**Слайд 1**

**ИНФОРМАТИВНОСТЬ РАСШИРЕННЫХ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХПОКАЗАТЕЛЕЙ И ЦИФРОВОЙ МИКРОСКОПИИ В ГЕМАТООНКОЛОГИИ**

**Г.В. Чернышева,**

**фельдшер-лаборант патоморфологического отдела**

**БУЗОО «КДЦ»**

**Слайд 2**

Онкогематология является одной из самых динамичных областей медицины, которая особенно активно развивается в последние 10 лет. Информативность расширенных клинико-лабораторных исследований и цифровой микроскопии в онкогематологии строится по определенному алгоритму. Существует определенный ряд исследований, которые необходимы для постановки и уточнения диагноза.

Методами исследования клеточного состава крови при гемабластозах являются:

* Биохимические методы (клинические исследования, к таковым относится общий анализ крови)
* Цитогенетические методы (это кариотипирование)
* Молекулярно-генетические исследования (это ПЦР, пиросеквенирование гена)
* Проточная цитофлюорометрия (или иммунофенотипирование).

**Слайд 3**

А теперь остановлюсь отдельно на каждом исследовании**.**

Итак, **биохимические лабораторные исследования** являются ключевыми в предварительной постановке диагноза, а именно общий анализ крови и есть та самая отправная точка для обследования при онкогематологических заболеваниях.

**Слайд 4**

Преимуществами данного исследования является быстрота проведения исследования, точность измерения показателей общего анализа крови и экономическая составляющая, благодаря высокой производительности системы клеточного анализа.

**Слайд 5**

Общий анализ крови позволяет:

1. идентифицировать пять типов клеток крови: лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы и базофилы;

2. выявлять не только количественные, но и качественные аномалии клеток крови.

**Слайд 6**

Скрининг гематологических нарушений, в настоящее время, проводится с применением современного лабораторного оборудования – гематологических анализаторов, что позволяет:

- получать высокое качество результатов;

-производить автоматический анализ незрелых форм клеток;

- результат можно получить даже из малого объема образца (достаточно 200 мкл), что немало важно для больных с лейкопенией;

- при исследовании используется всего 5 реагентов;

-возможность, произвести автоматическое повторное (дополнительное) тестирование;

- высокая производительность систем клеточного исследования(до 100 образцов в час).

**Слайд 7**

Для подтверждения наличия аномальных циркулирующих клеток, необходимо проведение микроскопического исследования мазков крови, а вернее цитологического - известного как традиционное, или стандартное.

Цитологическое исследование мазков крови было введено в практику еще в 70-ые годы, и не утратило своей актуальности и в настоящее время.

**Слайд 8**

Производят микроскопию с подсчетом 100 клеток для анализа лейкоцитарной формулы. Используют 2 вида подсчетов: 1 подсчет: 3 эозинофила 0 миелоцитов; 2 подсчет: 1 эозинофил 4 миелоцита.

Патологические пробы крови или подозрительные на патологию тщательно исследуют, т.е. несколько раз перепроверяют, прежде чем завершить анализ и выдать результат пациенту.

**Слайд 9**

К недостаткам микроскопического исследования мазков крови можно отнести:

* Неудовлетворительная достоверность, точность и воспроизводимость результатов (в стандартном мазке исследуется 100 клеток, при лейкопении – 50 клеток).
* Влияние качества приготовления мазков на результат.
* Распределение ядерных клеток на стекле.
* Субъективная оценка патологических клеток.
* Уровень квалификации персонала.
* Временные затраты на приготовление мазка крови и его просмотр.
* Невозможность выделения субпопуляций лимфоцитов и моноцитов.

**Слайд 10**

**Кариотипирование, это следующая методика, используемая для подтверждения диагноза онкогематологии.**

Кариотипирование – это цитогенетический метод, позволяющий выявить отклонения в структуре и числе хромосом, которые могут стать причиной бесплодия, наследственной болезни и рождения ребенка с врожденным пороком развития (ВПР).Кариотипированиев медицинской практике применяетсядля:

* изучения кариотипа пациентов;
* исследования хромосом плода –пренатальноекариотипирование;
* онкогематологии.

Практическое значение цитогенетического анализа при острых лейкозах в последнее десятилетие стало общепризнанным, поскольку его данные позволяют уточнить вариант заболевания, проводить наблюдение за больными в период ремиссии или рецидива, оценивать прогноз. Например, при лейкозах в костном мозге появляется мутантная хромосома. Она называется Филадельфийская хромосома. Это очень неблагоприятный признак заболевания, но при правильно выбранной тактике лечения кариотип пациента, его хромосомный набор, восстанавливается.

**Слайд 11**

После предварительной подготовки пробы костного мозга, выращивания лимфоцитов в термостате-инкубаторе, стекло с окрашенным биоматериалом микроскопируют, производят подсчет хромосом. Для кариотипирования необходимо использовать микроскопы с отличной разрешающей возможностью.

**Слайд 12**

Как установлено научными изысканиями многиеонкогематологические заболевания имеют генетическую предрасположенность.

Существует множество однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), не приводящих зачастую к изменению функций кодируемых белков, но при этом имеющих четкие ассоциации с заболеваниями.

Ассоциация обычно выражается в степени увеличения риска развития данного заболевания и рассчитывается исходя из того, как часто встречается данный полиморфизм у больных по сравнению со здоровыми. Например, наличие «плохого» варианта полиморфизма гена, кодирующего фактор роста TGFb, увеличивает вероятность развития рака молочной железы примерно на 7% при наличии 1 копии и на 17% в случаях, когда «плохие» обе копии гена.

Достоверность данных об ассоциации полиморфизма с заболеванием в значительной степени зависит от объема исследуемой выборки. Кроме того важно, чтобы результаты конкретного исследования были подтверждены другой работой.

Существуют и популяционные вариации. Не всегда исследования, проведенные на азиатской группе обследуемых, в полной мере соответствуют данным, полученным в европеоидной популяции.

**Слайд 13**

Изменения наследственного материаламогут возникать как в соматических, так и половых клетках, с этой целью проводят **молекулярно-генетические исследования – ПЦР и пиросеквенирование гена**.

Различают геномные, хромосомные аберрации (мутации) и генные мутации. Понятие «Мутация» – это изменения в ДНК клетки.

Геномные мутации - изменение количества наследственного материала (анеуплоидии – изменение количества на 1-2 хромосомы), полиплоидии – кратные изменения (т.е. изменение количества хромосом в несколько раз).

Хромосомные аберрации - изменение структуры хромосом: делеция (отрыв части хромосомы), инверсия (поворот части хромосомы на 180°), транслокации (перемещение части одной хромосомы на другую), но редко встречаются и другие.

Генные мутации - изменение структуры ДНК в пределах одного гена.

**Слайд 14**

Возможные генные мутации:

* Однонуклеотидные – отличия последовательности ДНК размером в один нуклеотид в геноме представителей одного видаили между гомологичными участками гомологичных хромосом.
* Делеции или инсерции – это вариации числа копий генов
* Вариации числа функциональных повторов
* Эпигенетические нарушения – это мутации без изменения ДНК
* Инверсии (перестановки) и транслокации(перенос участка хромосомы на негомологичную)

**Слайд 15**

Молекулярно-генетическая диагностика в онкологии позволяет выявить наличие наследственной предрасположенности; провести раннюю диагностику, мониторинг течения заболевания; помогает выбрать эффективную химиотерапию; оценить эффективность лечения; выявить и определить лекарственную непереносимость.

**Слайд 16**

Молекулярно-генетические методы это очень обширное понятие, позволяющее производить:

- определение крупных перестроек методами блот-гибридизации и использованием ДНК-зондов;

- выявление крупных и мелкихделеций с помощью ПЦР и гель-электрофореза;

- выявление мутаций в сайтах узнавания рестриктазами с помощью ПЦР;

- аллель-специфическую гибридизацию (амплификацию) с использованием олигонуклеотидов, комплементарных нормальной и мутантной последовательности ДНК; детекцию конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК (SSCP);

- гетеродуплексный анализ;

- пиросеквенирование гена или его фрагмента.

**Слайд 17**

Для проведения ПЦР – исследований должны соблюдаться определенные условия организации рабочих мест, согласно Методическим указаниям 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»:

- отбор материала и первый этап выделения пробы производится в боксе Пре-ПЦР;

- второй этап происходит в боксе выделения нуклеиновых кислот;

- третий этап - в боксе ПЦР.

В случаях, когда по методике определения требуется электрофорез в агарозном геле, то дальнейшая обработка данной пробы происходит в боксе Пост-ПЦР.

Для определения мутаций и экспрессии генов методом ПЦР и RT-PCR используют миницетрифугу-вортекс, дозаторы, автоматический амплификатор, ПЦР-анализатор, камеру для электрофореза, видеоанализатор, компьютер.

**Слайд 18**

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это метод амплификации (многократного копирования) специфических последовательностей ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы. ПЦР позволяет получать многие копии таких участков и анализировать их. Полимеразная цепная реакция строится из 3 этапов:

1. Денатурация (расплетение нити ДНК (РНК)
2. Отжиг праймеров
3. Синтез (создание, сопоставление) нити ДНК (РНК).

Чувствительность ПЦР очень высока: с помощью данного метода можно обнаружить одну единственную клетку со специфической ДНК- или РНК-последовательностью среди 10 в 4 степени - 10 в 6 степени клеток.

**Слайд 19**

До начала секвенирования производят амплификацию участка ДНК. Секвенирование гена или его фрагмента – определение аминокислотной или нуклеотидной последовательности. В результате секвенирования перекрывающихся участков ДНК, получают последовательности:

- участков генов,

- целых генов,

- тотальном РНК и даже полных геномов организмов.

На слайде представлено оборудование для проведения пиросеквенирования - стационарныйпиросеквенатор – для определения нуклеотидных последовательностей (секвенирование).

**Слайд 20**

Следующая методика, применяемая для подтверждения диагноза гемабластоза, - проточная цитофлюорометрия.

**Проточная цитофлюорометрия** является методом выбора для определения линейной принадлежности и уровня дифференцировки клеток, так как позволяет получать объективную информацию об иммунологических особенностях лейкозных бластов при диагностике острых лейкозов и лимфом. Несоответствие фенотипов опухолевой и нормальной клеток дает возможность выявления лейкозных бластов по абберантности экспрессии маркерных молекул.

**Слайд 21**

Работа цитофлюориметра основывается на применении уникальной цифровой технологии определения морфологии клеток. Благодаря этому составляется:

1. статистический анализ данных

● то есть происходит коррекция системой большей части стандартных интерферирующих воздействий;

● а также гарантия высокой точности результатов.

2) уникальная визуализация результатов анализа

● 3Dскатерограммы;

● график поверхностей.

При выявлении позитивности бластов по определенному якорному маркеру, его экспрессия позволяет идентифицировать лейкозные клетки и оценить уровень экспрессии других маркеров в популяции патологических клеток вне зависимости от соотношения опухолевых и нормальных клеток в образце.

Интересным фактом научных исследований является то, что риск возникновения патологии крови происходит у человека в так называемые переходные периоды жизни. Причем у детей гораздо реже, чем у людей зрелого, а вернее преклонного возраста, т.е. после 50-60 лет. Научных фактов, почему так происходит, практически нет. Гипотез много, но все ученые склоняются к основным причинам - это гормональная перестройка и снижение иммунитета.

И в заключении хочется сказать о том, что диагноз врачей-гематологов напрямую зависит от лабораторных исследований. На основе анализа современного состояния проблемы информативности иммунофенотипических данных разработаналгоритм последовательного анализа данных для формулировки иммунофенотипического диагноза гемабластозов.Соблюдение данного алгоритма является обязательным в лабораторной диагностике.

**Слайд 22**

Спасибо за внимание!

Будьте здоровы! Берегите себя!