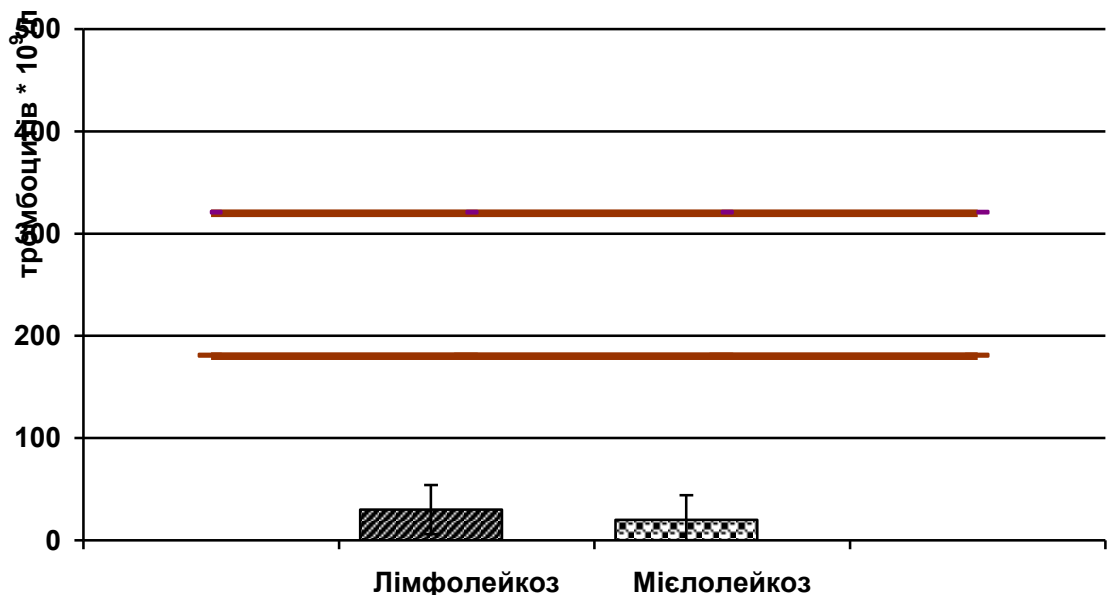


Рис. 4. Вміст тромбоцитів у крові пацієнтів з гострим лімфо- / мієлобластним лейкозом

Виявлена тромбоцитопенія при лейкозах є наслідком пригнічення мегакаріоцитарного осередку кровотворення, що проявляється зниженням

кількості тромбоцитів у периферійній крові. Наслідком встановленої тромбоцитопенії є виникнення геморагічного синдрому, характерної ознаки пацієнтів з лімфобластним та лейкобластним лейкозом.

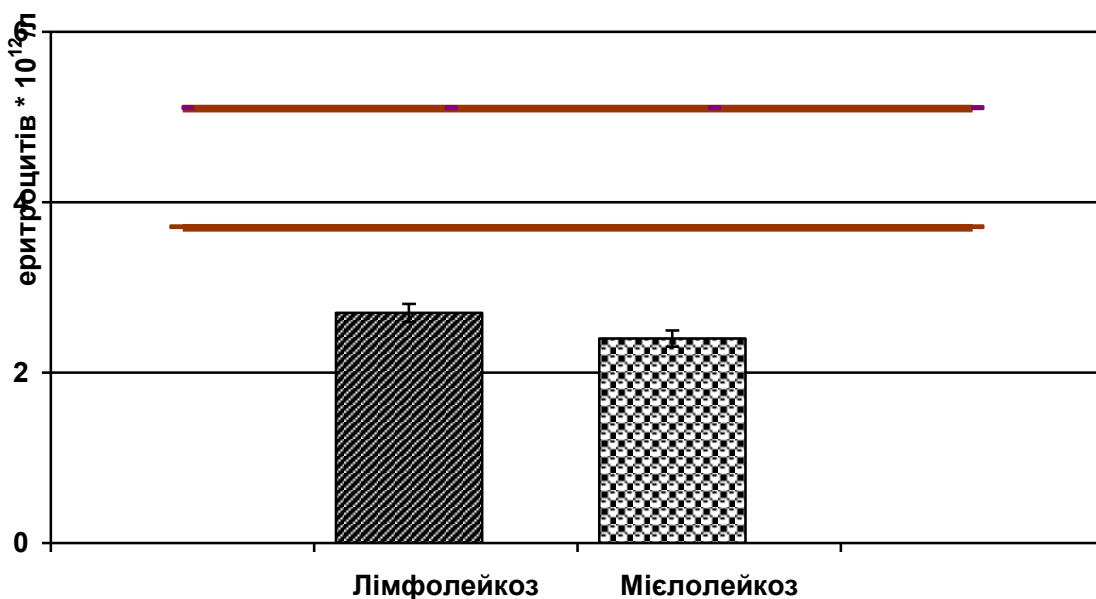


Рис. 5. Вміст еритроцитів у крові пацієнтів з гострим лімфо- / мієлобластним лейкозом

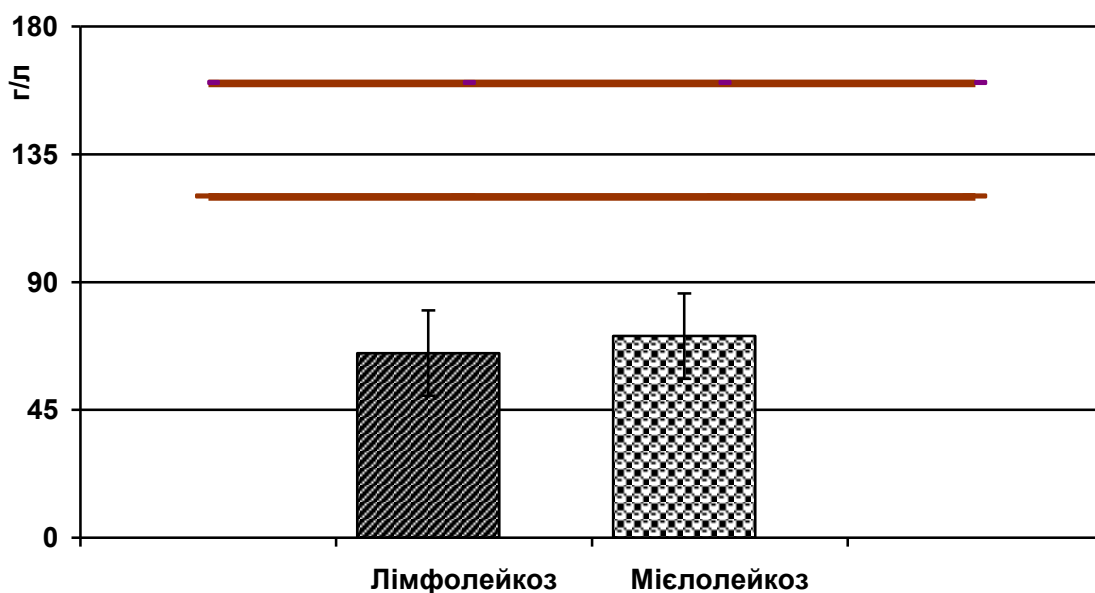


Рис. 6. Вміст гемоглобіну у крові пацієнтів з гострим лімфо- / мієлобластним лейкозом

Водночас результати аналізу лабораторних показників свідчать про формування у пацієнтів стану анемії, про що свідчить як виражене зниження

вмісту еритроцитів (рис. 5), так і гемоглобіну у крові (рис. 6). Такі зміни свідчать про пригнічення нормального кровотворення.

Отже, для пацієнтів як лімфобластним, так і мієлобластним лейкозом характерна анемія, тромбоцитопенія при одночасному лейкоцитозі. Водночас у пацієнтів з лімфобластним лейкозом спостерігається виражений лімфоцитоз, тоді як у пацієнтів з мієлобластним лейкозом рівень лімфоцитів у крові зберігається у межах норми.

Важливим діагностичним критерієм гострих лейкозів є виявлення у крові бластних клітин. За морфологічними критеріями бластних клітин гострий лімфобластний лейкоз має три типи клітин: L1, L2, L3 [10].

L1 – типові мікролімфобласти з незначною кількістю цитоплазми;

L2 – великі лімфобласти з великою кількістю помірно базофільної цитоплазми, чіткими 1-3 ядерцями неправильної форми;

L3 – клітини з вираженою базофілією цитоплазми та її вакуолізацією. Лімфобласти L3 мають поверхневі імуноглобуліни та інші маркери В-лімфоцитів. Серед хворих біля 85 % мають варіант L1, 14 % – L2, 1 % – L3.

Відомо, що бласти мають велике ядро з чіткими ядерцями та сіруватою цитоплазмою, у якій можуть виявлятися палички Ауера. Кількість бластів у крові пацієнтів з гострим лейкозом може коливатися від 20 до 95 %, що визначається стадією лейкозу. Слід відмітити, що для таких пацієнтів характерний лейкоцитарний провал, тобто у крові виявляється незначна кількість зрілих гранулоцитів.

Аналіз результатів досліджень показав, що у пацієнтів з лейкозом у мазку крові виявлялася велика кількість бластних клітин (рис. 7), які відрізнялися за морфологією. При гострому лейкозі пухлинні клітини самовідновлюються, але не диференціюються і, як наслідок, бластні форми накопичуються без утворення з них зрілих нащадків [25].

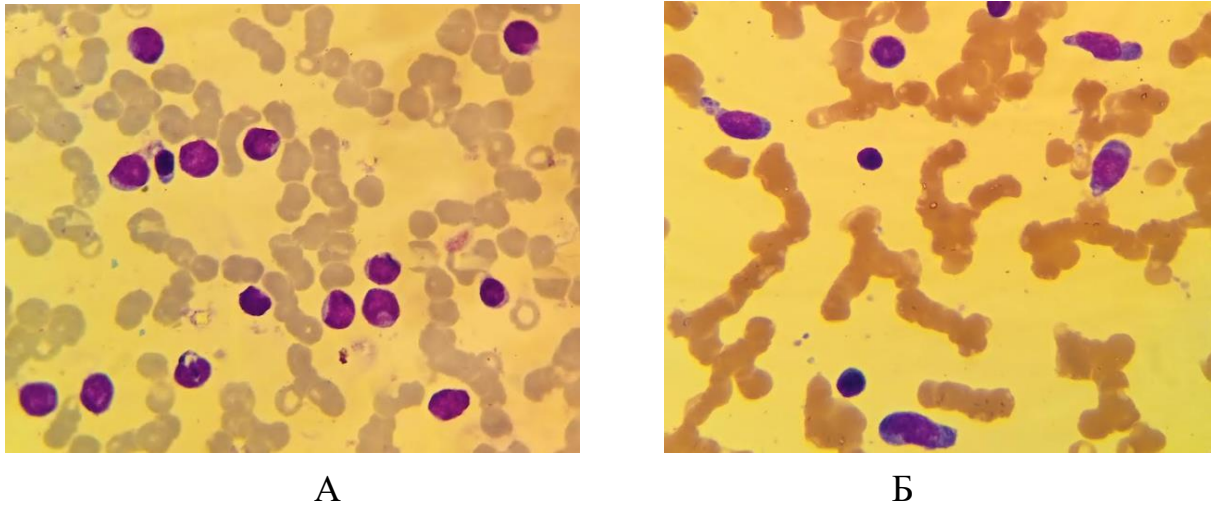


Рис. 7. Бластні клітини у мазку крові пацієнтів з гострим мієлобластним (А) і гострим лімфобластним (Б) лейкозом

Приналежність бластних клітин до певної лінії кровотворення та ступінь їх диференціації зумовлює клінічний перебіг гострого лейкозу, а також терапію, ефективність проведеного лікування та прогноз захворювання.

При відсутності диференціювання і неконтрольованої проліферації в організмі відбувається накопичення патологічних клітин, і через деякий час лейкозні клітини витісняють, а потім і заміщують кровотворну паренхіму кісткового мозку і її нормальне мікрооточення [23]. Для диференційної діагностики лімфобластного та мієлобластного лейкозу використовують цитохімічні методи, які дозволяють виявити у бластах різні речовини. Відомо, що при мієлобластному лейкозі у бластних клітинах присутні ліпіди, полісахариди, деякі ферменти – пероксидази, хлорацетатестерази. Водночас у бластах при гострому лімфобластному лейкозі локалізовані лише полісахариди, які можна виявити за допомогою PAS-реакції [6].

Отже, гематологічна картина при гострому лімфобластному та мієлобластному лейкозі відрізняється: для гострого лімфобластного лейкозу характерний помірний лейкоцитоз, лімфоцитоз при наявності великої кількості бластних клітин, тоді як для мієлобластного лейкозу характерний гіперлейкоцитоз. Водночас для пацієнтів з гострим лейкозом, незалежно від етіології захворювання, характерна анемія та тромбоцитопенія.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що для пацієнтів з лімфобластним лейкозом характерним є помірний лейкоцитоз, анемія, тромбоцитопенія та виражений лімфоцитоз, при цьому у мазку крові виявляється велика кількість бластних клітин.

2. Показано, що для пацієнтів з мієлобластним лейкозом характерний гіперлейкоцитоз, при якому вміст лейкоцитів у практично 100 разів перевищує показники норми, при збереженні у межах норми вмісту лімфоцитів у крові. Водночас для хворих характерна анемія та тромбоцитопенія, що зумовлено витісненням бластами нормальних елементів кісткового мозку.

Для диференційної діагностики лімфобластного та мієлобластного лейкозу проведений порівняльний аналіз морфології бластів, проте надалі необхідно використати цитохімічні методи для виявлення специфічних речовин у цитоплазмі бластів.