

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

КАФЕДРА ТЕХНОЛОГІЙ МЕДИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ

Магістерська робота

за спеціальністю 224 «Технології медичної діагностики та лікування»

НА ТЕМУ: «КЛІНІКО-ЛАБОРАТОРНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ЛЕЙКОЗІВ»

Виконала:

студентка 2 курсу, групи 4-24-089,

4-го медичного факультету,

спеціальності 224 «Технології медичної
діагностики та лікування»

Стецура Наталія Михайлівна

Керівник: к. фарм. н., доцент Авідзба Ю.Н.

Рецензент: д. мед. н, проф. Тюпка. Т.І.

Харків – 2026

Зміст

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1_ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ ВЧЕННЯ ПРО ЛЕЙКОЗИ.....	7
1.1.Загальна характеристика лейкозів	7
1.2.Етіологія гострих лейкозів	7
1.3.Класифікація лейкозів.....	8
1.4. Стадії розвитку гострого лейкозу	10
1.5. Лабораторна діагностика лейкозів	13
Висновок до першого розділу	16
РОЗДІЛ 2_КЛІНІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТА ЛАБОРАТОРНА ВЕРИФІКАЦІЯ НАЙПОШИРЕНІШИХ ЛЕЙКОЗІВ	17
2.1. Гострий мієлобластний лейкоз	17
2.2. Лабораторна діагностика ГМЛ	17
2.3. Гострий лімфобластний лейкоз.....	20
2.4. Основні аспекти діагностики ГЛЛ	21
2.5. Хронічний мієлолейкоз.....	23
2.6. Цитоморфологічна діагностика ХМЛ.....	24
2.7. Хронічний лімфолейкоз.....	25
2.8. Лабораторні дані при ХЛЛ.....	26
Висновок до другого розділу	28
РОЗДІЛ 3_МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	29
3.1. Об'єкт та матеріали дослідження	29
3.2. Методика виготовлення мазка периферичної крові	31
3.3. Методика фарбування мазків крові фарбою Азур-еозин за Романовським-	

1000.....	33
3.4. Методика фарбування мазків крові фарбою Leucodif 200	35
3.5. Експериментальна методологія	38
Висновок до третього розділу	45
РОЗДІЛ 4_РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОЦІНКА ПРОВЕДЕНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ	46
4.1. Аналіз та оцінка часу фарбування мазків периферичної крові Азур- еозином за Романовським-1000	46
4.2. Аналіз та оцінка часу фарбування мазків периферичної крові Leucodif-200	52
Висновок до четвертого розділу	60
ВИСНОВКИ.....	61
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	62

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

КМ — кістковий мозок

ГЛ — гостра лейкемія

ГЛЛ — гостра лімфоцитарна лейкемія

ГМЛ — гостра мієлобластна лейкемія

ХЛЛ — хронічна лімфоцитарна лейкемія

ХМЛ — хронічна мієлобластна лейкемія

ІГХ — імуногістохімія

МДС — мієлодиспластичні процеси

МРО — мієлопероксидаза

НЕ — неспецифічна естераза

ХАЕ — хлорацетатестераза

КФ — кисла фосфатаза

ЗАК — загальний аналіз крові

ЛФ — лужна фосфатаза

ВСТУП

Актуальність теми

Лейкози займають одну з найтяжчих та клінічно значущих груп гематологічних захворювань. Поширеність лейкозів зростає з кожним роком, а їх клінічний перебіг супроводжується все важчими ускладненнями, що обґрунтовує високу значущість даної проблеми. Тенденція до зростання хворих на лейкоз змушує не тільки вдосконалювати лікування, а й підвищувати ефективність та точність первинної діагностики, що в подальшому дозволить спрогнозувати перебіг захворювання та підвищити ефективність терапії.

У діагностичній практиці мікроскопія мазка периферичної крові є одним з базових методів первинної діагностики лейкозів. За допомогою цього методу клініцист за короткий час може визначити чи є у пацієнта гематологічне захворювання, яке в подальшому може досліджуватись більш детально. Для коректної ідентифікації клітин крові під час мікроскопії, важливим є їх правильне нанесення, фіксація і, найголовніше, фарбування препарату крові. На точну постановку діагнозу впливатимуть правильно ідентифіковані клітини за їхніми морфологічними ознаками, а безпосередньо на це буде впливати якість пофарбованого препарату. Сьогодні найпоширенішими методами забарвлення мазків є метод Романовського та його модифікація — Leucodif («Лейкодиф»). Під час роботи з цими фарбами є покрокові інструкції у використанні, але час фарбування є нечітким, що вимагає індивідуального підбору та визначення. Тому експериментальне дослідження часу фарбування мазків периферичної крові є актуальним та має практичну цінність у лабораторній практиці.

Мета роботи

Покращення діагностики лейкозів, шляхом експериментального визначення оптимального часу фарбування мазків периферичної крові фарбами Азур-еозином за Романовським-1000 та Leucodif 200. Клінічно обґрунтувати оптимальні протоколи фарбування мазків крові при лейкозах.

Завдання дослідження

Розібрати етіологічні чинники, патогенез, класифікацію та діагностику лейкозів. Проаналізувати особливості та значення морфологічного аналізу периферичної крові у діагностиці лейкозів. Протестувати та візуально порівняти морфологічні зміни клітин залежно від часу фарбування мазка крові фарбами Азур-еозином за Романовським-1000 та Leucodif 200. Визначити найкращий час фарбування для покращення диференціації клітин, сформулювати на основі цього рекомендації для фахівців лабораторної роботи.

Об'єкт дослідження

Мазок периферичної крові хворих на лейкоз.

РОЗДІЛ 1

ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ ВЧЕННЯ ПРО ЛЕЙКОЗИ

1.1. Загальна характеристика лейкозів

Лейкози — це сукупність захворювань системи крові, які утворюються через патологічне розростання клітин кровотворної системи, при яких первинно уражається кістковий мозок (КМ). Ці захворювання виникають з кровотворних клітин через мутації однієї стовбурової клітини.

Залежно від характеру перебігу та типу уражених лейкоцитів, лейкемії поділяються на декілька типів. Згідно першого критерію лейкемії поділяють на гострі (ті, що мають швидкий перебіг) та хронічні (повільний перебіг захворювання). При цьому одна форма не може переходити в іншу. Наступна класифікація орієнтується на типі клітини, яка піддається перетворенню — це можуть бути лімфоїдні або мієлоїдні клітини. Лейкоз, що виникає з лімфоїдних тканин, називається лімфоїдний, лімфоцитарний або ще лімфобластний. Якщо джерелом ураження є мієлоїдні клітини, такий лейкоз називають мієлоїдним або мієлобластним.

Головною ознакою лейкозів є первинне ураження клітин КМ, а не як наслідок метастазування інших пухлин і утворення вторинного вогнища росту.
[1]

1.2. Етіологія гострих лейкозів

Загальновизнаним є твердження про поліетіологічне походження ГЛ. Результати епідеміологічних досліджень виявили, що ризик виникнення ГЛ підвищується у 3–4 рази, у сім'ях, де вже був виявлений ГЛ. Також вченими було підтверджено збільшення вірогідності захворювання лейкозом при певних спадкових аномаліях, таких як синдром Дауна, синдром Клайнфельтера. У разі наявності ГЛ у одного з монозиготних близнюків ймовірність захворювання

другого складає 25%. Вважається, що спадкові фактори формують схильність до розвитку лейкозу, який потім проявляється під впливом екзогенних факторів, таких як іонізуюче випромінювання чи інші хімічні чинники. Також було доведено, що мутагенну дію може спричиняти генетична нестабільність кровотворних клітин під дією онкогенних факторів.

Серед етіологічних причин мутацій кровотворних клітин одне з найбільш смертельних є вплив іонізуючої радіації. Доведено збільшення кількості хворих ГЛ в Японії після впливу атомного вибуху. Так, наприклад, було визначено, що на відстані 1,5 від епіцентру катастрофи, кількість хворих ГЛ була в 45 разів більшою, ніж серед тих, що були на околицях цієї зони. Також вченими було виявлено значний вплив на розвиток ГЛ променевої терапії, внаслідок цього хворим часто обмежують призначення рентгендіагностичних процедур.

В механізмі розвитку ГЛ мають також вплив лікарські засоби, такі як: бутадіон, левоміцетин, цитостатичні препарати, а також контакт з деякими хімічними речовинами: фарбами, лаками, бензолом, пестицидами.

Однією з не менш важливих причин розвитку ГЛ, є вірусна дія на організм людини. Найбільш патогенний вплив серед всіх віддають, відкритому у 1982 р. Ретровірусу — Т-клітинний вірус І-НТЛВ-І. Його дія спрямована на вбудову вірусного генома в ДНК — клітину людини. Внаслідок цього змінюється генетична інформація клітини, а це призводить до безконтрольної проліферації без диференціювання. Через це у більшості хворих цитогенетично виявляють зміни у хромосомному апараті [2].

1.3. Класифікація лейкозів

На основі стабільних морфологічних цитохімічних показників, які відбивають особливості метаболізму лейкозних клітин, три вчені наприкінці 70-х років минулого століття створили FAB-класифікацію гострих лейкозів. Класифікація отримала свою назву завдяки своїм відкривачам, якими були

французький, американський та британський спеціалісти. Загально гострі лейкози класифікують на дві великі групи: мієлобластний та лімфобластний. Гострі лейкози мієлоцитарного ряду диференціюють за цитохімічними ознаками у лейкозних клітинах, такими як наявність або відсутність пероксидази, неспецифічних естераз, ліпідів, кислої фосфатази, глікогену та складних вуглеводів [1].

FAB — класифікація гострої мієлобластної лейкемії.

Mo – гостра мієлобластна лейкемія з недиференційованими бластними клітинами.

M1 – гостра мієлобластна лейкемія без ознак дозрівання бластів.

M2 – гостра мієлобластна лейкемія з ознаками дозрівання бластів.

M3 – гостра промієлоцитарна лейкемія.

M4 – гостра мієломоноцитарна лейкемія.

M5 – гостра моноцитарна лейкемія.

M6 – гостра еритролейкемія.

M7 – гостра мегакаріобластна лейкемія.

FAB- класифікація гострої лімфобластної лейкемії.

L1 – гостра лімфобластна лейкемія з малими розмірами бластів (частіше у дітей).

L2 – гостра лімфобластна лейкемія з великими розмірами бластів (частіше у дорослих).

L3 – гостра лімфобластна лейкемія з бластними клітинами типу клітин при лімфомі Беркіта.

Хронічні лейкемії класифікуються за такими пунктами:

I. Хронічні лейкемії мієлогенного походження:

- ⑩ хронічний мієлолейкоз;
- ⑩ хронічний моноцитарний та мієломоноцитарний лейкози;
- ⑩ ідіопатичний мієлофіброз;
- ⑩ есенціальний тромбоцитоз;
- ⑩ істинна поліцитемія (еритремія);
- ⑩ мієлодиспластичний синдром.

II. Хронічні лімфопроліферативні захворювання:

- ⑩ хронічний лімфолейкоз;
- ⑩ парантеїнемічні гемобластози (мієломна хвороба, макроглобулінемія Вальденстрема).
- ⑩ лімфоми та лімфосаркоми [1].

1.4. Стадії розвитку гострого лейкозу

1. Передлейкоз.
2. Початковий період.
3. Розгорнутий (повний розвиток захворювання).
4. Ремісія (зникнення симптомів, відновлення нормальних показників периферичної крові та мієлограми).
5. Рецидив (період загострення).
6. Заклучний період захворювання (термінальний).

Розгорнута клінічна стадія ГЛ проявляється внаслідок безконтрольної і посиленої проліферації, накопичення злякисних лейкозних клітин і помітних позакісткових проявів.

Клінічні прояви гострого лейкозу у розгорнутій стадії включають в себе:

1. Гіперпластичний синдром, спричинений лейкозною інфільтрацією тканин.

Він включає в себе:

- тонзиліти, гінгівіти, стоматити - виразково-некротичний синдром;
- біль та болісність суглобів та кісток – кісткового- суглобовий синдром;
- маткові кровотечі, гематурія, збільшення яєчників, збільшення та ущільнення яєчок, порушення сечовипускання – ураження сечостатевої системи;
- збільшення лімфатичних вузлів, піднебінних мигдалин – лімфопластичний синдром;
- гепатоспленомегалію – гепатолієнальний синдром;
- дисфагія та обструкція стравоходу, пептичні виразки шлунка, некротичний ентероколіт – ураження органів травлення;
- аритмія, ексудативний перикардит, ознаки міокардиту – ураження серця;
- кашель, задишка, дихальна недостатність, дрібнопухирчасті хрипи – ураження дихальної системи;
- ознаки гострої ниркової недостатності, піурія, протеїнурія, мікрогематурія – ниркове ураження;
- зниження гостроти зору, слъзотеча, світлобоязнь – ураження очей;
- цукровий діабет, можливі гіпокортицизм, гіпопітуїтаризм;
- поява щільних утворів різного кольору, які часто поєднані з свербіжем (лейкеміди);

2. Геморагічний синдром спричинений тромбоцитопенією, підвищеною проникністю судин, порушенням зсідання крові (коагуляція). Проявляється:

- великими підшкірними крововиливами, носовими, шлунковими, кишковими, нирковими, легеневими, матковими, внутрішньоцеребральними кровотечами.

3. Анемічний синдром – спричинений зменшенням кількості клітин червоного ростка кровотворення (еритроїдний ряд). При цьому будуть характерними:

- запаморочення, загальна слабкість, шум у вухах, блідість шкірних покривів, поява “метеликів” перед очима, серцебиття та задишка, тахікардія, екстрасистолія, приглушеність тонів серця, систолічний шум на вертушці, неспецифічні зміни ЕКГ. Виразність анемічного синдрому корелює зі ступенем проліферації лейкозних клітин в кістковому мозку.

4. Інтоксикаційний синдром – розвивається внаслідок підвищення розпаду лейкозних клітин. Проявляється:

- загальною слабкістю, нудотою, головним болем, високою температурою (непластична лихоманка) підвищеною втомлюваністю, сонливістю, зниженням апетиту, зниженням маси тіла, пітливістю (особливо вночі).

5. Імунодефіцитний синдром, причиною розвитку якого, є різке порушення клітинного та гуморального імунітету через функціональну неповноцінність лейкоцитів. Характерними є:

- пневмонії, ангіни, та будь-які інші бактеріальні, вірусні, грибкові інфекції бактеріальні, вірусні, грибкові [3,9].

1.5. Лабораторна діагностика лейкозів

Для діагностики та диференціальної діагностики лейкозів використовують мазок периферичної крові та пунктат кісткового мозку. На першому етапі проводиться визначення загального аналізу крові з підрахунком лейкоцитарної формули за допомогою світлового мікроскопа. У випадку виявлення недиференційованих клітин, проводять цитологічне дослідження кісткового мозку з підрахунком мієлограми.

Показники загального аналізу крові будуть включати:

- зазвичай нормохромна, нормоцитарна анемія, гіпохромна анемія розвивається за наявності кровотечі у анамнезі пацієнта;
- тромбоцитопенія розвивається у більшості хворих, їхня кількість може знижуватись до 10-15 Г/л. В рідкісних випадках (1-2 %) у периферичній крові наявний тромбоцитоз, при якому кількість тромбоцитів досягає понад 400 Г/л;
- кількість лейкоцитів при гострому лейкозі є досить різною. Числа можуть варіюватись у діапазоні від 1 до 200 Г/л. У мазку периферичної крові зазвичай будуть виявлятися бластні клітини, кількість їх також варіює від 1 до 95%;

Ще одним методом діагностики ГЛ у якому використовується світловий мікроскоп є цитохімічне дослідження. Цей метод ґрунтується на проведенні особливих хімічних реакцій безпосередньо в мазках крові або препаратах КМ, де реагенти вступають у зв'язок із певними метаболітами чи ферментами всередині пухлинних клітин. Результати реакції оцінюють за допомогою світлового мікроскопа, візуально визначаючи наявність, характер та інтенсивність забарвлення.

У таблиці 1.1 наведено цитохімічні реакції основних варіантів ГЛ.

Таблиця 1.1

Цитохімічні маркерні реакції	ГЛЛ	ГМЛ	ГМ ₀ Л	ГММ ₀ Л
неспецифічна естераза	-	-	+	+
мієлопероксидаза	-	+	-	-
ліпіди	-	+	-	+
глікоген	+	-	-	-

При гострих лейкозах пунктат кісткового мозку зазвичай містить у собі достатню кількість мієлокаріоцитів (30-400 Г/л), рідше зустрічається гіпоклітинність. Характерною ознакою гострого лейкозу є бластна метаплазія кісткового мозку, при цьому кількість бластів буде перевищувати 20%. Нормальні паростки гемопоезу звужені, та спостерігається значна дисплазія грануло- , еритро- і мегакаріоцитарного ростків кровотворення. Клітини характеризуються порушенням дозрівання ядра та цитоплазми, наявністю патологічних форм та порушенням функцій ферментів.

Важливою ланкою в діагностиці ГЛ є імунологічна верифікація проліферованих клітин. Суть цього методу становить імунофенотипування — це встановлення унікального набору антигенів (CD-маркерів), які містяться на поверхні пухлинних клітин та в самій цитоплазмі. Використовуючи ряд панелей із специфічними моноклональними антитілами дає можливість правильно визначити лінійну приналежність бластів, наприклад, мієлоїдну, В-лімфоїдну чи Т-лімфоїдну, а також ступінь їхнього диференціювання. Даний метод важливий не лише для встановлення діагнозу згідно з класифікацією ВООЗ, а й дає змогу спрогнозувати перебіг захворювання та характер ремісії.

Незмінним методом верифікації лейкозів є імуногістохімічне дослідження (ІГХ). Його часто використовують у випадках гіперклітинного кісткового мозку або при розвитку вторинного фіброзу - так званий феномен "сухого пунктату". При цій ситуації лікарю не вдається отримати рідку частину КМ стеральною пункцією і ІГХ стає єдиним підтвержувальним методом діагностики. ІГХ дослідження, на відміну від проточної цитометрії дає можливість досліджувати антигенний профіль клітин напряму у зрізах тканин, при цьому зберігаючи інформацію про рівень заміщення нормального гемопоезу та поширення пухлинного інфільтрату. Висока точність диференційної діагностики між різними підтипами лейкозів та іншими мієлодиспластичними процесами (МДС), здійснюється завдяки застосуванню маркерів незрілості, таких як CD34 та TdT, у комбінації з лінієспецифічними антитілами, наприклад, мієлопероксидазою (МРО), CD20, CD3 [2,9].

Висновок до першого розділу

Лейкози становлять складну і велику групу клональних злоякісних захворювань крові, які виникають через безконтрольну та посилену проліферацію патологічних лейкозних клітин. Це призводить до порушення нормального кровотворення клітин та накопичення пухлинних, спочатку у КМ, а згодом у периферичній крові, тканинах та органах, що спричиняє розвиток важких патологічних змін в організмі.

Розуміння природи виникнення та поширення лейкозів, дає змогу швидко і точно обирати правильні методи діагностики, для подальшого визначення терапевтичних схем.

РОЗДІЛ 2

КЛІНІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТА ЛАБОРАТОРНА ВЕРИФІКАЦІЯ НАЙПОШИРЕНІШИХ ЛЕЙКОЗІВ

2.1. Гострий мієлобластний лейкоз

Гострий мієлобластний лейкоз (ГМЛ) — це злоякісне новоутворення системи кровотворення, що виникає через неконтрольовану проліферацію мієлоїдних стовбурових клітин. ГМЛ відзначається швидким ростом числа пухлинних клітин, які накопичуються у КМ та периферичній крові, при цьому перешкоджають росту і розвитку нормальних клітин крові.

ГМЛ у 80% випадків зустрічається у дорослих, у дітей цей відсоток становить 10-20%. Також патогенез лейкозу нерідко пов'язаний з вагітністю, статистика показує, що ГМЛ трапляється в 1 з 10 000 вагітних жінок [11].

2.2. Лабораторна діагностика ГМЛ

Для діагностики та диференціального визначення ГМЛ використовують периферичну кров та КМ хворих на гемобластоз. Діагноз підтверджується в разі виявлення у мієлограмі >20% бластів, якщо їхня кількість становить <20%, діагностують МДС.

- ГМЛ Мо (гостра мієлобластна лейкемія з недиференційованими бластними клітинами).

У крові чи КМ виявляють лейкемічні клітини представлені бластами великих розмірів із круглим великим ядром, хроматин ніжний з кількома ядерцями. Базофільна цитоплазма, без зернистості. Реакції з усіма цитохімічними маркерами — негативні. Кількість бластів з позитивною МРО <3 % (негативна реакція). Діагноз підтверджується внаслідок виявлення на мембранах бластів мієлоїдних антигенів (HLA-DR, а також одного або кількох ранніх маркерів мієлоїдних клітин CD34/CD33/CD13).

- ГМЛ М1 (гостра мієлобластна лейкемія без ознак дозрівання бластів).

При даній формі ГМЛ кількість бластів, що має виявляється у мієлограмі становить не менше ніж 90% і лише $\leq 10\%$ мають здатність дозрівати до промієлоцита. Бластні клітини середнього розміру, із невеликим ядром, хроматин ніжний з кількома ядерцями. Реакція на МРО позитивна у $>3\%$ бластів. Реакція на ліпіди — позитивна, у частині клітин визначається низька активність неспецифічної естерази (HE), а також слабкопозитивна реакція на хлорацетатестеразу (ХАЕ). З допомогою фенотипування, відзначається $HLA-DR^+CD34^+CD33^+CD13^{+/-}CD11b^{+/-}CD45^+$.

- ГМЛ М2 (гостра мієлобластна лейкемія з ознаками дозрівання бластів).

У КМ наявність $>30\%$ бластів, а також $>10\%$ клітин, що дозрівають до промієлоцитів. Бласти середнього розміру, з невеликим круглим ядром, у цитоплазмі наявна азурофільна зернистість і палички Ауера. Активність на МРО висока, коричневі гранули що підтверджують дану реакцію, заповнюють від третини до майже половини цитоплазми (з переходом на ядро). Реакція на ліпіди та ХАЕ — позитивна, на HE — слабкопозитивна. У бластах не відзначається наявність антигену CD34, а результати тестування на HLA-DR і CD11b варіабельні. Експресія мієлоїдних антигенів CD33, CD13, CD15 залишається стабільною.

- ГМЛ М3 (гостра промієлоцитарна лейкемія).

Пухлинний інфільтрат у типових випадках представлений аномальними промієлоцитами. Ядро у клітинах має різну форму і розміри, з нечіткими межами і складчастою структурою. У цитоплазмі містяться груба азурофільна зернистість та палички Ауера. Виявляється позитивна реакція на МРО, кислу фосфатазу (КФ), ліпіди та глікоген, активність ХАЕ підвищена. Імунофенотип бластних клітин: $CD33^+CD13^+CD11b^{+/-}CD15^{+/-}CD45^+$.

➤ ГМЛ М4 (гостра мієломоноцитарна лейкемія).

При цьому типі лейкемії характерним є проліферація двох ростків кровотворення — похідних гранулоцитарного та моноцитарного. Еритроїдні клітини становлять $< 50\%$ у перерахунку на всі мієлокаріоцити. Кількість бластних клітин у КМ повинна складати $> 30\%$ клітин нееритроїдного ряду, сума кількості бластів і дозріваючих гранулоцитів $> 40\%$, але $< 80\%$. Моноцитарний росток має становити $< 20\%$ усіх нееритроїдних ядерних мієлокаріоцитів. Реакція на МРО, ліпіди — позитивна, глікоген виявляється лише у частини хворих дифузною реакцією.

➤ ГМЛ М5 (гостра моноцитарна лейкемія).

Для підтвердження М5 лейкемії у КМ повинні виявити $> 80\%$ незрілих клітин моноцитарного ряду і $< 20\%$ гранулоцитарного. Залежно від превалювання клітин виділяють два субваріанти М5: М5а (монобластна) — у КМ міститься $> 80\%$ монобластів, і М5b (пронормоцитарна) — характерне збільшення відсотка пронормоцитів за наявності монобластів та моноцитів, у периферичній крові моноцити переважають. Еритроїдні клітини складають $< 50\%$ усіх клітин КМ. Ці клітини проявляють виражену позитивну реакцію на естеразну з α - нафтилацетатом, яка пригнічується натрію фторидом. Реакція на МРО — моноцитарного характеру (гранули розсіяні в цитоплазмі і над ядром рівномірно), на ліпіди на ХАЕ — негативна. Визначним є виявлення на бластних клітинах моноцитарного антигену CD14, який частіше проявляється у М5b варіанті. Імунофенотип можна охарактеризувати як: $\text{HLA-DR}^+\text{CD34}^{+/-}\text{CD33}^{+/-}\text{CD13}^{+/-}\text{CD15}^{+/-}\text{CD11b}^+\text{CD14}^{+/-}\text{CD45}^+$.

➤ ГМЛ М6 (гостра еритролейкемія).

М6 характеризується наявністю у КМ $> 50\%$ еритроїдних клітин, та значна їх частина має патологічні ознаки: мегалобластичні розміри, багатоядерність, вакуолізація цитоплазми. Частка мієлобластів і промієлоцитів має перевищувати 30 % усіх нееритроїдних клітин. Цитохімічно виявляють позитивну PAS-реакцію

в атипових еритроблестах, однак вважається що це не відіграє вирішальну роль у діагностиці, так як реакція є показником неефективного еритропоезу. В еритроблестах виявляють позитивну реакцію на HE та КФ. Патогномонічною ознакою імунофенотипу є виявлення на бластних клітинах антигену еритробластів — глікофору А. Імунофенотип представлений: $HLA-DR^{+}CD13^{+/-}CD33^{+}CD15^{+}CD11b^{+}CD14^{+}HAE-3^{+}HAE-9^{+}$.

➤ ГМЛ М7 (гостра мегакаріобластна лейкемія).

Характеризується поліморфізмом бластів: від бластів при М0 до малих круглих із помірним щільним хроматином. Обов'язковим є наявність відростків цитоплазми клітин у вигляді псевдоподій. Цитохімічна реакція на МРО і ліпіди — негативні, реакції на HE та КФ — позитивні. Діагностика М7 варіанта важка і проводиться найчастіше за допомогою імунофенотипування. Він може бути представлений: $HLA-DR^{+/-}CD34^{+/-}CD3^{+/-}CD13^{+/-}CD41^{+}CD61^{+}$ [2].

2.3. Гострий лімфобластний лейкоз

Гострий лімфобластний лейкоз у 70% випадків зустрічається у дітей, тоді як на дорослих припадає не більше 20% загальної кількості хворих. Найчастіше цей лейкоз розвивається у дошкільному віці, це пов'язано з віковими особливостями дитячого організму. У цьому віці характерним є напруження лімфопоезу, формуванням і вдосконаленням імунної системи організму — так звана фізіологічна гіперплазія лімфатичної системи. У дітей при різних патологічних станах, визначається схильність до лімфатичних реакцій, а хронічні або повторні стимуляції імунної системи, безпосередньо впливають на підвищення ризику злоякісної трансформації клітин [1].

2.4. Основні аспекти діагностики ГЛЛ

Сучасна діагностика ГЛЛ базується на встановленні факту наявності захворювання за допомогою загально-клінічного, цитоморфологічного, цитохімічного, імуноцитологічного, та молекулярно-генетичного досліджень у

периферичній крові та пункції кісткового мозку з обов'язковим прогнозуванням характеристик захворювання, для подальшого визначення стратегії лікування.

Найчастіше прояви ГЛЛ у дітей не є явними і часто злоякісний процес маскується під широкий спектр патологій дитячого віку. Часто клінічна картина ГЛЛ маскується під такі захворювання як: сеактивні або септичні артрити, системний червоний вовчак, ювенільний ідіопатичний артрит, інфекційний мононуклеоз, неврологічні патології, такі як полірадикулопатія, у разі залучення центральної нервової системи- парези лицьового нерва.

Суть патологічного процесу — є неконтрольоване розмноження клітин попередників лімфоїдного ряду (лімфобластів) у кістковому мозку. Їхня відсутність при цитоморфологічному дослідження біоматеріалу не дає підстав остаточно виключити захворювання [4].

Цитологічна класифікація (FAB) гострої лімфобластної лейкемії:

- L1-варіант ГЛЛ — наявні малі лімфоцити з високим ядерно-цитоплазматичним співвідношенням, ядро правильної форми (інколи розщеплене), має від одного до двох нечітких ядерець або без них.
- L2-варіант ГЛЛ — лімфобласти великі гетерогенні зі збільшеним об'ємом цитоплазми (вона бліда), ядро неправильної форми (інколи розщеплене), містить декілька чітких ядерець.
- L3-варіант ГЛЛ — характеризується великими лімфобластами, ядро неправильної форми (у формі овала чи кола), з однією або двома чіткими ядерцями, широкою базофільною і вакуолізованою цитоплазмою.

Імунологічна класифікація ГЛЛ:

I. В-клітинна ГЛЛ:

- про-пре-В-клітинна;

- common (CD10+);

- пре-В-клітинна;

- зріла В-клітинна.

II. Т-клітинна ГЛЛ:

- про-пре-Т-клітинна;

- пре-Т-клітинна;

- кортикальна Т-клітинна;

- зріла Т-клітинна.

III. Біфенотипова ГЛЛ (з екскрецією Т- і В-клітинних маркерів).

IV. Гібридна (абераторна) ГЛЛ (з екскрецією мієлоїдних маркерів).

V. Змішано-клітинна ГЛЛ.

VI. Ні-Т-, ні-В-ГЛЛ (із недиференційованих лімфоїдних клітин-попередників) [2,12].

Цитоморфологічна діагностика ГЛЛ включає такі зміни:

- лейкоцитоз з превалюванням клітин лімфоцитарного ряду (відносний лімфоцитоз більше 85%);

- нейтропенія;

- нормохромна анемія;

- тромбоцитопенія;

- значне підвищення ШОЕ;

- наявність у периферичній крові лімфобластних клітин;

- кількість бластних клітин у кістковому мозку більше 30% нееритроїдних клітин [4].

Цитохімічна діагностика:

- позитивна ШИК- реакція на глікоген, яка проявляється у вигляді гранул, по периферії клітини. Імовірно різке збільшення гранулярної ШИК- реакції, проявляється через метаболічний блок в обміні вуглеводів. Ця специфічна цитохімічна реакція не завжди яскраво спостерігається у всіх випадках ГЛЛ, класична гранулярна позитивна ШИК-реакція, яка спостерігається у 5-10% лейкозних клітин кісткового мозку, дає змогу достовірно диференціювати лейкоз, як лімфоїдний.

- негативна реакція на МРО;

- негативна реакція на ХАЕ;

- позитивна реакція на КФ при Т-клітинному варіанті [1,2].

2.5. Хронічний мієлолейкоз

Хронічний мієлолейкоз (ХМЛ) — злоякісне новоутворення кровотворної системи, яке формується з клітин-попередниць мієлопоеза, морфологічним складовим якої є зрілі гранулоцити так клітини, що диференціюються. Захворювання найчастіше розвивається у віці 30-50 років, а у дитячому чи підлітковому зустрічається досить рідко.

При ХМЛ розвивається клональна проліферація клітин мієлопоезу, з утворенням великої кількості гранулоцитів не тільки в КМ, але і екстрамедулярно — в печінці, селезінці та ін. [9].

2.6. Цитоморфологічна діагностика ХМЛ

Прояви ХМЛ включають в себе такі фази:

- Початкова стадія. У цій стадії відсутні чіткі і характерні симптоми лейкозу, тому розпізнається не завжди своєчасно. Хворі відзначають незначну

слабкість, часті “простудні” захворювання, зниження працездатності, може турбувати біль у лівому підребер’ї (особливо під час фізичного навантаження), незначна пітливість (особливо вночі). Об’єктивно загальний стан хворого оцінюють як задовільний, шкіра та видимі слизові оболонки звичного відтінку. При ультразвуковому дослідженні можуть виявляти незначну гепатоспленомегалію. У загальному аналізі крові (ЗАК) спостерігається підвищення лейкоцитів до 15-20 Г/л, зсув лейкоцитарної формули вліво до промієлоцитів, мієлоцитів, кількість базofilів 3-4%, збільшується також кількість еозинофілів (базофільно-еозинофільна асоціація), кількість еритроцитів і гемоглобіну нормальна або дещо знижена.

- Хронічна стабільна фаза. У хворих відзначається загальна слабкість, пітливість, зниження працездатності, біль в кістках, та лівому підребер’ї, у багатьох спостерігається зниження маси тіла. Дані скарги можуть турбувати хворих протягом місяців і навіть років. Найхарактернішим є збільшення селезінки, яке спостерігається у 90-95% хворих. Селезінка набуває дуже великих розмірів, займаючи 1/3 і навіть 1/2 лівої половини живота, а подекуди вона займає майже всю половину живота. Збільшення печінки відзначають у 56-60% хворих, її розміри збільшуються на 4-5 см, іноді більше.

- Прогресуюча фаза (акселерації). У хворих спостерігається прогресуюча спленомегалія, збільшення кількості лейкоцитів (незважаючи на терапію), посилення фіброзу у КМ, анемія та тромбоцитопенія (<100 Г/л), персистуюча лихоманка, кількість базofilів становить $\geq 20\%$, у периферичній крові бласти і промієлоцити $\geq 30\%$.

- Фаза бластного кризу (бластна фаза). Кількість бластів у периферичній крові становить $\geq 20\%$, у КМ $\geq 30\%$, екстрamedулярні інфільтрати з бластних клітин.

Під час діагностики проводять цитохімічні дослідження, для диференціальної діагностики бластних клітин, яка в 75% є мієлоїдного типу і в

25% лімфоїдного, а також для визначення активності лужної фосфатази (ЛФ) нейтрофілів (показник різко знижений).

Патогномонічною цитогенетичною характеристикою ХМЛ є наявність філадельфійської хромосоми, яка більш ніж у 80% хворих наявна (Rh-позитивна хромосома). Дана хромосома була знайдена у 1960 році у хворих ХМЛ в м. Філадельфія. Це 22 хромосома, у якій пройшла делеція (зменшення) довгого плеча. Також було виявлено, що філадельфійська хромосома є результатом взаємної транслокації спадкових матеріалів між 9 і 22 хромосомами. 9 хромосома містить протоонкоген *abl*, а 22 хромосома має протоонкоген *C-sis*. І в наслідок транслокації *t* (9,22) формується химерний ген *bcr-all* [2,9,12].

2.7. Хронічний лімфолейкоз

ХЛЛ класифікується як лімфопроліферативне захворювання, що характеризується невинним проліферацією зрілих В-лімфоцитів, що демонструють особливий імунотип у периферичній крові, кістковому мозку, лімфатичних вузлах та селезінці. Клінічний перебіг ХЛЛ дуже гетерогенний: більшість пацієнтів мають млявий клінічний перебіг без потреби в лікуванні або з відкладеним лікуванням та з тривалим виживанням, тоді як інші страждають на агресивне захворювання, що потребує раннього лікування з подальшими частими рецидивами.

ХЛЛ найчастіше розвивається у старшому віці — 50-60 років, не визначається у дитячому чи юнацькому віці. Статистика показує, що чоловіки хворіють у 2 рази частіше, ніж жінки [2,8].

2.8. Лабораторні дані при ХЛЛ

Клінічні стадії ХЛЛ

1. Початкова стадія. Дата стадія часто протікає безсимптомно, через відсутність специфічних проявів захворювання і може тривати від 2 до 8 і більше років. Хворі

часто відзначають: загальну слабкість, стомлюваність, пітливість, можливе збільшення одного або кількох лімфатичних вузлів, вони безболісні, еластичні, рухомі, не спаяні між собою. Збільшення печінки та селезінки не проявляється. У периферичній крові: помірний лейкоцитоз (10-30 Г/л), з превалюванням лімфоцитів (40-50%), при цьому абсолютний лімфоцитоз має складати не менше $5 \times 10^9/\text{л}$. У крові виявляються клітини лейколізу, друга назва — тіні Боткіна-Гумпрехта. У КМ — лімфоїдний ряд займає не менше 30-40% клітин, відзначається звуження еритроїдного і мегакаріоцитарного паростків.

2. Розгорнута стадія ХЛЛ. У цьому етапі продовжується лімфоїдна проліферація і симптоми і скарги хворих стають явними і характерними для ХЛЛ. Хворі відзначають схуднення, генералізовану лімфаденопатію, гепатоспленомегалію, підвищення схильність до інфекційних захворювань. У гемограмі: наростання лейкоцитозу (число може варіюватись від 50 Г/л до 800-900 Г/л), інколи спостерігається лейкопенічний варіант. Частка лімфоцитів складає 60-90% клітин периферичної крові, з'являються молоді форми лімфоцитарного паростка кровотворення — лімфобласти, пролімфоцити, часто наявні анемія, тромбоцитопенія та клітини лейколізу.

Також ХЛЛ може розвиватись за кількома типами:

- при доброякісній формі — кількість лейкоцитів збільшується поступово із довгостроковим збереження нормального кровотворення;
- при пухлинній формі — лейкоцитоз не високий, але проявляється генералізована лімфаденопатія, зі збільшенням однієї групи лімфовузлів;
- при кістковомозковій формі — немає вираженого гіперпластичного синдрому, але ознаки анемії, тромбоцитопенії з'являються швидше, як і лімфоїдна проліферація в КМ;

- при волосистоклітинному ХЛЛ цитоплазма лімфоцитів має волосисті вирости, при цьому немає вираженої лімфаденопатії, частіше спленомегалія, лейкопенічна форма.

3. Термінальна стадія. У хворих виражена інтоксикація, кахексія, приєднання вторинних інфекцій, розвивається важко панцитопенія: анемія, тромбоцитопенія, лейкопенія. Можливий бластний криз, при якому кількість лімфобластів у КМ складає 20-30 %. Смерть настає не від причин первинного захворювання, а внаслідок приєднання інших важких захворювань (лімфосаркоми, бронхогенного раку, раку шкіри).

Специфічні діагностичні критерії ХЛЛ. Патогномонічним є виявлення у мазку крові тіней Боткіна-Гумпрехта. Це напівзруйновані ядра лімфоцитів, які формуються під час виготовлення мазка крові. Вони виглядають як безструктурні, розсипчасті майже зруйновані клітини, а виникають через збільшену крихкість аномальних лімфоцитів, які легко піддаються руйнуванню.

При проведенні імунофенотипування на лімфоїдних клітинах експресують В-клітинні антигени CD19, CD20 (слабка), CD22 (слабка), CD79a, CD23, CD43, CD5, також виявляють слабку експресію поверхневих імуноглобулінів — IgM або IgM і IgG.

Генотипуванням виявляється у 1/3 випадків додаткова 12 хромосома (трисомія 12), яка пов'язана з важким і агресивнішим перебігом [9,12].

Висновок до другого розділу

Надзвичайно важливим інструментом для клініциста є сучасна систематизація лейкозів за етіологічним факторами, морфологічними особливостями та стадіями розвитку. Використання цих класифікацій дає змогу точно визначити лінійну належність бластних клітин та визначити відповідних напрям лікування.

Кожна стадія розвитку лейкозів має свої специфічні прояви, які вимагають систематичного лабораторного моніторингу, задля попередження рецидивів або оцінки ремісії. Використання маркерних реакцій (на МРО, ліпіди, глікоген) та визначення імунофенотипу (CD-антигенів) у поєднання з морфологічними спостереженнями дає точну верифікацію варіанту лейкозу.

РОЗДІЛ 3

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Об'єкт та матеріали дослідження

Під час практичної частини роботи, визначався вплив часу фарбування двома найпоширенішими барвниками (Азур-еозин за Романовським та «Лейкодіф 200») на якість виготовленого мазка, а також точність і легкість подальшої диференціації клітин.

Об'єктом дослідження у практичній частині роботи є проведення морфологічної диференціації клітин периферичної крові у пацієнта П. 69 років, який надійшов у гематологічне відділення лікарні. У подальшому хворому було встановлено діагноз – ХЛЛ. Диференціація ґрунтується на візуальному оцінюванні клітин у мазку крові. Оцінка зміни клітин залежить від технічних параметрів підготовки мікропрепаратів.

ЗАК крові пацієнта П. включав в себе дані, які вказані в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Найменування	Результат	Одиниця виміру	Нормативні значення
Еритроцити (RBC)	4,81	Т/л	4,06 - 5,58
Гемоглобін (HGB)	128	г/л	129 - 159
Кольоровий показник	0,79		0,85 - 1,15
Середній об'єм еритроцитів (MCV)	82,2	фл	76 - 102
Гематокрит (HCT)	39,5	%	33,7 - 53,7

Середній вміст гемоглобіну в еритроцитах (MCH)	26,5	пг	27,0 - 35,0
Середня концентрація гемоглобіну в еритроцитах (MCHC)	324	г/л	300 - 380
Розподіл еритроцитів (RDW)	16,0	%	11,0 - 16,0
Тромбоцити (PLT)	133	Г/л	150 - 450
Розподіл тромбоцитів по об'ємах (PDW)	16,5	%	15 - 25
Лейкоцити (WBC)	210,10	Г/л	3,7 - 10,10
Лімфоцити	92	%	18,0 - 48,3
Лімфоцити (абс.)	193,2	Г/л	1,09 - 2,99
Моноцити	4,5	%	4,40 - 12,70
Моноцити (абс.)	9,45	Г/л	0,24 - 0,79
Нейтрофіли	3,2	%	39,3 - 73,7
Нейтрофіли (абс.)	6,72	Г/л	1,63 - 6,96
Еозинофіли	0,1	%	0,60 - 7,30
Еозинофіли (абс.)	0,21	Г/л	0,030 - 0,440
Базофіли	0,2	%	0,0 - 3,0
Базофіли (абс.)	0,42	Г/л	0,000 - 0,080

Вимірювання проводилось на автоматичному гематологічному аналізаторі Mindray BC-760.

3.2. Методика виготовлення мазка периферичної крові

Мазки крові використовують для цитоморфологічного дослідження особливостей клітин крові та підрахунку лейкоцитарної формули.

Для виготовлення мазків використовують периферичну кров, забір якої здійснюють з вени або пальця. Якщо для дослідження використовується венозна кров, її переносять у пробірку з антикоагулянтом ЕДТА, якщо ж це капілярна кров (з подушечки пальця, мочки вуха, або п'ятки), мазок роблять одразу після проколу, доторкаючи предметне скло до місця проколу.

До виготовлення мазків крові існує низка вимог, вони включають:

- використання всієї краплі крові для виготовлення мазка;
- на предметному склі мазок повинен займати близько 3/4 поверхні та закінчуватись «щіточкою»;
- рівний і чіткий мазок, напівпрозорий із жовтуватим відтінком;
- товстий мазок є непридатним для використання, через щільне розміщення формених елементів і їхню деформацію. У такому мазку точний підрахунок лейкоцитарної формули є ускладненим;

Техніка виготовлення мазків з капілярної крові:

- робимо прокол шкіри пальця, першу краплю крові витираємо сухим стерильним ватним тампоном;

- до купола наступної краплі підносять предметне скло, так щоб крапля розмістилась на відстані 1,5-2 см від краю;

- шліфувальне скельце розміщуємо на предметному склі крові під кутом 45° і рухаємо його назад до краплі крові, щоб вона рівномірно розмістилась по його ребру;

- проводимо шліфувальним скельцем справа наліво рівномірним не надто швидким рухом, при цьому не піднімаємо його від предметного скла, як показано на Рис. 3.1.[7].

Техніка виготовлення мазків з венозної крові:

- ретельно перемішуємо досліджувальну пробірку з антикоагулянтном, щоб клітини рівномірно розподілились у плазмі;
- використовуємо піпетку, або скляну паличку за допомогою ставимо невелику краплю крові на предметне скло;
- подальші дії такі ж як при виготовленні мазка з капілярної крові;

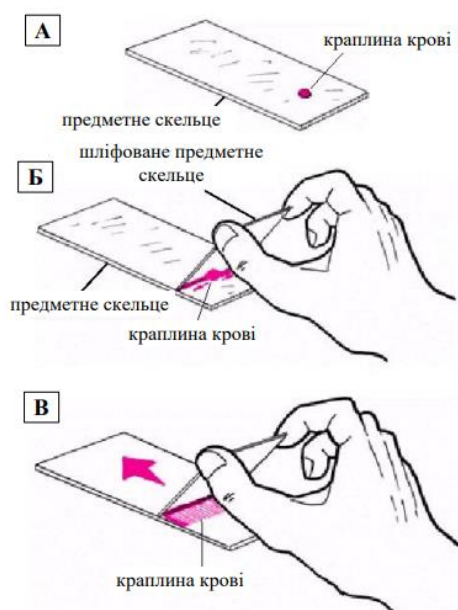


Рис. 3.1. Техніка виготовлення мазка периферичної крові на предметному скельці з використання шліфувального предметного скельця.

Фіксація мазків

Після виготовлення мазка, йому дають час висохнути на повітрі. На вільному краї предметного скла пишуть прізвище пацієнта або реєстраційний номер. Наступним етапом є фіксація мазка крові, для цього використовують різноманітні розчини з урахуванням їхнього оптимального часу використання:

- метиловим спиртом фіксують протягом 3-5 хв;
- сумішшю Нікіфорова 10-15 хв;
- етиловим спиртом 96% 20-25 хв;
- хлороформом кілька секунд;
- формаліном 1 хв;
- фіксатором-барвником Мая-Грюнвальда 1-3 хв.

Фіксацію проводять для закріплення клітин крові на склі та перешкоджанню змиванню мазка. Після закінчення часу фіксації, розчин зливають, мазок змивають і лише після цього приступають до фарбування спеціалізованим реактивом [10].

3.3. Методика фарбування мазків крові фарбою Азур-еозин за Романовським-1000

Інструкція до барвника азур-еозин за Романовським “Азур-еозин за Романовським-1000”.

Призначення: забарвлювач “Азур-еозин за Романовським-100” використовується для гематологічних досліджень формених елементів крові, а саме їх фарбування.

Принцип методу: забарвлювач азур-еозин за Романовським використовується для забарвлення попередньо фіксованих розчином Май-Грюнвальда мазків, які виготовляють для призначення лейкоцитарної формули.

Склад набору

1. Азур-еозин за Романовським — 1 флакон з (1000 ± 10) мл.
2. Концентрований буферний розчин — 1 флакон з (100 ± 2) мл.

3. Додаткові реагенти: знежирювач для скелець, фіксатор “Еозин за Май-Грюнвальдом” — до складу набору не входять.

Приготування та зберігання робочих реагентів:

1. Буферний розчин з рН — $6,9 \pm 0,1$. Перед використанням концентрований буферний розчин розводять у 200 разів, для цього відбирають 5 мл буферного розчину у мірний посуд і доводять дистильованою водою до мітки 1000 та ретельно перемішують. Також можна розводити 10 мл до 2000 мл дистилату. Розведений буфер зберігають у темному місці, герметично закритим, при температурі 2-8 °C упродовж 6 місяців.

2. Азур-еозин за Романовським. Для виготовлення робочого розчину азур-еозин за Романовським, забарвлювач розбавляють попередньо розведеним буферним розчином у співвідношенні 1:9 (до 1 мл фарби додають 9 мл розведеного буферного розчину) або 1:19 (до 1 мл додають 19 мл розведеного буферу і ретельно перемішують). Стабільність розчину при кімнатній роботі — до 6 годин, готують його безпосередньо перед забарвленням мазків.

Проведення визначення:

1. Виготовляють мазок досліджувальної крові на добре знежиреному склі.
2. Мазок висушують на повітрі при кімнатній температурі до повного висихання (зникнення вологого блиску). При повільному висиханні морфологія клітин може змінитись.
3. Препарат кладуть на місток для фіксації мазками вгору. На предметне скло обережно наносять 0,5 мл нерозведеного фіксатору “Еозин за Май-Грюнвальдом”. Час фіксації триває 1-3 хв.
4. Фіксатор зливають, змивають його залишки зі скельця розведеним буферним розчином і висушують у повітрі.

5. Наступним на мазок наносять 0,5 мл розведеного (1:9 - 1:19) розчину Азур-еозин за Романовським". Час забарвлення 6 — 15 хв. Точний час встановлюють самостійно, експериментальним шляхом.

6. Забарвлювач зливають, змивають його залишки зі скельця розведеним буферним розчином і висушують на повітрі при кімнатній температурі.

7. Проводять мікроскопію з імерсійною олією.

Результати забарвлення.

За чіткого виконання всіх вказівок забарвлення формених елементів повинно бути таким:

- еритроцити фарбуються у рожевий, рожевий з сірим або бежевим відтінком, бежево-коричневий;
- тромбоцити — рожево-фіолетовий, фіолетовий або бузковий;
- ядра лімфоцитів, моноцитів і нейтрофілів — фіолетовий;
- цитоплазма лімфоцитів — блакитний, сіро-блакитний або синьо-блакитний;
- цитоплазма моноцитів — сіро-блакитна;
- цитоплазма нейтрофілів — блідо-рожева або рожево-сіра;
- зернистість нейтрофілів — фіолетова або червоно-фіолетова;
- зернистість еозинофілів — червона, помаранчево-червона, рожево-червона або рожево-фіолетова;
- зернистість базофілів — насичено фіолетова [6].

3.4. Методика фарбування мазків крові фарбою Leucodif 200

Все частіше для фарбування мазків периферичної крові та препаратів КМ використовують набір фарбників «Лейкодіф 200». Ціль його використання така ж

як у класичних методів фарбування (Романовського-Гімзи) оцінити морфологію клітин кровотворення, диференціювати їх та виявляти можливі зміни у структурі. Набір «Лейкодіф 200» вважається дещо незвичним, адже методика фарбування характеризується у послідовному зануренні мазків у декілька готових розчинів, а не в нанесені барвника безпосередньо на скло.

Інструкція до забарвлювача «Лейкодіф 200».

Склад реагентів:

- R1 – фіксує розчин (склад: метанол 24 моль/л, нафталіновий зелений 1 мг/л).
- R2 – забарвлюючий розчин 1 (склад: еозин У 1,73 ммоль/л, фосфатний буфер, рН 6,8, 60 ммоль/л).
- R3 – забарвлюючий розчин 2 (склад: азур II 12 г/л, фосфатний буфер, рН 6,8, 60 ммоль/л).
- R4 – таблетки для приготування промивного розчину (склад: фосфатний буфер, рН 7,2, 2,5 ммоль/табл).

Приготування промивного розчину R4: 1 таблетку розчинити в 250 мл дистильованої води.

Процедура фарбування:

1. Виготовлені мазки на знежирених скельцях залишають на повітрі до повного висихання.
2. Готові реагенти з набору розливають у зручні ємності.
3. Фіксують мазок занурюючи скельце 5 разів на 1 секунду у розчин R1. Після кожного занурення залишкам розчину дають стекти, надлишок рідини видаляють проведенням по краям ємності.

4. Зафіксований мазок занурюють 3 рази на 1 секунду у розчин R2. Після кожного занурення залишкам розчину дають стекти, надлишок рідини видаляють проведенням по краям ємності.
5. Мазок занурюють 6 разів на 1 секунду в розчин R3. Після кожного занурення залишкам розчину дають стекти, надлишок рідини видаляють проведенням по краям ємності.
6. Після цього предметне скло занурюють у, виготовлений заздалегідь, промивний розчин і залишають на повітрі до повного висихання.

Кількістю занурень регулюють інтенсивність забарвлення у розчині. Мінімальна кількість занурень – три.

- інтенсивність еозинофільного забарвлення може бути скоригована шляхом зміни кількості занурень у розчин R2.
- інтенсивність базофільного забарвлення може бути скоригована шляхом зміни кількості занурень у розчин R3.

Готові розчини є стабільними, але їх слід захищати від дії прямого сонячного світла. У разі зміни стандартного забарвлення розчину, слід його замінити. Найчастіше повну заміну розчинів проводять 1 раз на тиждень.

Якщо під час мікроскопії мазка була виявлена патологічна картина лейкоцитів, мазок необхідно пофарбувати за допомогою розчинів Май-Грюнвальд і Азур-еозином за Романовським і повторно провести мікроскопію. Використання набору «Лейкодіф 200» дає менш інтенсивне забарвлення грануляції базофілів, також цей метод не рекомендоване для візуального дослідження тромбоцитів [13].

3.5. Експериментальна методологія

В експериментальній частині роботи я проводила морфологічне дослідження мазків периферичної крові з використанням двох найпоширеніших методів фарбування: азур-еозином за Романовським та набором фарбників «Лейкодіф 200». Метою мого дослідження було виявлення оптимальних умов фарбування, а саме часу впливу фарбників на мазок, що забезпечують найкращу диференціацію клітин крові при морфологічній оцінці фахівцями лабораторної діагностики.

Для проведення дослідження була використана свіжа кров одного і того ж пацієнта з діагнозом ХЛЛ.

Фарбування Азур- еозин за Романовським.

Фарбування чотирьох мазків крові за Романовським проводила з попередньою фіксацією метанольним барвником Май–Грюнвальда. Час фіксації становив 2 хвилини, що відповідає середньому значенню рекомендованого інструкцією інтервалу (1–3 хв).

Перед фарбуванням готувала робочий розчин фарби Романовського у співвідношенні 1:9 (1 мл концентрованої фарби і 9 мл розведеного буферного розчину). З метою експериментального підбору оптимального часу фарбування та оцінки його впливу на якість морфологічної диференціації клітин, усі мазки фарбувались при сталих умовах, змінюючи лише тривалість експозиції. Було підготовлено чотири мазки, які фарбували протягом:

- 6 хвилин (нижня межа, рекомендована інструкцією);
- 10 хвилин (середнє значення);
- 15 хвилин (верхня межа);
- 20 хвилин (перевищення рекомендованого часу).

Такий підхід дозволив визначити вплив тривалості фарбування на інтенсивність забарвлення та якість диференціації клітин крові.

Фарбування набором розчинів «Лейкодиф 200».

Фарбування мазків крові за допомогою набору фарбників «Лейкодиф 200» проводила методом послідовного занурення предметних скелець у ємності з розчинами відповідно до інструкції виробника. Фіксацію мазків здійснювала шляхом п'ятиразового занурення предметного скла на 1 секунду у розчин R1, з видаленням надлишку рідини після кожного занурення.

З метою експериментального визначення оптимальної інтенсивності забарвлення та ступеня диференціації клітин, кількість занурень у розчини R2 та R3 змінювались. Було досліджено чотири варіанти фарбування:

- мазок №1 — 1 занурення у R2 та 2 занурення у R3 (недофарбування);
- мазок №2 — 3 занурення у R2 та 6 занурень у R3 (умовна норма згідно з інструкцією);
- мазок №3 — 5 занурень у R2 та 10 занурень у R3 (перефарбування);
- мазок №4 — 7 занурень у R2 та 14 занурень у R3 (виражене перефарбування).

Після фарбування всі мазки промивали у завчасно приготовленому промивному розчині та висушували на повітрі до повного висихання.

Мета дослідження:

Проведення експериментального фарбування з варіацією часу експозиції та кількості занурень у барвникові розчини було направлене на визначення оптимальних умов фарбування для кожного методу, що забезпечують чітку

морфологічну візуалізацію та правильну диференціацію клітин крові, зокрема лімфоїдних клітин, характерних для хронічного лімфолейкозу.

Для об'єктивної оцінки впливу часу фарбування гематологічного мазка на якість виготовленого препарату, було розроблено шкалу оцінювання чітких показників. Вони включали в себе:

1. інтенсивність забарвлення (оцінка цілого поля зору);
2. чіткість клітинного контуру;
3. оцінка забарвлення ядра;
4. оцінка забарвлення цитоплазми;
5. оцінка забарвлення специфічної зернистості в клітинах;
6. забарвлення і стан еритроцитів;
7. забарвлення і стан тромбоцитів;
8. артефакти фарбування, наявність осаду.

Кожне зображення мікроскопії гематологічного мазка з різною експозицією, аналізувалося на восьма, вище згаданими критеріями, і оцінювалось за 5-бальною шкалою, де 5 балів — це еталонна якість, а 1 бал — повна неможливість ідентифікації морфологічних структур. Зазначаю, що найвищий бал (5 балів) за напівкількісною шкалою встановлювались у разі відповідності до результатів забарвлення, які зазначенні в інструкції до барвника азур-еозин за Романовським.

Опис стану мазка та забарвлення клітин із встановленою оцінкою 5 балів повинен відповідати таким вимогам:

1. інтенсивність забарвлення (оцінка цілого поля зору) — контрастність оптимальна, клітини чітко диференціюються на світлому фоні;

2. чіткість клітинного контур — клітинні контури рівні, чітко відмежовуються від фону. Лімфоцити — мають чітке кільце навколо ядра, у гранулоцитів — виражена межа, не зливається з еритроцитами;
3. оцінка забарвлення ядра — ядро має насичений фіолетовий колір, видно, видно структуру хроматину — світлі та темні ділянки;
4. оцінка забарвлення цитоплазми — цитоплазма лімфоцитів — блакитна, сіро-блакитна або синьо-блакитна, цитоплазма моноцитів — сіро-блакитна цитоплазма нейтрофілів — блідо-рожева або рожево-сіра;
5. оцінка забарвлення специфічної зернистості в клітинах — зернистість нейтрофілів — фіолетова або червоно-фіолетова, зернистість еозинофілів — червона, помаранчево-червона, рожево-червона або рожево-фіолетова("ікринки"), зернистість базофілів — насичено фіолетова;
6. забарвлення і стан еритроцитів — фарбуються у рожевий, рожевий з сірим або бежевим відтінком, бежево-коричневий, форма дисків збережена, чітке центральне просвітлення;
7. забарвлення і стан тромбоцитів — чіткі дрібні рожево-фіолетові, фіолетові або бузкові структури з помітною внутрішньою зернистістю;
8. артефакти фарбування, наявність осаду — фон ідеально чистий, артефакти та осад фарбника відсутній.

Опис стану мазка та забарвлення клітин із встановленою оцінкою 4 бали повинен відповідати таким вимогам:

1. інтенсивність забарвлення (оцінка цілого поля зору) — інтенсивність помірна, легка блідість, або перефарбування;
2. чіткість клітинного контур — чіткість зберігається, але в окремих нейтрофілах є незначна "розмитість" цитоплазми;

3. оцінка забарвлення ядра — типовий колір ядра, малюнок хроматину проглядається вже гірше;
4. оцінка забарвлення цитоплазми — типовий колір цитоплазми, але виглядає тьмяним або ж має "запиленість";
5. оцінка забарвлення специфічної зернистості в клітинах — зернистість фарбується, але менш контрастно (колір блідіший), або надто базофільний;
6. забарвлення і стан еритроцитів — в більшості клітин колір правильний, але зустрічаються еритроцити з сіруватим відтінком, або поодинокі зміни форми;
7. забарвлення і стан тромбоцитів — тромбоцити чітко диференціюються, та колір більш світліший;
8. артефакти фарбування, наявність осаду — в полях зору поодинокі кристали барвника(одиначні вкраплення).

Опис стану мазка та забарвлення клітин із встановленою оцінкою 3 бали повинен відповідати таким вимогам:

1. інтенсивність забарвлення (оцінка цілого поля зору) — мазок виглядає занадто блідим, або монохромно-темним;
2. чіткість клітинного контур — межі не чіткі, клітини наче "розтікається" по склу;
3. оцінка забарвлення ядра — ядро має блідий колір, або надто темний (наче пікноз), структура хроматину не проглядається;
4. оцінка забарвлення цитоплазми — в клітинах нетипові відтінки — сірий, темно синій, присутність дрібних вакуолей;
5. оцінка забарвлення специфічної зернистості в клітинах — забарвлення зернистості не чітке, ускладнено диференціювати гранулоцити по ній;

6. забарвлення і стан еритроцитів — наявний сірий або виражений синій відтінок;
7. забарвлення і стан тромбоцитів — не мають чітких кордонів, важко помітити в полі зору, мають вигляд блідих плям;
8. артефакти фарбування, наявність осаду — більш виражений осад в мазку, частково заважає диференціювати клітини.

Опис стану мазка та забарвлення клітин із встановленою оцінкою 2 бали повинен відповідати таким вимогам:

1. інтенсивність забарвлення (оцінка цілого поля зору) — присутній низький або сильний контраст, клітини важко відрізнити одна від одної;
2. чіткість клітинного контур — границі лейкоцитів не чіткі, набряклі або "рвані" на вигляд;
3. оцінка забарвлення ядра — нетиповий колір (темно-синій, сірий), ядро не має чітких меж;
4. оцінка забарвлення цитоплазми — майже не забарвлена, або, навпаки, має насичений колір, що приховує ядро;
5. оцінка забарвлення специфічної зернистості в клітинах — гранули майже не зафарбовуються, диференціація по них майже неможлива;
6. забарвлення і стан еритроцитів — еритроцити злиплі або мають розмиті краї, в полі зору виглядають як гомогенна маса;
7. забарвлення і стан тромбоцитів — тромбоцити деформовані, їх важко відрізнити від залишків фарби, часто видно лише центральну частину, з розмитими краями;
8. артефакти фарбування, наявність осаду — значна кількість осаду і артефактів барвника, які спотворюються морфологію клітин.

Опис стану мазка та забарвлення клітин із встановленою оцінкою 1 бал повинен відповідати таким вимогам:

1. інтенсивність забарвлення (оцінка цілого поля зору) — мазок майже безбарвний або насичено темний, клітинні деталі не візуалізуються;
2. чіткість клітинного контур — повна втрата клітинної цілісності, межі цитоплазми не візуалізуються;
3. оцінка забарвлення ядра — ядро не зафарбоване або фрагментоване (зруйноване);
4. оцінка забарвлення цитоплазми — колір цитоплазми неможливо ідентифікувати;
5. оцінка забарвлення специфічної зернистості в клітинах — диференціація за зернистістю неможлива;
6. забарвлення і стан еритроцитів — еритроцити не мають забарвлення або наявне повне їх руйнування;
7. забарвлення і стан тромбоцитів — тромбоцити не ідентифікуються;
8. артефакти фарбування, наявність осаду — мікроскопія неможлива, через повне покриття мазка шаром фарби або "бруд".

Висновок до третього розділу

Згідно з отриманими даними, першим етапом діагностики лейкозів є цитоморфологічна ідентифікація патологічних клітин під мікроскопом, яка часто базується на випадковому виявленні патологічних клітин під час рутинного обстеження. Від дотримання всіх вказівок інструкції до фарбника та чіткості їхнього виконання, залежить подальше лабораторне обґрунтування клітин, їх змін та специфічних особливостей крові. Тому стандартизація процесу фарбування мазків крові є надзвичайно важливим етапом, що мінімізує ризик діагностичних помилок.

У даній роботі я представила варіанти фарбування мазків крові з ХЛЛ з різною експозицією барвника, і це дозволило встановити оптимальні параметри часу фарбування для максимально точної візуалізації клітин, що є вирішальним для діагностики.

РОЗДІЛ 4

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОЦІНКА ПРОВЕДЕНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

4.1. Аналіз та оцінка часу фарбування мазків периферичної крові Азур-еозином за Романовським-1000

Під час проведення експериментальної частини роботи було використано готовий концентрат фарбника Азур-еозин за Романовським (виробник ПрАТ "Реагент") та відповідний до нього буферний розчин.

При проведенні світлової мікроскопії мазка №1 (збільшення $\times 1000$), фіксованого розчином Май-Грюнвальда протягом 2 хв (середній час згідно інструкції), та фарбуванням Азур-еозином за Романовським-1000 протягом 6 хв, було отримано мікрофотографії (Рис.4.2.), що візуалізують типову морфологічну картину клітин крові пацієнта.

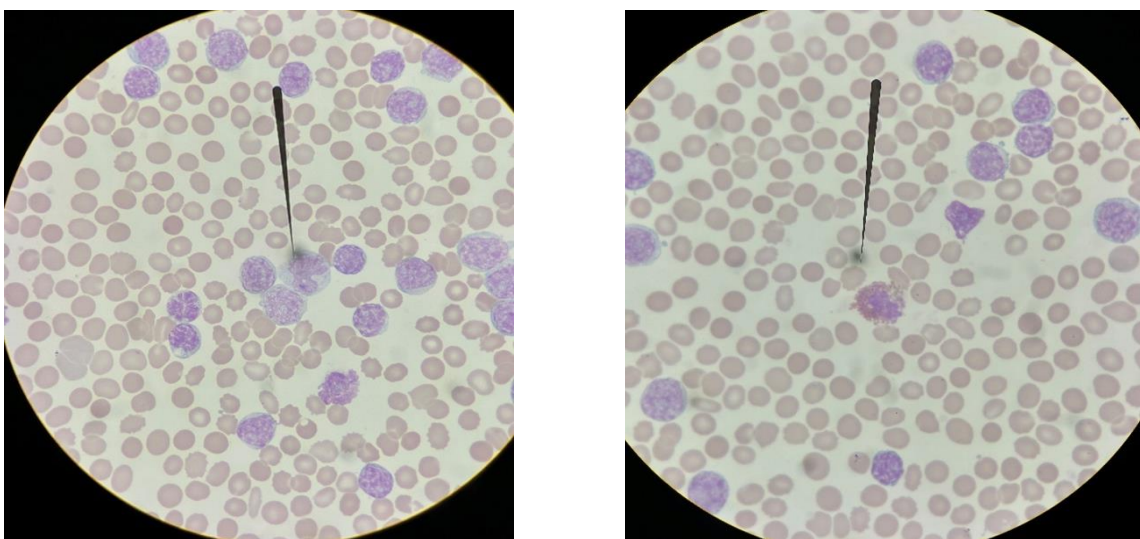


Рис.4.2. Препарат зафарбований фарбником Азур-еозином за Романовським.

Оцінка мазка: 3 бали

Інтенсивність забарвлення поля зору недостатня: мазок виглядає блідим, без чіткої колірної диференціації клітин. Контури клітин лейкоцитів розмиті, межі цитоплазми місцями розмиті, клітини виглядають «розпливчастими» по склу. Ядра лейкоцитів бліді, насиченість фіолетового відтінку недостатня, структура хроматину погано візуалізується або не може бути визначена.

Цитоплазма клітин – відсутність характерного відтінку, типового для відповідних популяцій: колір тьмянний, слабо виражений, без чіткої різниці між лімфоцитами, моноцитами та гранулоцитами. Специфічна зернистість гранулоцитів слабо зафарбована, що ускладнює диференціацію клітин за зернистістю. Еритроцити мають нетиповий блідий колір, іноді з сіруватим відтінком, а центральне просвітлення виражене нерівномірно. Тромбоцити в полі зору зустрічаються поодинокі або майже не візуалізуються, виглядаючи як невеликі бліді структури без чітких меж. Фон мазка відносно чистий, але загальна якість забарвлення не дозволяє провести повну морфологічну оцінку.

При проведенні світлової мікроскопії мазка №2 (збільшення $\times 1000$), фіксованого розчином Май-Грюнвальда протягом 2 хв (середній час згідно інструкції), та фарбуванням Азур-еозином за Романовським-1000 протягом 10 хв, було отримано мікрофотографії (Рис.4.3.), що візуалізують типову морфологічну картину клітин крові пацієнта.

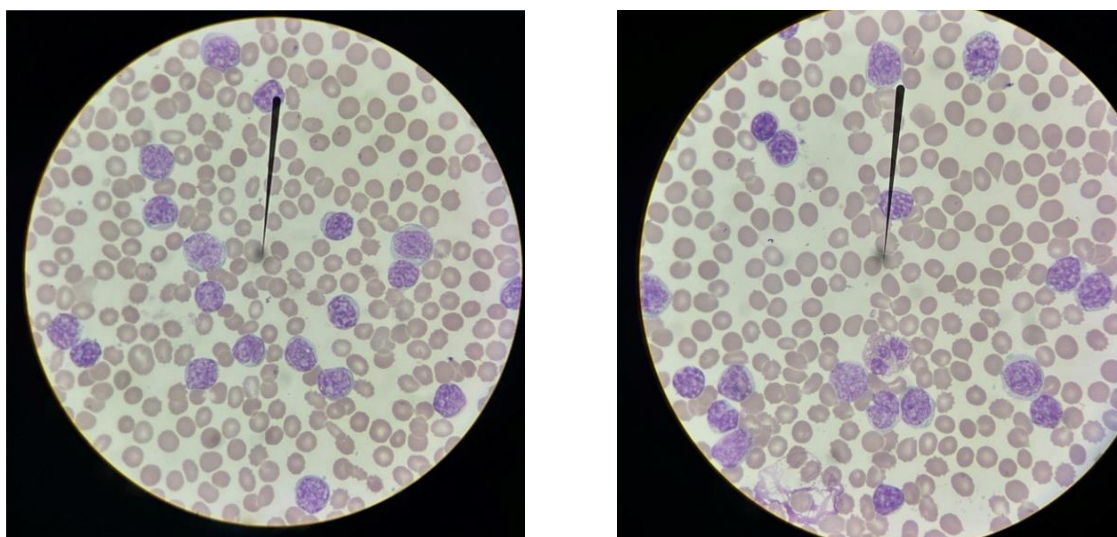


Рис.4.3. Препарат зафарбований фарбником Азур-еозином за Романовським.

Оцінка мазка: 5 балів. Інтенсивність забарвлення всього поля зору є оптимальною. Мазок має хороший контраст: клітинні елементи чітко диференціюються на світлому, чистому фоні, що забезпечує правильну морфологічну оцінку. Контури клітин лейкоцитів рівні та чіткі, добре

відмежовані від навколишніх клітин.. Цитоплазма лімфоцитів характеризуються чітко вираженим кільцем навколо ядра. Межі клітин гранулоцитів виражені, без злиття з еритроцитами. Ядра клітин мають насичений фіолетовий відтінок, з чітко вираженою петлистогою структурою хроматину. Ознак гіпер- або гіпохромії ядер не виявлено. Цитоплазма клітин забарвлена типово: • у лімфоцитах — синьою або синьо-блакитною; • у моноцитах — сіро-блакитною; • у нейтрофілах — блідо-рожевою або рожево-сірою. Забарвлення рівномірне, без просвітлень та сторонніх відтінків. Специфічна зернистість гранулоцитів добре візуалізується: • у нейтрофілах — дрібна, фіолетова або червоно-фіолетова; • в еозинофілах — велика, інтенсивно червоного або оранжево-червоного кольору; • у базофілах — насичена фіолетова, груба. Еритроцити рівномірно забарвлені в рожевий або рожево-бежевий колір, мають характерну дископодібну форму з чітко вираженим центральним просвітленням. Ознак деформації не спостерігається. Тромбоцити чітко розпізнаються як невеликі рожево-фіолетові або бузкові структури з помітною внутрішньою зернистістю. Фон мазка чистий, без артефактів фарбування або осаду барвника. Загальна якість фарбування забезпечує оптимальні умови для морфологічної диференціації клітин крові, що відповідає оцінці 5 за шкалою рейтингу.

При проведенні світлової мікроскопії мазка №3 (збільшення $\times 1000$), фіксованого розчином Май-Грюнвальда протягом 2 хв (середній час згідно інструкції), та фарбуванням Азур-еозином за Романовським-1000 протягом 15 хв, було отримано мікрофотографії (Рис.4.4.), що візуалізують типову морфологічну картину клітин крові пацієнта.

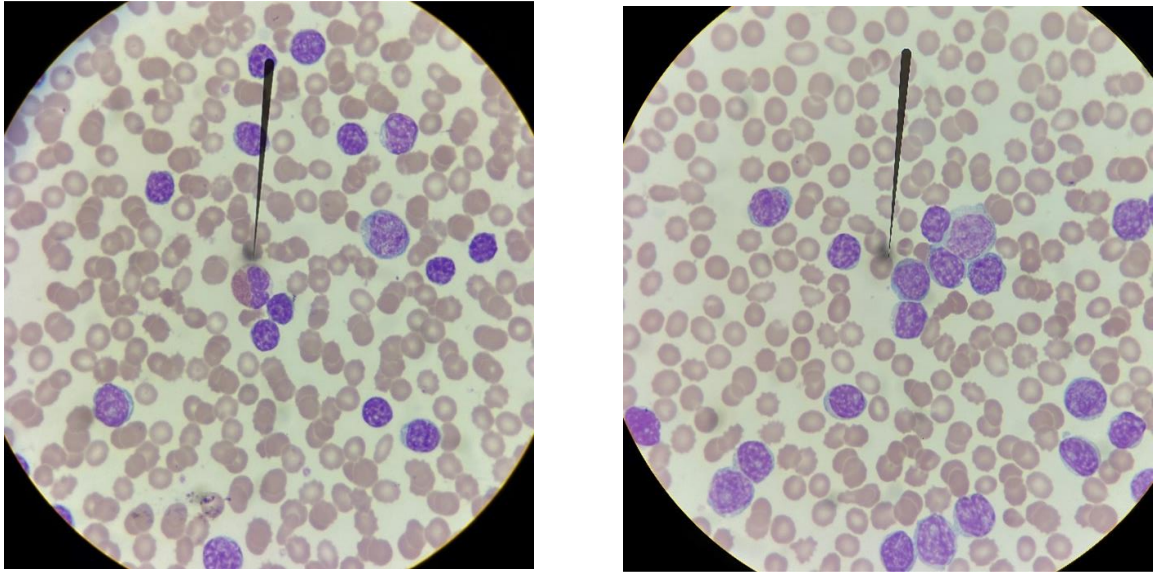


Рис.4.4. Препарат зафарбований фарбником Азур-еозином за Романовським.

Оцінка мазка: 5 балів. Інтенсивність забарвлення всього поля зору є оптимальною: контрастність правильна, всі клітинні елементи чітко диференціюються на чистому світлому тлі. Висока якість фарбування забезпечує максимальну візуалізацію морфологічних особливостей клітин. Контури клітин лейкоцитів рівні та чітко відмежовані від навколишнього середовища. Лімфоцити мають характерну перинуклеарну зону просвітлення, а гранулоцити — чіткі цитоплазматичні межі, що не зливаються з фоном еритроцитів. Ядра клітин мають насичений фіолетовий колір. Внутрішня петлиста структура хроматину візуалізується без перешкод, що полегшує визначення ступеня зрілості клітин.

Цитоплазма має відтінки, характерні для кожного типу лейкоцитів: • у лімфоцитах — прозорий синій або сіро-синій колір; • у моноцитах — характерний димчасто-сірий з синім відтінком; • у нейтрофілах — блідо-рожевий або рожево-сірий фон. Специфічна зернистість гранулоцитів зафарбовується контрастно: чітко розрізняються фіолетові гранули нейтрофілів і яскраво-червоно-помаранчеві гранули еозинофілів. Еритроцити забарвлюються рівномірно в рожевий колір з бежевим відтінком. Морфологія клітин збережена; правильна форма з центральною зоною, що свідчить про правильний баланс рН під час фарбування. Тромбоцити візуалізуються як чіткі, невеликі фіолетово-лілові структури. Їхня внутрішня зернистість і світліша периферія чітко видно. У полі

зору немає артефактів або осаду барвника. Фон препарату ідеально чистий, що дозволяє проводити точну морфо-тинкторіальну оцінку без візуальних перешкод.

При проведенні світлової мікроскопії мазка №4 (збільшення $\times 1000$), фіксованого розчином Май-Грюнвальда протягом 2 хв (середній час згідно інструкції), та фарбуванням Азур-еозином за Романовським-1000 протягом 20 хв, було отримано мікрофотографії (Рис.4.5.), що візуалізують типову морфологічну картину клітин крові пацієнта.

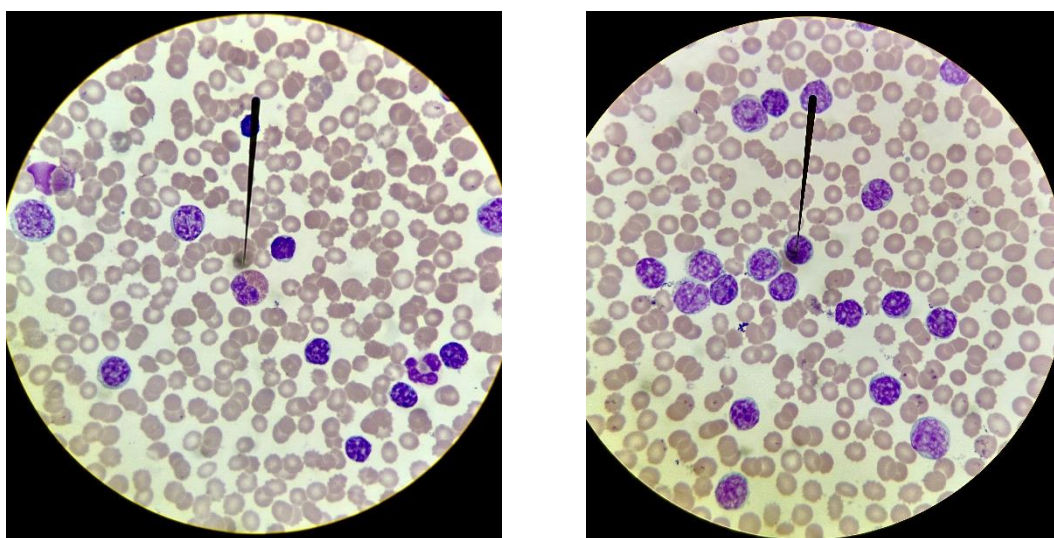


Рис.4.5. Препарат зафарбований фарбником Азур-еозином за Романовським.

Оцінка мазка: 4 бали Інтенсивність забарвлення в полі зору надмірна: мазок виглядає перефарбованим. Контраст високий, але загальний фон набуває дещо «запиленого» через тривалий контакт з барвником. Контури клітин загалом залишаються чіткими, але в деяких гранулоцитах спостерігається розмиття країв цитоплазми. Межі клітин стають менш чіткими порівняно з оптимальним часом фарбування. Ядра лейкоцитів мають дуже насичений, темно-фіолетовий колір. Через подовження часу фарбування типовий малюнок хроматину менш помітний — світлі ділянки еухроматину значно звужені, що створює ефект надмірної щільності ядра. Цитоплазма клітин виглядає тьмяною. У лімфоцитах вона набуває більш насиченого, темно-синього відтінку, а в нейтрофілах — рожево-сірого відтінку з помітною «пилочістю». Специфічна гранулярність

забарвлюється інтенсивно, але з меншим контрастом: надмірна базофілія цитоплазми поглинає колір дрібних гранул, роблячи загальний вигляд клітин темнішим. Більшість еритроцитів зберігають свій правильний колір, але в багатьох полях зору набувають вираженого сіруватого або синюватого відтінку (штучна поліхроматофілії). Форма дисків зберігається, але центральне просвітлення не так чітко візуалізується через загальну інтенсивність фону. Тромбоцити добре диференційовані, мають насичений фіолетовий або бузковий колір, але їх зернистість місцями зливається в суцільну темну структуру. Артефакти фарбування присутні у вигляді ізольованих дрібних вкраплень або точкових включень осаду барвника, що ускладнює диференціацію препарату.

4.2. Аналіз та оцінка часу фарбування мазків периферичної крові Leucodif-200

Під час проведення експериментальної частини роботи було використано готові набори фарбників «Лейкодиф 200» (виробник Erba Lachema) з відповідним таблетований реагент для приготування промивного розчину.

При проведенні світлової мікроскопії мазка №5 (збільшення×1000), фіксованого п'ятиразовим зануренням предметного скла на 1 секунду у розчин R1, та фарбуванням шляхом занурення предметного скла 1 раз у розчин R2 та 2 рази у розчин R3, було отримано мікрофотографії (Рис.4.7.), що візуалізують типову морфологічну картину клітин крові пацієнта.

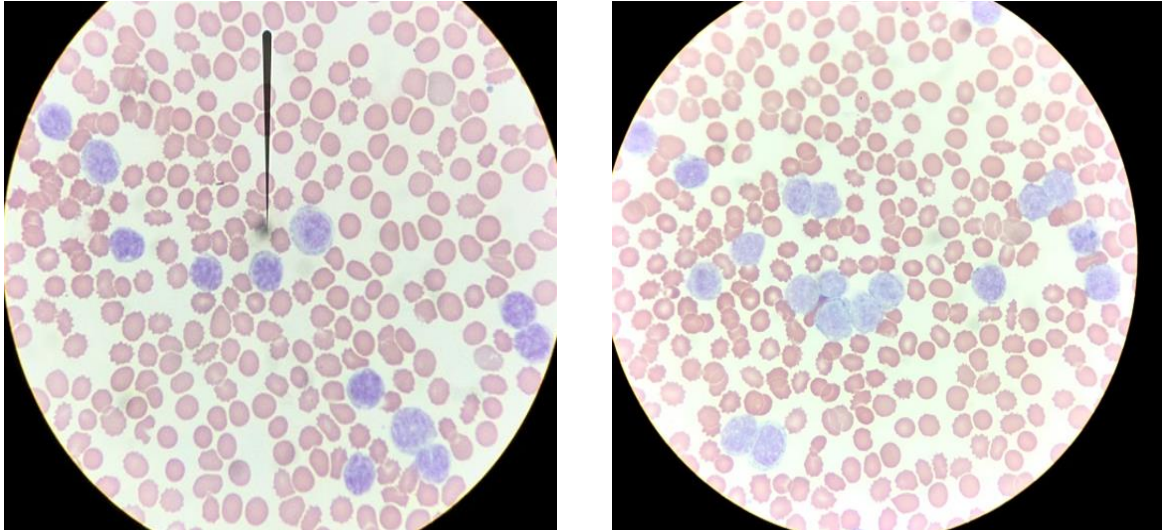


Рис.4.7. Препарат зафарбований набором барвників «Лейкодиф 200».

Оцінка мазка: 3 бали. Інтенсивність забарвлення поля зору критично низька: мазок виглядає занадто блідим і одноколірним. Відсутній необхідний контраст між клітинними елементами та фоном препарату, що значно ускладнює первинний огляд. Чіткість клітинного контуру лейкоцитів незадовільна. Межі клітин не чітко виділяються на тлі, через що лейкоцити виглядають набряклими і «розмитими», ніби «розтікаються» по поверхні предметного скла. Ядра лейкоцитів забарвлені дуже слабо, мають блідо-блакитний або ледь помітний фіолетовий відтінок. Через недостатню експозицію в робочих розчинах структура хроматину не видна, а ядро виглядає як однорідна світла пляма, що не дозволяє детально візуалізувати його архітектоніку. Цитоплазма клітин має нетипові бліді відтінки, і немає чіткої різниці між лімфоцитами та гранулоцитами. Специфічна зернистість (нейтрофільна, еозинофільна) майже не забарвлена, що практично унеможливлює точну ідентифікацію гранулоцитів за їх зернистістю. Еритроцити мають виражений сіруватий або дуже блідо-рожево-сірий відтінок. Центральне просвітлення погано візуалізується, клітини виглядають плоскими та ненасиченими. Тромбоцити майже невидимі в полі зору. Вони виглядають як слабкі бліді плями без чітких меж і характерної зернистості, що може призвести до помилкового висновку про їх відсутність (псевдотромбоцитопенія). Незважаючи на відносно чіткий фон, загальна якість

мазка є незадовільною для повної діагностики. Неповне забарвлення клітинних структур є основним дефектом, що заважає морфологічній ідентифікації.

При проведенні світлової мікроскопії мазка №6 (збільшення $\times 1000$), фіксованого п'ятиразовим зануренням предметного скла на 1 секунду у розчин R1, та фарбуванням шляхом занурення предметного скла 3 рази у розчин R2 та 6 разів у розчин R3, було отримано мікрофотографії (Рис.4.8.), що візуалізують типову морфологічну картину клітин крові пацієнта.

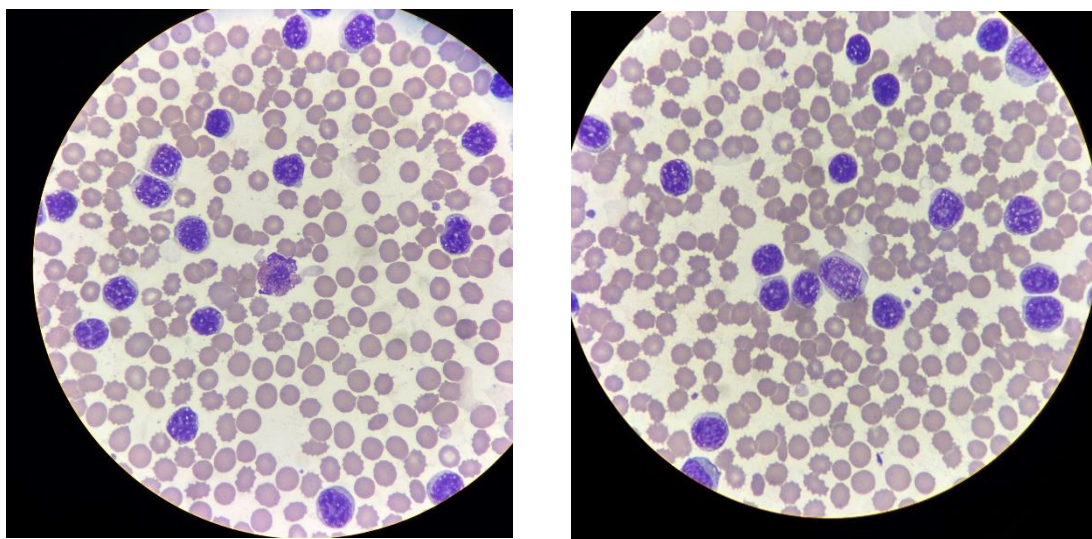


Рис.4.8. Препарат зафарбований набором барвників «Лейкодиф 200».

Оцінка мазка: 4 бали. Інтенсивність забарвлення в полі зору помірна і достатня для діагностики. Мазок демонструє хороший баланс між забарвленням клітинних елементів і фоном. У порівнянні з оптимальним 15-хвилинним забарвленням за Романовським, спостерігається невелика тьмяність загальної картини. Контури клітин лейкоцитів залишаються чіткими і добре виділяються на фоні. Межі цитоплазми нейтрофілів і лімфоцитів виражені, ознак «розпливання» клітин немає. Ядра мають типовий фіолетовий або темно-синій колір. Структура хроматину задовільно видна, що дозволяє диференціювати зрілі сегментовані ядра від молодих клітин. Цитоплазма має типове забарвлення: • у лімфоцитах — синє або світло-синє; • у моноцитах — сіро-синє; • у нейтрофілах — блідо-рожеве. Загальний фон цитоплазми виглядає дещо тьмянішим, ніж за стандартом. Специфічна зернистість: гранули в клітинах забарвлюються

рівномірно, але з меншим контрастом. Червоно-помаранчева зернистість еозинофілів і фіолетова зернистість нейтрофілів чітко візуалізуються, що забезпечує адекватну диференціацію гранулоцитів. Еритроцити мають правильний рожевий колір з бежевим відтінком. Форма клітин збережена, центральне просвітлення чітко видно в більшості клітин. Тромбоцити чітко диференціюються як невеликі фіолетово-лілові структури, рівномірно розподілені в препараті. Фон препарату чіткий. Можуть бути поодинокі мікроскопічні включення барвника, які не заважають морфологічному аналізу.

При проведенні світлової мікроскопії мазка №7 (збільшення $\times 1000$), фіксованого п'ятиразовим зануренням предметного скла на 1 секунду у розчин R1, та фарбуванням шляхом занурення предметного скла 5 разів у розчин R2 та 10 разів у розчин R3, було отримано мікрофотографії (Рис.4.9.), що візуалізують типову морфологічну картину клітин крові пацієнта.

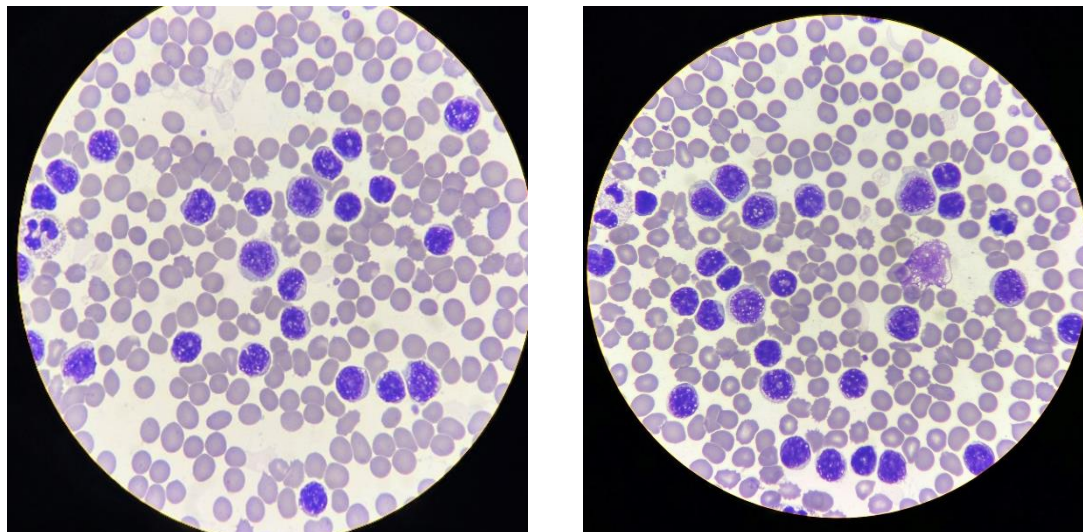


Рис.4.9. Препарат зафарбований набором барвників «Лейкодиф 200».

Оцінка мазка: 3 бали. Інтенсивність забарвлення по всьому полю зору характеризується надмірним контрастом і зміщенням колірного спектру в бік темно-синіх і фіолетових тонів. Поле зору виглядає монохромним і темним, що значно навантажує зір лікаря і заважає адекватному сприйняттю структур.

Контури клітин лейкоцитів виглядають «важкими» і місцями розмитими. Через надмірне накопичення фарбника межі цитоплазми виглядають набряклими або нечітко визначеними, порушуючи природну архітектуру клітин. Ядра мають нетиповий темно-синій або майже чорний колір. Ефект надмірної базофілії робить структуру хроматину повністю невидимою — ядро виглядає як суцільна щільна маса (псевдопікноз), що унеможливорює оцінку тонких морфологічних особливостей. Цитоплазма лімфоцитів стає темно-синьою, а нейтрофілів — брудно-сірою. Диференціація гранулоцитів за зернистістю значно ускладнена. Через перефарбування фону цитоплазми специфічні гранули втрачають чіткість або зливаються в єдину темну масу, що може призвести до неправильної ідентифікації клітин. Еритроцити мають виражений синій або темно-сірий відтінок. Типове центральне просвітлення практично зникає, а клітини втрачають свій природний рожевий колір, що є ознакою грубого порушення техніки фарбування. Тромбоцити виглядають як перефарбовані темні плями. Їх важко відрізнити від можливих невеликих артефактів барвника, а їх внутрішня структура (гранулярність) стає невидимою на однорідному тлі. У мазку спостерігається більш виражений осад барвника у вигляді невеликих темних частинок. Ці артефакти значно заважають якісній мікроскопії та диференціальній діагностиці клітин крові.

При проведенні світлової мікроскопії мазка №8 (збільшення $\times 1000$), фіксованого п'ятиразовим зануренням предметного скла на 1 секунду у розчин R1, та фарбуванням шляхом занурення предметного скла 7 разів у розчин R2 та 14 разів у розчин R3, було отримано мікрофотографії (Рис.4.10.), що візуалізують типову морфологічну картину клітин крові пацієнта.

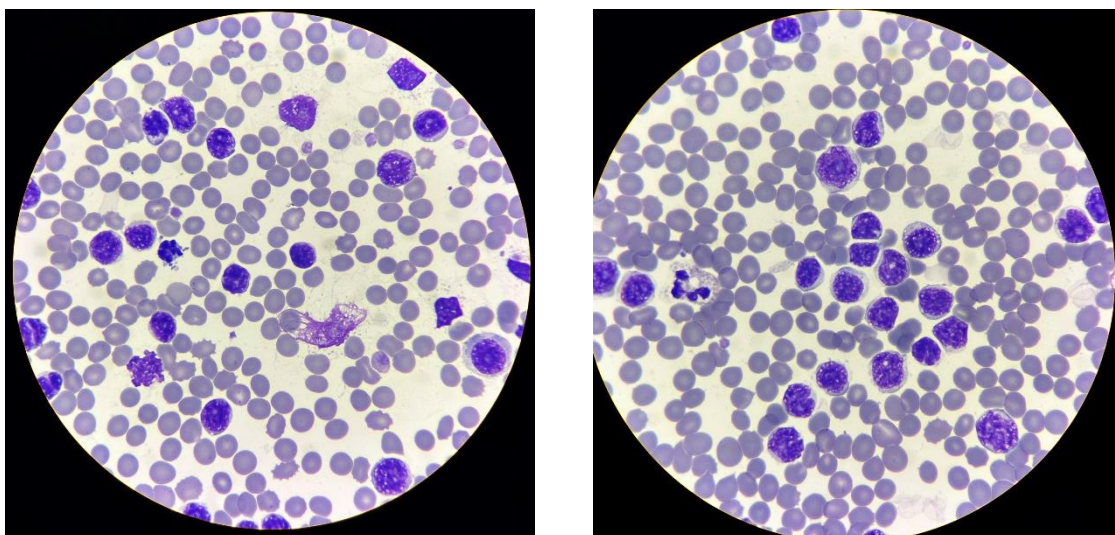


Рис.4.10. Препарат зафарбований набором барвників «Лейкодиф 200».

Оцінка мазка: 2 бали. Інтенсивність забарвлення всього поля зору надмірна. Контраст дуже високий і водночас «важкий», що ускладнює диференціацію клітин. Препарат має темно-синій, майже фіолетовий фон, що вказує на глибоку базofilію всіх структур. Контури клітин лейкоцитів виглядають розмитими, набряклими або «нерівними», що створює ілюзію руйнування клітин або механічного пошкодження. Ядра мають інтенсивний темно-синій або чорно-фіолетовий колір і не мають чітких меж. Ядра виглядають як однорідні темні плями, що унеможлиблює правильну ідентифікацію стадій дозрівання лейкоцитів. Цитоплазма має нетипово насичений темно-синій колір. Вона настільки інтенсивно забарвлена, що практично «поглинає» ядро, приховуючи його контури та деталі. Візуальна межа між ядром і цитоплазмою стає розмитою. Гранули майже не розрізнити. Через загальну базofilію препарату зернистість зливається з фоном цитоплазми. Диференціація гранулоцитів за типом зернистості стає практично неможливою, що є критичною помилкою для діагностичного мазка. Еритроцити виглядають як однорідна темно-сіра або синя маса. Вони злипаються, мають розмиті краї, а характерне центральне просвітлення повністю відсутнє. Такий вигляд унеможлиблює оцінку анізоцитозу або пойкилоцитозу. Тромбоцити виглядають як деформовані темні плями, які важко відрізнити від відкладень барвника. Наявна значна кількість

осаду та артефактів фарбування, які спотворюють загальну морфологічну картину та забруднюють поле зору. Мікроскопія такого препарату є неінформативною і може призвести до помилкових результатів.

Висновки щодо оптимізації часу фарбування за Романовським

1. Визначення оптимального часового інтервалу:

- найкращі результати спостерігаються при експозиції від 10 до 15 хвилин, що відповідає 5 балам за шкалою якості;
- у цьому діапазоні досягається ідеальна контрастність, чітка диференціація структури хроматину та специфічної зернистості всіх типів лейкоцитів;
- експозиція 15 хвилин забезпечує максимальну візуалізацію морфологічних ознак.

2. Вплив недостатньої експозиції (6 хвилин):

- нижня часова межа (6 хв) призводить до недофарбування препарату (3 бали), що проявляється блідістю та відсутністю колірної диференціації;
- недофарбування критично ускладнює оцінку структури хроматину та зернистості гранулоцитів, а також робить тромбоцити майже невидимими, що може призвести до діагностичних помилок;

3. Вплив надмірної експозиції (20 хвилин):

- перевищення рекомендованого часу (20 хв) спричиняє перефарбування (4 бали) з вираженим зміщенням спектра в синьо-фіолетові тони;
- надмірна базofilія маскує структуру ядер (ефект щільності) та зернистість цитоплазми, а також створює артефакти у вигляді «запиленості» фону та появи кристалів барвника;
- еритроцити набувають синюватого відтінку, що імітує патологічну поліхроматофілію.

Висновки щодо оптимізації алгоритму забарвлення методом «Лейкодіф 200»

1. Визначення діагностичного стандарту (умовна норма):
 - найбільш адекватна якість забарвлення спостерігається у Мазку №6, де дотримано алгоритм: 3 занурення у розчин R2 та 6 занурень у розчин R3;
 - цей режим відповідає 4 балам за шкалою якості, забезпечуючи задовільну інтенсивність забарвлення, чіткі контури лейкоцитів та типовий колір цитоплазми для всіх популяцій клітин; цей метод забезпечує стабільну ідентифікацію гранулоцитів за їх специфічною зернистістю;
2. Вплив порушення регламенту занурень:
 - недофарбування (мазок №5): зменшення кількості занурень (1 у R2 та 2 у R3) призводить до критичного зниження контрастності (3 бали); за такої умови клітини виглядають «розмитими», ядра забарвлені блідо, а специфічна зернистість майже не візуалізується, що робить мазок малоінформативним;
 - перефарбування (мазки №7 та №8): збільшення кількості занурень призводить до стрімкої деградації якості зображення; при 5/10 зануреннях (мазок №7) мазок отримує 3 бали через надмірну базofilію та втрату малюнку хроматину; при 7/14 зануреннях (мазок №8) якість падає до 2 балів: спостерігається повне спотворення морфології, еритроцити злипаються у синю гомогенну масу, а ядра лейкоцитів перетворюються на безструктурні темні плями.

Висновок до четвертого розділу

Наступним етапом дослідження стало практичне порівняння класичних методик та експрес-технологій забарвлення, що є критично важливим для оптимізації роботи сучасної лабораторії. У даній роботі було проведено експериментальну оцінку використання набору «Лейкодіф 200» у порівнянні з традиційним методом за Романовським, що дозволило встановити пряму залежність між кількістю маніпуляцій (занурень) та якістю візуалізації клітинних структур.

Шляхом апробації різних режимів експозиції було визначено оптимальний алгоритм забарвлення, за якого досягається найвищий бал якості та чітка диференціація гранулоцитів і бластних клітин. Встановлено, що стандартизація кількості занурень у фарбувальні розчини дозволяє усунути такі дефекти, як недофарбування або поява артефактів, що мінімізує ризик хибного трактування морфології. Таким чином, доведено, що впровадження валідованого експрес-методу забезпечує високу достовірність результатів при суттєвому скороченні часу дослідження, що має вирішальне значення для вчасної верифікації лейкозів.

ВИСНОВКИ

За сучасною статистикою, лейкози займають одне з найбільш поширених онкогематологічних захворювань у світі. Як і будь яке захворювання, вони потребують точної діагностики, а найперше лабораторної, так як належать до захворювань кровотворної системи. Через тенденцію до підвищення кількості хворих у світі, зростає необхідність впровадження сучасних стандартизованих підходів до морфологічної діагностики клітин, оскільки саме від правильної верифікації виду лейкозу залежить схема лікування та прогнозування одужання.

Було доведено, що при ранній діагностиці ХЛЛ, а саме через виявлення патогномонічних тіней лейколізу (Боткіна-Гумпрехта) та значної лімфоцитарної проліферації, зростають показники успішного контролю над захворюванням. Правильне визначення фахівця лабораторної діагностики дозволяє попередити розвиток термінальної стадії та важких ускладнень.

Використання найпоширеніших барвників, таких як Азур-еозин за Романовським та «Лейкодіф 200» з оптимальним часом фарбування мазків, дає змогу отримати максимально чітку картину поля зору та клітинами зокрема. Це безпосередньо впливає на точність діагностики, мінімізує випадки помилкової ідентифікації клітин та спрямовує на вибір терапевтичних схем.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Павлов С.В., Горбачова С.В., Бухтіярова Н.В. та ін. Гемобластози. Загальноклінічні методи дослідження: практикум / за заг. ред. С.В. Павлова. — Запоріжжя: ЗДМУ, 2021. — 91 с.
2. Лаповець Л. Є., Лебедь Г. Б., Ястремська О. О. та ін. Клінічна лабораторна діагностика: підручник. 2-е вид., стереотипне. Київ: Медицина, 2021. 472 с.
3. Журавльова, Л. В. Гострі лейкози : Методичні вказівки для самостійної роботи студентів з дисципліни «Внутрішня медицина (в тому числі з ендокринологією)» / Л. В. Журавльова [та ін.] ; Харківський національний медичний університет, Кафедра Внутрішньої медицини № 3. — Харків : ХНМУ, 2016. — 18 с.
4. Міністерство охорони здоров'я України. СМД ГЛЛ (ост.) [Електронний ресурс]. 11.10.2023.
5. Chennamadhavuni, A. Leukemia [Електронний ресурс] / A. Chennamadhavuni, V. Iyengar, S. K. R. Mukkamalla [та ін.] // StatPearls [Internet]. — Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2025. — Оновлено 17.01.2023. — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560490/> (дата звернення: [23.11.2025]).
6. Інструкція до забарвлювача азур-еозину за Романовським(Азур-еозин за Романовським-1000). - ПрАТ “Реагент”.-Дніпро,2020.-2с. Дата останнього перегляду інструкції з використання 08.09.2020 р .
7. Цитологічна і лабораторна техніка та діагностика : навч. посіб. / Воробель А. В., Грицуляк Б. В., Глодан О. Я., Халло О. Є. ; ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника». — Івано-Франківськ, 2013. — [163].

8. Scarfò L., Ferreri A. J. M., Ghia P. Chronic lymphocytic leukaemia [Електронний ресурс] // Critical Reviews in Oncology/Hematology. – 2016. – Т. 104. – С. 169–182. – Режим доступу: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.06.003>
9. Воробель А. В. Основи гематології : монографія / А. В. Воробель. – Івано-Франківськ : Видавництво «Плай» ЦІТ Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника, 2009. – 148 с.
10. Шевченко Т.М., Полушкін П.М. Основи загальної клінічної лабораторної діагностики : електронний посібник / Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара. — Дніпро : ДНУ, 2016. — 138 с.
11. Pelcovits A., Niroula R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. Rhode Island Medical Journal. 2020. Vol. 103, no. 3. P. 38–40. URL:<http://rimed.org/rimedicaljournal/2020/04/2020-04-38-hem-onc-pelcovits.pdf>
12. Клінічна лабораторна діагностика : методичні вказівки для студентів 4 курсу медичного факультету / уклад. : О. М. Тимченко, А. О. Навродська, Н. П. Гладких та ін. Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2023. 44 с.
13. Лейкодіф — забарвлення мазків крові (LEUCODIF 200). Кат. № BLT00083 : інструкція із застосування набору реагентів / Erba Lachema s.r.o. Брно, 2023. 3 с. [дата перегляду: 27.09.2023].