

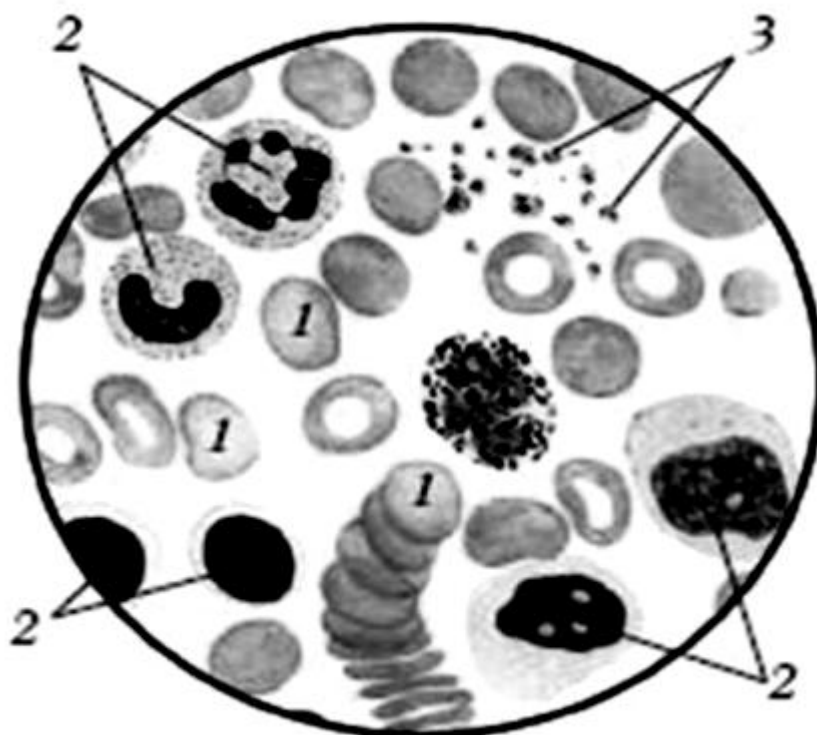
Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Ульяновский государственный университет»

Курносова Н.А., Тураева В.А., Дрождина Е.П., Михеева Н.А.,
Слесарев С.М.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
к выполнению лабораторных работ по дисциплине

КЛИНИЧЕСКАЯ ГЕМАТОЛОГИЯ

для студентов направления бакалавриата 06.03.01-Биология
экологического факультета ИМЭиФК УлГУ



Ульяновск 2019

УДК 577.2
ББК 28с
М545

Издается по решению Ученого совета
Института медицины, экологии и физической культуры
Ульяновского государственного университета

Рецензент:

к.б.н., доцент кафедры биологии и химии
Ульяновского государственного педагогического университета
им. И.Н. Ульянова *В.А. Михеев, О.Е.Беззубенкова*

Коллектив авторов:

Курносова Н.А., Тураева В.А., Дрождина Е.П., Михеева Н.А.,
Слесарев С.М.

Методические указания к выполнению лабораторных работ по дисциплине клиническая гематология для студентов направления бакалавриата 06.03.01-Биология экологического факультета ИМЭиФК УлГУ / Н.А. Курносова, В.А.Тураева, Е.П.Дрождина, Н.А.Михеева, С.М. Слесарев,. – 35с

Методические указания к выполнению лабораторных работ по дисциплине клиническая гематология для студентов направления бакалавриата 06.03.01-Биология экологического факультета ИМЭиФК УлГУ предназначены в помощь студентам при выполнении лабораторных работ. Методические указания включают в себя программу дисциплины, указания по выполнению лабораторных работ с подробным описанием хода работ, список теоретических вопросов, необходимых для их защиты, список литературных источников.

УДК 577.2
ББК 28с
М545

©Курносова Н.А. и др., 2019
©Ульяновский государственный
университет,2019

СОДЕРЖАНИЕ:

1. Цели и задачи дисциплины	4
2. Место дисциплины в структуре ОПОП	4
3. Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине, соотнесенных с планируемыми результатами освоения образовательной программы	4
4. Объем дисциплины	6
5. Лабораторные работы:	13
5.1. Морфофункциональная характеристика клеток красной крови в норме и при патологии. Эритроцит. Патологические формы эритроцитов	13
5.2. Определение фетального гемоглобина	16
5.3. Определение содержания эритроцитов в крови	18
5.4. Тесты на серповидность эритроцитов. Гематокрит.	20
5.5. Морфологические исследования эритроцитов	21
5.6. Скорость оседания эритроцитов (erythrocyte sedimentation rate, ESR).	24
5.7. Определение количества лейкоцитов	25
5.8. Лейкоцитарная формула. Клиническое значение изменений лейкоцитарной формулы.	28
5.9. Методики подсчета количества тромбоцитов. Исследование морфологии тромбоцитов. Адгезивная функция тромбоцитов.	31
6. Список рекомендуемой литературы	35

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ОСВОЕНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ

Цели освоения дисциплины: формирование представлений о системе крови, морфологических, цито-, биохимических и функциональных особенностях клеток крови, методах исследования периферической крови, костного мозга, системы гемостаза, о причинах и механизмах развития болезней системы крови.

Задачи освоения дисциплины:

1. Изучить строение и функции системы крови, схему и основы регуляции кроветворения, кинетику, морфологические, цито-, биохимические и функциональные особенности клеток крови.
2. Освоить методы исследования периферической крови, костного мозга, системы гемостаза.
3. Научиться дифференцировать клетки крови и костного мозга здоровых людей и лабораторных животных по морфологическим признакам.
4. Изучить механизмы и методы исследования свертывающей и противосвертывающей систем крови.
5. Изучить этиологию, патогенез, особенности клинико-лабораторной картины анемий, эритроцитозов, лейкоцитозов

МЕСТО ДИСЦИПЛИНЫ В СТРУКТУРЕ ООП:

Данная учебная дисциплина включена в раздел Б1. Дисциплины (модули) основной образовательной программы 06.03.01 Биология и относится к дисциплинам по выбору вариативной части Б1.В.ДВ.5. Осваивается на 4 курсе, в 7 семестре.

Данную учебную дисциплину дополняет параллельное освоение следующих дисциплин: основы автоматизации клинической лаборатории, лабораторные методы исследования в биологии, энзимология, большой практикум. Данная дисциплина является предшествующей для преддипломной практики.

ПЕРЕЧЕНЬ ПЛАНИРУЕМЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ОБУЧЕНИЯ ПО ДИСЦИПЛИНЕ, СОТНЕСЕННЫХ С ПЛАНИРУЕМЫМИ РЕЗУЛЬТАТАМИ ОСВОЕНИЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ

Изучение дисциплины «Клиническая гематология» в рамках освоения образовательной программы направлено на формирование у обучающихся следующих общепрофессиональных компетенций:

Код и наименование реализуемой компетенции	Перечень планируемых результатов прохождения практики, соотнесенных с индикаторами достижения компетенций
ОПК-4 способность применять принципы структурной и функциональной организации биологических объектов и владением знанием механизмов гомеостатической регуляции; владением основными	Знать: Структурную и функциональную организацию систему крови, механизмы и регуляции кроветворения, особенности морфологии, метаболизма и функции клеток крови, систему гемостаза в норме и при патологии, этиологию, патогенез, клинико-лабораторную картину анемий и лейкоцитозов, функциональное состояние сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, способы диагностики гематологических заболеваний, нарушений гемостаза. Уметь: Работать с микроскопом. Идентифицировать различные морфологические формы лейкоцитов периферической крови здорового человека и лабораторных животных. Различать ретикулоциты по степени зрелости. Распознавать морфологические формы тромбоцитов. Подсчитывать и анализировать лейкоцитарную формулу, ретикулоцитограмму, тромбоцитограмму, миелограмму. Определять

<p>физиологическими методами анализа и оценки состояния живых систем</p>	<p>абсолютное количество отдельных морфологических форм лейкоцитов. Вычислять эритроцитарные индексы, индекс ядерного сдвига нейтрофилов (по Шиллингу). Дифференцировать регенеративные и дегенеративные патологические формы эритроцитов и лейкоцитов. Дифференцировать анемии по морфологической картине крови и костного мозга. Интерпретировать результаты наиболее распространенных методов диагностики гематологических заболеваний.</p> <p>Владеть: Подготовки предметных стекол. Взятия крови и костного мозга у лабораторных мышей. Приготовления, фиксации и окраски мазков периферической крови. Подсчета эритроцитов в счетной камере Горяева. Исследования содержания гемоглобина гемиглобинцианидным методом. Определения гематокрита. Определения диаметра эритроцитов в мазке крови прямым микроскопическим методом. Построения эритроцитометрической кривой (кривой Прайс-Джонса). Изготовления прижизненно окрашенных препаратов крови для подсчета ретикулоцитов. Подсчета ретикулоцитов. Оценки реакции оседания эритроцитов микрометодом Панченкова. Измерения осмотической резистентности эритроцитов методом Идельсона и микроскопическим методом Яновского. Подсчета общего количества лейкоцитов (ОКЛ) в счетной камере Горяева. Подсчета лейкоцитарной формулы в окрашенных мазках периферической крови. Приготовления, фиксации и окраски мазков периферической крови для подсчета тромбоцитов. Подсчета тромбоцитов в мазке периферической крови по методу Фонио и в счетной камере Горяева.</p>
<p>ОПК-5 способность применять знание принципов клеточной организации биологических объектов, биофизических и биохимических основ, мембранных процессов и молекулярных механизмов жизнедеятельности</p>	<p>Знать: Принципы клеточной организации биологических объектов, биофизические и биохимические основы мембранных процессов и молекулярные механизмы жизнедеятельности. Особенности морфофункциональных взаимосвязей между органами на тканевом уровне их организации, молекулярные механизмы транспорта веществ, дыхания, обмена веществ и энергии</p> <p>Уметь: Самостоятельно организовывать проведение морфометрических исследований и измерений элементов системы крови. Определять на микропрепаратах изучаемые структуры, детали клеточного строения тканей и органов, правильно называть соответствующие структуры.</p> <p>Владеть: Основными методами микроскопирования объектов; Методами сравнения структур организма и установления биологических особенностей специфики организации клеток, постклеточных структур, тканей, органов; Способами (методиками) идентификации клеток, постклеточных структур, тканей и частей органов</p>
<p>ПК-1 способностью эксплуатировать современную аппаратуру и оборудование для выполнения научно-исследовательских полевых и лабораторных биологических работ</p>	<p>Знать: основные подходы к самоорганизации рабочего места биолога, устройство светового микроскопа и правила работы с ним; сущность методов световой микроскопии: в проходящем свете; необходимый перечень оборудования клинико-диагностической лаборатории</p> <p>Уметь: эксплуатировать современную аппаратуру и оборудование для выполнения научно-исследовательских, лабораторных работ; организовать самостоятельную работу с макро- и микропрепаратами и представлять результаты наблюдений в виде схем, рисунков, описаний; определять на микропрепаратах изучаемые структуры, детали клеточного строения тканей и органов, организмы, правильно называть соответствующие структуры; самостоятельно организовывать проведение морфометрических исследований и измерений; приготовить макро- и микропрепараты для последующего изучения</p> <p>Владеть: навыками работы с современным оборудованием КДЛ; микроскопической техникой, компьютерной техникой; методами сравнения структур организма и установления биологических особенностей специфики организации клеток, постклеточных структур, тканей, органов; способами идентификации клеток, постклеточных структур</p>

ОБЪЕМ ДИСЦИПЛИНЫ.Объем дисциплины в зачетных единицах (всего) 4

Объем дисциплины по видам учебной работы (в часах)

Вид учебной работы	Количество часов (форма обучения очная)	
	Всего по плану	В т.ч. по семестрам
		7
Контактная работа обучающихся с преподавателем	57/19*	57/19*
Аудиторные занятия:		
Лекции	19	19
Практические и семинарские занятия	19	19
Лабораторные работы (лабораторный практикум)	19*	19*
Самостоятельная работа	51	51
Текущий контроль (количество и вид: контрольная работа, коллоквиум, реферат)	-	-
Курсовая работа	-	-
Виды промежуточной аттестации (экзамен, зачет)	экзамен 36	экзамен 36
Всего часов по дисциплине	144	144

* - количество часов, проводимых в интерактивной форме

Содержание дисциплины. Распределение часов по темам и видам учебной работы:Форма обучения очная

Название и разделов и тем	Всего	Виды учебных занятий					Форма текущего контроля
		Аудиторные занятия			Занятия в интерактивной форме	Самостоятельная работа	
		лекции	семинарские занятия	лабораторные занятия			
1	2	3	4	5	6	7	
Раздел 1. Гематология как наука							
Тема 1. Общие сведения о системе крови. Основные этапы развития гематологии.	9	2	2	-	-	5	собеседование
Тема 2. Учение о стволовой кроветворной клетке. Теории кроветворения. Современная схема кроветворения.	9	2	2	-	-	5	собеседование
Раздел 2. Форменные элементы крови							
Тема 3. Морфофункциональная характеристика клеток красной крови в норме и при патологии.	19	2	2	12*	*	5	собеседование

Эритроцит. Патологические формы эритроцитов.							
Тема 4. Морфофункциональная характеристика клеток белой крови в норме и при патологии. Кинетика лейкоцитов. Патологические формы лейкоцитов.	15	2	2	4*	*	7	собеседование
Тема 5. Морфофункциональная характеристика тромбоцитов в норме и при патологии. Кинетика тромбоцитов. Понятие о гемостазе. Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз (СТГ).	12	2	2	3*	*	5	собеседование
Раздел 3. Гемостаз							
Тема 6. Коагуляционный гемостаз (КГ). Плазменные факторы свертывания. Методы оценки функционального состояния КГ.	9	2	2	-	-	5	собеседование
Раздел 4. Патологии крови							
Тема 7. Геморрагические диатезы и синдромы. Тромбофилии. Противосвертывающая система крови (антикоагулянты, система фибринолиза). ДВС-синдром.	11	2	2	-	-	7	собеседование
Тема 8. Анемии. Общие сведения (этиология, классификация, неспецифические и специфические клинико-лабораторные проявления).	9	2	2	-	-	5	собеседование
Тема 9. Эритроцитозы и лейкоцитозы. Значение системы крови в диагностике и лечении негематологических заболеваний.	13	3	3	-	-	7	собеседование
ИТОГО	108	19	19	19*	*(19)	51	
ЭКЗАМЕН	36					36	
ВСЕГО	144	19	19	19		87	

Используемые интерактивные образовательные технологии

В процессе изучения дисциплины, с целью формирования и развития профессиональных навыков обучающихся, наряду с традиционными видами занятий, проводятся занятия в интерактивных формах: занятие – «решение проблемных ситуаций»

СОДЕРЖАНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ

Раздел 1. Гематология как наука

Тема 1. Общие сведения о системе крови. Основные этапы развития гематологии. Характеристика системы крови человека и лабораторных животных. Предмет и задачи гематологии. Основные и дополнительные разделы гематологии. Связь гематологии с другими науками. Понятие системы крови. Отличительные особенности крови. Функции крови: транспортная, регуляторная, защитная. Физико-химические показатели крови: удельный вес, осмотическое давление, онкотическое давление, вязкость крови, водородный показатель, химический состав. Эмбриональное кроветворение (характеристика основных периодов). Органы кроветворения у человека в постнатальном периоде развития. Органы кроверазрушения, понятие о ретикулоэндотелиальной системе. Особенности крови лабораторных животных.

Тема 2. Учение о стволовой кроветворной клетке. Теории кроветворения. Современная схема кроветворения.

Структурная организация кроветворной системы. Современная схема кроветворения. Номенклатура клеток крови. Стволовая кроветворная клетка (СКК). Свойства СКК. Доказательства существования стволовых кроветворных клеток в организме. Полустволовые (частично детерминированные) кроветворные клетки, их свойства. Доказательства наличия в организме отдельных родоначальных клеток миелопоэза и лимфопоэза. Характеристика клеток, относящихся к классу коммитированных (унипотентных) клеток-предшественниц гемопоэза, бластных клеток крови, клеток миело- и лимфопоэза, относящихся к классу созревающих клеток. Зрелые клетки крови, их свойства. Виды регуляция гемопоэза. Теории пролиферации и дифференцировки СКК. Роль гемопоэзиндуцирующего микроокружения в регуляции процессов кроветворения. Понятие о гемопоэтинах. Классификация гемопоэтических факторов. Ранние гуморальные активаторы и ингибиторы миело- и лимфопоэза. Поздняя позитивная и негативная регуляция грануломоноцитопоэза. Функциональная характеристика грануломоноцито-поэтических факторов. Поздняя позитивная и негативная гуморальная регуляция мегакариоцитопоэза. Функциональные свойства ростовых факторов, стимулирующих пролиферацию и дифференцировку мегакариоцитов. Поздняя позитивная и негативная гуморальная регуляция эритропоэза. Эритропоэтин, механизмы его действия. Причины и последствия гипо- и гиперпродукции эритропоэтина в организме. Поздняя позитивная и негативная гуморальная регуляция Т- и В-лимфопоэза. Факторы дифференцировки нулевых (ни Т-, ни В-) лимфоцитов.

Раздел 2. Тема 3. Морфофункциональная характеристика клеток красной крови в норме и при патологии. Эритроцит. Патологические формы эритроцитов.

Понятие об эритроците, его функция. Морфологически идентифицируемые формы клеток эритроидного ряда. Основные понятия эритрокинетики (время кругооборота, генерационное время, транзитное время). Виды физиологического (нормобластического) эритропоэза – эффективный, терминальный, неэффективный. Критерии эффективности эритропоэза. Морфологическая характеристика ретикулоцитов разных степеней зрелости и зрелых эритроцитов. Функции эритроцитов (транспортная, регуляторная). Биохимические особенности эритроцитов. Поверхностные антигены эритроцитов (полисахаридные и белковые). Механизмы разрушения эритроцитов. Причины патологического внутрисосудистого и внутриклеточного гемолиза. Классификация антиэритроцитарных антител по механизму действия, по силе эффекта, в зависимости от термочувствительности. Характеристика групп крови АВО.

Патологические формы эритроцитов. Понятие и классификация регенеративных и дегенеративных патологических форм эритроцитов. Методы подсчета эритроцитов в периферической крови. Источники ошибок при подсчете эритроцитов в счетной камере Горяева. Формы гемоглобина крови у человека в норме и при патологии. Методы гемоглобинометрии. Границы колебаний содержания эритроцитов и гемоглобина в крови у здорового человека. Причины снижения и увеличения содержания эритроцитов и гемоглобина в крови у человека. Гематокрит, его клиническое значение. Метод определения гематокрита. Индексы эритроцитов (цветовой показатель, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроците, средний объем эритроцита). Их клинико-диагностическое значение, способы вычисления. Границы колебаний гематокритной величины и эритроцитарных индексов у здорового человека. Основные методы определения диаметра эритроцитов (прямой микроскопический, электронно-автоматические методы). Техника и клинико-диагностическое значение построения эритроцитометрической кривой. Пределы колебаний размеров и среднего диаметра эритроцитов у здорового человека. Классификация эритроцитов по размеру (нормо-, микро-, макро- и мегалоциты). Методы окраски ретикулоцитов (на стекле, в пробирке). Особенность прижизненной окраски ретикулоцитов. Метод подсчета ретикулоцитов в мазке крови и камере Горяева. Нормальное содержание ретикулоцитов в крови у здорового человека и лабораторных животных. Морфологическая характеристика ретикулоцитов различной степени зрелости. Клинико-диагностическое значение изменения количества ретикулоцитов и «левого ретикулярного сдвига». Определение понятий «осмотическая резистентность эритроцитов» (ОРЭ), «верхняя граница», «нижняя граница», «амплитуда» и «зона» резистентности эритроцитов. Пределы колебаний верхней и нижней границ ОРЭ у здорового человека. Факторы, влияющие на ОРЭ. Методы определения ОРЭ. Механизм оседания эритроцитов. Величина реакции оседания эритроцитов (РОЭ) в норме. Факторы, обуславливающие угнетение и активацию РОЭ. Макро- и микрометоды исследования РОЭ. Источники ошибок при оценке РОЭ. Клинико-диагностическое значение определения ОРЭ и РОЭ.

Тема 4. Морфофункциональная характеристика клеток белой крови в норме и при патологии. Кинетика лейкоцитов. Патологические формы лейкоцитов.

Морфологически идентифицируемые формы клеток грануломоноцитарного и лимфоидного рядов. Виды лейкоцитов периферической крови. Морфологические свойства палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, больших гранулированных, средних, малых лимфоцитов, плазмочитов, моноцитов (внешний диаметр, особенности ядра и цитоплазмы). Кинетика, цитохимические маркеры, функции и признаки активации нейтрофильных, эозинофильных, базофильных гранулоцитов, моноцитов, лимфоцитов. Патологические формы лейкоцитов. Понятие и классификация регенеративных и дегенеративных патологических форм лейкоцитов. Основные методы определения ОКЛ в периферической крови. Источники ошибок при подсчете ОКЛ в счетной камере Горяева. Границы колебаний ОКЛ в периферической крови у здорового человека и лабораторных животных. Изучение морфологии и освоение навыков идентификации различных морфологических форм лейкоцитов периферической крови у здорового человека и лабораторных животных. Лейкоцитарная формула, ее клинико-диагностическое значение. Унифицированный метод подсчета лейкоцитарной формулы в окрашенных мазках периферической крови. Источники ошибок при подсчете лейкоцитов в мазке крови. Метод идентификации различных морфологических форм лейкоцитов и подсчета лейкоцитарной формулы с помощью автоматизированных гематологических анализаторов. Процентное содержание отдельных морфологических форм лейкоцитов в крови здорового взрослого человека. Особенности лейкоцитарной формулы у здоровых детей различного возраста. Техника определения абсолютного количества отдельных видов лейкоцитов в периферической крови. Индекс ядерного сдвига нейтрофилов по

Шиллингу (метод определения, пределы колебаний в норме, клинко-диагностическое значение).

Тема 5. Морфофункциональная характеристика тромбоцитов в норме и при патологии. Кинетика тромбоцитов. Понятие о гемостазе. Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз (СТГ). Методы оценки функционального состояния СТГ.

Морфологически идентифицируемые формы клеток мегакариоцитарного ряда. Кинетика тромбоцитов. Морфоструктурные особенности тромбоцитов. Цитохимические маркеры плотных телец и α -гранул тромбоцитов. Функции тромбоцитов. Методика приготовления, фиксации и окраски препаратов периферической крови для подсчета тромбоцитов. Техника подсчета тромбоцитов в мазке крови (по Фонио). Метод подсчета тромбоцитов в счетной камере Горяева. Автоматизированные методы подсчета тромбоцитов (с помощью гематологических анализаторов). Морфологическая характеристика отдельных видов тромбоцитов. Процентное содержание тромбоцитов и их отдельных морфологических форм в крови здорового человека. Освоение навыков идентификации различных морфологических форм тромбоцитов.

Раздел 3. Гемостаз.

Тема 6. Коагуляционный гемостаз (КГ). Плазменные факторы свертывания. Методы оценки функционального состояния КГ.

Определение понятия «гемостаз». Виды и компоненты гемостаза. Механизмы тромборезистентности сосудистой стенки. Стадии сосудисто-тромбоцитарного гемостаза. Механизмы первичного и вторичного спазма сосудов, адгезии, активации, дегрануляции и агрегации тромбоцитов и ретрации тромба в процессе реализации сосудисто-тромбоцитарного гемостаза. Плазменные факторы свертывания (классификационный номер, название, место образования, функции). Стадии коагуляционного гемостаза. Внешний и внутренний пути свертывания крови (пусковые факторы, механизмы). Механизмы регуляции свертывания крови. Методы исследования сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза. Противосвертывающие системы крови: антикоагулянты (классификация, функциональная характеристика), фибринолитическая система (пути активации, механизм действия). Ингибиторы фибринолиза.

Раздел 4. Патологии крови.

Тема 7. Геморрагические диатезы и синдромы. Тромбофилии. Противосвертывающая система крови (антикоагулянты, система фибринолиза). ДВС-синдром.

Определение понятия «геморрагические диатезы и синдромы». Основные причины кровоточивости. Нарушения сосудисто-тромбоцитарного гемостаза – тромбоцитопении, тромбоцитопатии, тромбоцитозы (определение понятий, классификация). Особенности кровоточивости при нарушениях сосудисто-тромбоцитарного гемостаза. Причины и механизмы развития продуктивных тромбоцитопений. Механизмы развития иммунных форм тромбоцитопений, связанных с повышенным разрушением тромбоцитов. Неиммунные формы тромбоцитопений потребления – тромбоцитарная тромбоцитопеническая пурпура и гемолитико-уремический синдром (этиология, патогенез, клинко-лабораторная картина). Механизмы развития тромбоцитопений распределения и разведения. Тромбастения Гланцмана, тромбодистрофия Бернара-Сулье, болезнь Виллебранда (этиология, патогенез, клинко-лабораторная картина). Дифференциальные критерии в диагностике тромбодистрофии Бернара-Сулье и болезни Виллебранда. Врожденные заболевания, обусловленные дефектами гранул тромбоцитов. Этиологические и патогенетические факторы приобретенных тромбоцитопатий. Этиология, механизмы развития и клинко-лабораторные проявления тромбоцитозов. Нарушения коагуляционного гемостаза – коагулопатии (определение, классификация). Механизмы развития наследственных форм коагулопатий. Гемофилии А, В и С – тип наследования, характер кровоточивости, алгоритм диагностики. Этиология приобретенных форм коагулопатий. Определение понятия «вазопатия». Причины

развития наследственных и приобретенных вазопатий. Геморрагическая телеангиэктазия (болезнь Рондю-Ослера-Вебера), болезнь (геморрагический васкулит) Шенлейна-Геноха (этиология, патогенез, клинико-лабораторная картина). Определение понятия «тромбофилия». Классификация, этиология и патогенез тромбофилий. Синдром ДВС - этиологические факторы и стадии развития. Механизмы и клинико-лабораторные проявления гипер- и гипокоагуляции при синдроме ДВС. Принципы терапии синдрома ДВС. Ознакомление с принципами лабораторной диагностики нарушений сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза на примере решения ситуационных задач.

Тема 8. Анемии. Общие сведения (этиология, классификация, неспецифические и специфические клинико-лабораторные проявления).

Определение понятия «анемия». Основные неспецифические и специфические клинико-гематологические признаки анемий. Современная классификация анемий по механизму развития, степени тяжести, с учетом морфологических критериев (по цветовому показателю, величине эритроцитов, содержанию железа в сыворотке крови, типу эритропоэза) и регенераторной активности костного мозга.

Постгеморрагические анемии. Острая постгеморрагическая анемия (причины развития, клиника, механизмы адаптации). Особенности морфологического состава крови в различные сроки после острой кровопотери. Этиология, патогенез и клинико-гематологические признаки хронической постгеморрагической анемии. Характеристика острой и хронической постгеморрагических анемий по цветовому показателю, СДЭ, содержанию железа в сыворотке крови, типу эритропоэза, регенераторной способности костного мозга. Ознакомление с принципами лабораторной диагностики постгеморрагических анемий на примере решения ситуационных задач.

Гемолитические анемии. Классификация гемолитических анемий. Причины и клинико-лабораторные признаки внутри- и внеклеточного гемолиза. Схема обмена желчных пигментов в организме. Наследственные формы гемолитических анемий: наследственный микросфероцитоз (анемия Минковского-Шоффара), анемия, связанная с дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, серповидноклеточная анемия, β -талассемия (большая, промежуточная, малая формы) (тип наследования, особенности патогенеза и клинико-гематологической картины, лабораторная диагностика). Характеристика наследственных гемолитических анемий с учетом морфологических критериев, особенностей гемолиза и регенераторной активности костного мозга. Приобретенные гемолитические анемии. Причины и механизмы развития иммунных и неиммунных приобретенных гемолитических анемий. Аутоиммунная гемолитическая анемия, вызванная тепловыми антителами, болезнь холодных агглютининов, пароксизмальная холодная гемоглобинурия, эритробластоз (гемолитическая болезнь) новорожденного (причины и механизмы развития, клиника, картина крови, способы диагностики). Характеристика анемий с учетом морфологических критериев, особенностей гемолиза и состояния процессов регенерации в костном мозге. Клинико-лабораторные различия физиологической и патологической желтухи у новорожденных. Приобретенные гемолитические анемии, связанные с повреждением оболочки эритроцитов. Виды повреждения эритроцитарных мембран. Болезнь Маркиафавы-Микели, маршевая гемоглобинурия (этиология, патогенез, клинические проявления, картина крови, принципы диагностики). Изучение особенностей морфологического состава периферической крови при гемолитических анемиях. Ознакомление с принципами диагностики гемолитических анемий на примере решения ситуационных задач.

Анемии, связанные с нарушением кровообразования. Классификация анемий, связанных с нарушением кровообразования. Обмен и распределение железа в организме. Показатели обмена железа в организме здорового человека. Железодефицитная анемия (причины развития, патогенез, патогенетическая классификация, клинические симптомы и гематологические признаки). Характеристика железодефицитной анемии по цветовому показателю, СДЭ, содержанию железа в сыворотке крови, типу эритропоэза,

регенераторной способности костного мозга. Схема биосинтеза гема. Железорефрактерная анемия (этиология, патогенез, клинико-гематологическая характеристика). Дифференциальные лабораторные критерии железодефицитной и железорефрактерной анемий. Обмен и роль витамина В₁₂ и фолиевой кислоты в организме. Мегалобластные В₁₂- и фолиеводефицитная анемии. Причины гиповитаминоза В₁₂ и фолиевой кислоты, картина крови и костного мозга. Понятие о мегалобластическом типе эритропоэза. Отличительные критерии нормобластического и мегалобластического типов кроветворения. Патогенез гематологических нарушений при мегалобластных анемиях. Морфологическая характеристика (размеры, особенности ядра и цитоплазмы) мегалобластических элементов различной степени зрелости – промegalобласта, базофильного, полихроматофильного и оксифильного мегалобластов, мегалоцитов. Механизм неврологических расстройств при анемии Аддисон-Бирмера. Понятие о «фуникулярном миелозе». Клинические проявления фуникулярного миелоза. Проявления и патогенез нарушений со стороны пищеварительного тракта при анемии Аддисон-Бирмера. Характеристика В₁₂- и фолиеводефицитной анемий по цветовому показателю, СДЭ, содержанию железа в сыворотке крови, типу эритропоэза, регенераторной способности костного мозга. Изучение особенностей морфологического состава периферической крови и костного мозга при железо- и В₁₂-дефицитной анемиях. Ознакомление с принципами дифференциальной лабораторной диагностики анемий, связанных с нарушением кроветворения, на примере решения ситуационных задач.

Гипо- и апластические анемии. Этиология и патогенез гипо- и апластических анемий. Их клинико-гематологические признаки. Наследственные формы гипопластических анемий: анемия Фанкони, анемия Эстрена-Дамешека, анемия Даймонда-Блэкфана – тип наследования, механизм развития, характер гипоплазии кроветворения (тотальная или парциальная), клиника, картина крови и костного мозга. Приобретенные тотальные и парциальные апластические анемии – причины и механизм развития, клинико-гематологическая картина. Гематологические критерии оценки тяжести приобретенных апластических анемий.

Тема 9. Эритроцитозы и лейкоцитозы. Значение системы крови в диагностике и лечении негематологических заболеваний.

Виды эритроцитозов. Причины и механизмы развития относительных и абсолютных эритроцитозов. Клиническая характеристика и критерии лабораторной диагностики эритроцитозов.

Понятие о лейкоцитозе. Принципы классификации лейкоцитозов. Виды, общая этиология и механизмы развития физиологических и патологических лейкоцитозов. Классификация лейкоцитозов по изменению в лейкоцитарной формуле. Нейтрофилия. Этиологические виды нейтрофилий и причины их развития. Лабораторная диагностика. Классификация нейтрофилий в зависимости от характера и степени ядерного сдвига в лейкоцитарной формуле. Основные патогенетические факторы развития нейтрофилий. Эозинофилия, базофилия, лимфоцитоз и моноцитоз – причины и механизмы развития, лабораторная диагностика. Классификация лимфоцитозов по скорости развития. Их характеристика (этиология, патогенез). Изучение особенностей клеточного состава и морфологии клеток крови при лейкоцитозах. Дифференцирование различных видов лейкоцитозов с помощью подсчета лейкоцитарной формулы периферической крови.

Анемический синдром при негематологических заболеваниях. Причины, механизмы развития гипохромной, нормохромной и гиперхромной анемии при негематологических заболеваниях. Механизмы развития дефицитных и апластической анемий на фоне беременности. Причины и механизмы развития вторичных эритроцитозов. Типы и причины развития лейкоцитарных реакций инфекционного и неинфекционного генеза. Механизмы развития лейкопений при голодании, инфекциях, эндокринных заболеваниях. Гематологические проявления паранеопластического синдрома. Гематологические проявления ВИЧ-инфекции. Применение трансплантации стволовых

гемопозитических клеток в лечении сердечно-сосудистых заболеваний, аутоиммунной патологии, сахарного диабета, ВИЧ-инфекции и др. Осложнения трансплантации стволовых гемопозитических клеток.

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ (ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ)

ТЕМЫ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

Раздел 2. Форменные элементы крови

Тема 3. Морфофункциональная характеристика клеток красной крови в норме и при патологии. Эритроцит. Патологические формы эритроцитов.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 1 (2ч)

Форма проведения – «решение проблемных ситуаций»

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЕМОГЛОБИНА

Исследование содержания гемоглобина в крови (гемоглобинометрия) включает определение гемоглобина и его дериватов, которые присутствуют в крови здоровых людей или появляются при различных патологических состояниях. У здоровых людей гемоглобин находится в крови, главным образом, в виде оксигемоглобина, восстановленного гемоглобина и в небольшом количестве - метгемоглобина, карбоксигемоглобина.

Для определения концентрации гемоглобина наиболее часто применяются колориметрические методики, основанные на том, что присоединение к гему различных химических групп сопровождается изменением окраски.

Унифицированная гемиглобинцианидная методика

Принцип. Гемоглобин окисляется в метгемоглобин (гемиглобин) железосинеродистым калием, который, вступая в реакцию с ацетонциангидрином, образует окрашенный цианметгемоглобин (гемиглобинцианид). Интенсивность окраски раствора цианметгемоглобина пропорциональна содержанию гемоглобина.

Реактивы: 1) трансформирующий раствор: натрия гидрокарбонат (NaHCO_3) - 1,0 г; ацетонциангидрин - 0,5 мг; калий железосинеродистый (красная кровяная соль, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) - 0,2 г; дистиллированная вода - до 1 л. Раствор желтого цвета, прозрачный; при обесцвечивании или появлении осадка непригоден. Реактив считается годным для употребления в течение нескольких месяцев после приготовления при хранении в посуде из темного стекла; 2) стандартный калибровочный раствор гемиглобинцианида промышленного изготовления (лучше от фирмы-лидера на рынке диагностического оборудования). Например, стандартный раствор фирмы «Имуна» имеет концентрацию гемиглобинцианида 61,23 мг/100 мл, что соответствует концентрации гемоглобина в крови 15,4 г/100 мл при разведении в 251 раз. Хранят в холодильнике в незамороженном виде, защищая от света.

Ход определения. В пробирку, содержащую 5 мл трансформирующего раствора, добавляют 0,02 мл крови (разведение в 251 раз). Хорошо перемешивают и оставляют стоять 10 мин. Фотометрируют при длине волны 500-560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 10 мм против контрольной пробы (трансформирующий раствор). Измеряют в тех же условиях стандартный раствор. Расчет содержания гемоглобина производят по калибровочному графику, построенному по разведениям стандартного раствора гемиглобинцианида в трансформирующем растворе (табл. 13.1).

Таблица 13.1

Приготовление разведений стандартного раствора гемиглобинцианида для построения калибровочного графика

№ пробирки	Стандартный раствор, мл	Трансформирующий раствор, мл	Концентрация гемоглобина, г/л
1	-	6	Контрольная проба
2	2	4	50
3	4	2	100
4	6	-	150

По оси абсцисс откладывают известные цифры концентрации гемоглобина, а по оси ординат - показатели оптической плотности со шкалы прибора либо рассчитанные по формуле:

$$Hb \text{ (г/л)} = E_{\text{оп}} / E_{\text{ст.}} \cdot C \cdot K \cdot 0,01,$$

где $E_{\text{оп.}}$ - экстинкция опытной пробы; $E_{\text{ст.}}$ - экстинкция стандартного раствора; T - концентрация гемиглобинцианида в стандартном растворе, мг/100 мл; K - коэффициент разведения крови; 0,01 - коэффициент для пересчета в г/л.

Определение гемоглобина гематологическими анализаторами также основано на методе колориметрии. Ход исследования осуществляется согласно инструкции к набору реактивов.

Нормальные величины. У здоровых людей концентрация гемоглобина в крови составляет:

- мужчины - 132-164 г/л;
- женщины - 115-145 г/л;
- новорожденные (кровь из пуповины) - 135-195 г/л;
- дети 1 года - 110-130 г/л;
- дети 10-12 лет - 115-145 г/л.

Дневные колебания. Показатели содержания гемоглобина минимальны утром и максимальны вечером. Значимым изменением уровня гемоглобина считается 15 г/л или более.

Клиническое значение. Тодержание гемоглобина в крови ниже нормы для данного пола и возраста называют анемией. Тогласно критериям ВОЗ, анемия как клинический синдром определяется при снижении концентрации гемоглобина в периферической крови ниже 110 г/л для любого возраста и пола.

Причины анемий

1. Потеря крови.

- Острая постгеморрагическая анемия

2. Нарушение образования эритроцитов.

А. Нарушение костномозгового эритропоэза вследствие дефицита необходимых веществ.

- Железодефицитная анемия.
- Мегалобластная макроцитарная анемия вследствие дефицита витамина В₁₂ или фолиевой кислоты.
- Анемия при цинге (дефиците витамина Т).

Б. Нарушения эритропоэза, не связанные с дефицитом веществ, необходимых для эритропоэза.

- Анемия, связанная с инфекциями, интоксикациями, почечной недостаточностью, болезнями печени, злокачественной диссеминацией (лейкозы и метастазы злокачественных опухолей в костный мозг).

- Апластическая анемия (врожденная и приобретенная).
 - Анемия, ассоциированная с микседемой или гипопитуитаризмом.
 - Миелодиспластический синдром.
 - Врожденная дисэритропоэтическая анемия .
3. Повышенное разрушение эритроцитов - гемолитическая анемия.
- Врожденная (наследственная).
 - Приобретенная.
4. Анемии смешанного генеза.

Гипергемоглобинемия - повышенное содержание гемоглобина по сравнению с нормой для пациента данного пола и возраста.

Причины

- Первичные:
 - истинная полицитемия (неопластическое миелопролиферативное заболевание).
- Вторичные.
 1. Твязанные с гипоксией:
 - а) сердечно-сосудистая патология, обычно врожденная, приводящая к значимому венозному сбросу;
 - б) заболевания легких, приводящие к снижению легочной перфузии, плохой аэрации легкого, легочной артериовенозной фистуле;
 - в) проживание в высокогорных районах;
 - г) гиповентиляция, связанная с ожирением (синдром Пиквика);
 - д) тип гемоглобина с повышением сродства к кислороду;
 - е) курение (обычно при выкуривании большого количества сигарет);
 - ж) метгемоглобинемия (редко).
 2. Неадекватная продукция эритропоэтина:
 - а) при доброкачественных/злокачественных опухолях почек, печени, центральной нервной системы, матки, яичников;
 - б) при заболеваниях почек (неопухолевых) - гидронефрозе, патологии сосудов, кистах.
 3. Твязанные с повышением в организме уровня кортикостероидов или андрогенов:
 - а) адреногиперкортицизм (все типы);
 - б) вирилизирующие опухоли;
 - в) прием андрогенных препаратов в терапевтических целях (изредка кортикостероидов).
 4. Хроническое химическое воздействие:
 - а) нитриты, сульфонамиды, другие соединения, вызывающие образование метгемоглобина и сульфгемоглобина;
 - б) кобальт, различные спирты.
 5. Относительные изменения в анализе крови:
 - а) стрессовая или ложная полицитемия;
 - б) дегидратация - недостаток воды, рвота.

Вопросы для подготовки к сдаче лабораторной работы:

1. Формы гемоглобина крови у человека в норме и при патологии. Методы гемоглобинометрии.
2. Границы колебаний содержания эритроцитов и гемоглобина в крови у здорового человека.
3. Причины снижения и увеличения содержания эритроцитов и гемоглобина в крови у человека.
 1. Определение понятия «анемия». Основные неспецифические и специфические клинико-гематологические признаки анемий.

2. Современная классификация анемий по механизму развития, степени тяжести, с учетом морфологических критериев (по цветовому показателю, величине эритроцитов, содержанию железа в сыворотке крови, типу эритропоэза) и регенераторной активности костного мозга.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕТАЛЬНОГО ГЕМОГЛОБИНА (2Ч)

Форма проведения – «решение проблемных ситуаций»

Качественная методика определения фетального гемоглобина в окрашенном мазке периферической крови

Принцип. Элюция гемоглобина кислотой.

Реактивы: 1) цитратно-фосфатный буфер, рН 3,2: 24,7 мл 0,2 М раствора натрия гидрофосфата ($35,6 \text{ г Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и дистиллированная вода до 1 л) и 75,3 мл 0,1 М раствора лимонной кислоты (21,01 г лимонной кислоты и дистиллированная вода до 1 л); 2) 1% раствор метилового фиолетового или 1% раствор эозина. Лучшие результаты дает окраска метиловым фиолетовым; 3) 80% этиловый спирт.

Ход определения. Для исследования используют свежеприготовленные мазки крови. Мазок фиксируют 10 мин в 80% этаноле, промывают дистиллированной водой и высушивают, затем помещают в ванночку с прогретым до 37 °С цитратно-фосфатным буфером на 30 мин, периодически размешивая буферный раствор стеклянной палочкой для удаления пузырьков воздуха. Мазок промывают водой, высушивают и окрашивают 1% раствором метилового фиолетового или эозина в течение 3 мин, вновь промывают дистиллированной водой, высушивают и исследуют под микроскопом.

Оценка результата. Нормальные эритроциты выглядят прозрачными. Эритроциты, содержащие фетальный гемоглобин, ярко окрашиваются.

Количественное определение фетального гемоглобина (методика Зингера)

Принцип. Использование повышенной устойчивости гемоглобина F к щелочам. С помощью щелочи денатурируют HbA, а содержание HbF определяют спектрофотометрически.

Реактивы: 1) 1/12 н. раствор гидроксида натрия, рН 12,7; хранят в парафинированном сосуде в холодильнике; 2) раствор сульфата аммония: 350 г сульфата аммония $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ растворяют в 500 мл дистиллированной воды, дают постоять и смешивают 400 мл этого раствора с равным объемом дистиллированной воды. Затем к 800 мл полунасыщенного раствора добавляют 2 мл 10 н. соляной кислоты; 3) 5% раствор цитрата натрия.

Ход определения.

Этап А. Приготовление гемолизата.

1. 1 мл крови вносят в пробирку с 3 мл 5% раствора цитрата натрия, центрифугируют 5 мин при 3000 об./мин, плазму удаляют. Центрифугирование повторяют 2-3 раза до полного обесцвечивания верхнего слоя.

2. К осадку эритроцитов добавляют равный объем дистиллированной воды. Тщательно перемешивают и центрифугируют 20 мин при 6000 об./мин. Отбирают верхний слой - гемолизат. Гемолизат может храниться при -20 °С в течение 6 месяцев и использоваться для количественного определения фетального гемоглобина или для электрофореза гемоглобина.

Этап В.

1. Пробирку с 3,2 мл 1/12 н. раствора гидроксида натрия помещают в водяную баню при 20 °С на 10 мин.

2. В эту же пробирку быстро вливают 0,2 мл гемолизата, быстро взбалтывают в водяной бане в течение 10 с.

3. Выдерживают еще 1 мин (по секундомеру), затем добавляют 6,8 мл раствора сульфата аммония.

4. Тщательно перемешивают (переворачивают пробирку до 6 раз).

5. Фильтруют смесь через двойной слой обеззоленных фильтров.

6. На фильтре остается гемоглобин А, в фильтрате содержится гемоглобин F.

7. В 1 мл дистиллированной воды разводят 0,2 мл гемолизата с приблизительной концентрацией 100 г/л (10 г/дл). Определяют общее содержание гемоглобина А + F на спектрофотометре при длине волны 541 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

8. Определяют экстинкцию фильтрата в тех же условиях, что и раствора общего гемоглобина.

9. Определяют экстинкцию контрольной пробы - смеси 3,2 мл раствора гидроксида натрия, 6,8 мл раствора сульфата аммония и 0,2 мл дистиллированной воды.

Расчет производят по формуле:

$$\text{HbF (\%)} = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \cdot 100,$$

где E_1 - экстинкция общего раствора гемоглобина; E_2 - экстинкция раствора гемоглобина F; E_3 - экстинкция контрольной пробы.

Ход определения.

Этап А. Приготовление гемолизата.

1. 1 мл крови вносят в пробирку с 3 мл 5% раствора цитрата натрия, центрифугируют 5 мин при 3000 об./мин, плазму удаляют. Центрифугирование повторяют 2-3 раза до полного обесцвечивания верхнего слоя.

2. К осадку эритроцитов добавляют равный объем дистиллированной воды. Тщательно перемешивают и центрифугируют 20 мин при 6000 об./мин. Отбирают верхний слой - гемолизат. Гемолизат может храниться при -20 °С в течение 6 месяцев и использоваться для количественного определения фетального гемоглобина или для электрофореза гемоглобина.

Этап В.

1. Пробирку с 3,2 мл 1/12 н. раствора гидроксида натрия помещают в водяную баню при 20 °С на 10 мин.

2. В эту же пробирку быстро вливают 0,2 мл гемолизата, быстро взбалтывают в водяной бане в течение 10 с.

3. Выдерживают еще 1 мин (по секундомеру), затем добавляют 6,8 мл раствора сульфата аммония.

4. Тщательно перемешивают (переворачивают пробирку до 6 раз).

5. Фильтруют смесь через двойной слой обеззоленных фильтров.

6. На фильтре остается гемоглобин А, в фильтрате содержится гемоглобин F.

7. В 1 мл дистиллированной воды разводят 0,2 мл гемолизата с приблизительной концентрацией 100 г/л (10 г/дл). Определяют общее содержание гемоглобина А + F на спектрофотометре при длине волны 541 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

8. Определяют экстинкцию фильтрата в тех же условиях, что и раствора общего гемоглобина.

9. Определяют экстинкцию контрольной пробы - смеси 3,2 мл раствора гидроксида натрия, 6,8 мл раствора сульфата аммония и 0,2 мл дистиллированной воды.

Расчет производят по формуле:

$$\text{HbF (\%)} = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \cdot 100,$$

где E_1 - экстинкция общего раствора гемоглобина; E_2 - экстинкция раствора гемоглобина F; E_3 - экстинкция контрольной пробы.

Клиническое значение. Причины повышения гемоглобина F у взрослого:

- первичные: бета-талассемия, наследственное персистирование HbF;
- вторичные: компенсаторное увеличение при гемолитических анемиях, железодефицитной анемии, апластической анемии, других гипоксических состояниях.

Определение фракций гемоглобина А так же, как и многих патологических гемоглобинов, производится *методом электрофореза*. HbA₂ отличается более медленной электрофоретической подвижностью.

Электрофорез гемоглобина осуществляется в приборе для электрофореза на пленках из ацетат-целлюлозы или в агаровом геле, согласно инструкциям к этим приборам.

В качестве субстрата используют гемолизат (техника приготовления описана выше). Электрофорез на ацетат-целлюлозе проводят при pH 8,6. Электрофорез в агаровом геле с использованием цитратного буфера осуществляют при pH 6,0.

Вопросы для подготовки к сдаче лабораторной работы:

1. Формы гемоглобина крови у человека в норме и при патологии. Методы гемоглобинометрии.
2. Морфологически идентифицируемые формы клеток эритроидного ряда.
3. Виды физиологического (нормобластического) эритропоэза – эффективный, терминальный, неэффективный. Критерии эффективности эритропоэза.
4. Морфологическая характеристика ретикулоцитов разных степеней зрелости и зрелых эритроцитов.
5. Функции эритроцитов (транспортная, регуляторная). Биохимические особенности эритроцитов.
6. Поверхностные антигены эритроцитов (полисахаридные и белковые). Механизмы разрушения эритроцитов.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 3 (2Ч)

Форма проведения – «решение проблемных ситуаций»

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ В КРОВИ

Принцип. Подсчет количества эритроцитов под микроскопом в определенном количестве квадратов счетной камеры и пересчет на 1 мкл или 1 л крови в соответствии с объемом и разведением крови.

Реактивы: разводящая жидкость - 0,9% раствор натрия хлорида или раствор Гайема: хлорид ртути II (HgCl₂) - 0,5 г; натрия сульфат (Na₂SO₄) - 5 г; натрия хлорид - 1 г; вода дистиллированная - до 200 мл.

Ход определения. Исследуемую кровь необходимо развести в 200 раз. Для этого в пробирку наливают 4 мл разводящей жидкости. В пипетку набирают 0,02 мл крови. Кончик пипетки вытирают фильтровальной бумагой или марлей, кровь выдувают на дно пробирки, а пипетку промывают верхним слоем жидкости, повторно набирая и выдувая ее в пробирку (пипетируя). Содержимое пробирки перемешивают и оставляют до исследования. Эритроциты рекомендуется считать с помощью счетной камеры не позднее 3 ч после взятия крови.

Устройство и подготовка к работе счетной камеры Горяева. Счетная камера Горяева (далее - камера) представляет собой толстое, прозрачное, прямоугольное стекло с двумя сетками, выгравированными на его поверхности. На боковых участках стекла нанесены основные показатели и название камеры. Сетки отделены друг от друга поперечной канавкой, что препятствует затеканию жидкости из одной сетки в другую при ее заполнении. Двумя глубокими продольными канавками сетки отделены от стеклянных прямоугольных пластинок, к которым притираются шлифованные покровные стекла. Поверхность этих пластинок находится на 0,1 мм выше участков камеры, на которые нанесена сетка. Сетка камеры Горяева образована системой разграничительных линий,

проведенных взаимно перпендикулярно. Она состоит из 3600 малых квадратов, сторона которых равна 0,05 (1/20) мм; высота камеры, создающаяся при притирании шлифованного покровного стекла, составляет 0,1 мм; площадь - 1/400 мм²; объем - 1/4000 мм³ (мкл); и 225 больших квадратов со стороной 1/5 мм; площадью 1/25 мм² и объемом 1/250 мм³ (мкл). Длина стороны всей сетки составляет 3 мм, площадь - 9 мм², объем - 0,9 мм³ (мкл).

Камеру перед работой тщательно моют водой, вытирают насухо; так же подготавливают шлифованное покровное стекло. Камеру Горяева берут в руку. На участок камеры, где нанесена сетка, укладывают шлифованное покровное стекло. Затем стекло берут и другой рукой, при этом нижняя поверхность камеры находится на двух средних пальцах, два вторых пальца придерживают ее спереди. Свободными двумя первыми пальцами притирают шлифованное покровное стекло, плавно продвигая его по поверхности прямоугольных стеклянных пластинок до появления цветных колец Ньютона в местах плотного прилегания (притирания) покровного стекла к поверхности прямоугольных пластинок камеры (это свидетельствует о высоте камеры - 0,1 мм).

Заполнение камеры Горяева. Заполняют счетную камеру разведенной кровью, предварительно несколько раз встряхнув содержимое пробирки. Затем пастеровской пипеткой или стеклянной палочкой с оплавленным концом отбирают каплю разведенной крови и подносят ее к щели, образующейся между шлифованным стеклом (покровным) и счетной камерой, жидкость заполняет пространство над сеткой. Обычно одну из сеток заполняют для подсчета эритроцитов, другую - для подсчета лейкоцитов. При заполнении камеры следят за тем, чтобы в пространстве над сеткой не было пузырьков воздуха и жидкость не затекала в бороздки.

Заполненную камеру оставляют в горизонтальном положении на 1 мин для оседания эритроцитов.

Подсчет клеток. Не меняя горизонтального положения, камеру помещают на столик микроскопа и с помощью малого увеличения (объектив 8х, окуляр 10х) находят верхний (дальний) левый край сетки (для лучшего контрастирования опускают конденсор и прикрывают диафрагму). Считают эритроциты в 5 больших квадратах, разделенных на 16 малых, т. е. в 80 малых квадратах. Рекомендуется считать клетки в квадратах, расположенных по диагонали сетки. Для того чтобы одни и те же эритроциты, лежащие на линиях, не попали в счет дважды, принято для каждого квадрата, кроме клеток, лежащих внутри квадрата, считать расположенные на двух определенных линиях (например, левой и верхней).

Расчет количества эритроцитов в 1 мкл крови производят по формуле:

$$X = \frac{\text{Число сосчитанных клеток} \times \text{Степень разведения}}{\text{Объем малого квадрата} \times \text{Число малых квадратов}};$$

$$X = \frac{a \cdot 4000 \cdot 200}{80} a \cdot 10^4,$$

где X - число эритроцитов в 1 мкл крови; a - число сосчитанных эритроцитов; 200 - степень разведения крови; 80 - число просчитанных малых квадратов; 1/4000 - объем малого квадрата в мкл.

Причины ошибок.

1. Неточность при взятии крови в пипетку.
2. Неудовлетворительная градуировка пипеток.
3. Образование сгустка крови.
4. Неправильное притирание покровного стекла камеры или недостаточная его толщина (менее 0,3 мм).
5. Подсчет сразу после заполнения камеры, когда клетки еще не успели осесть на дно.

6. Плохо вымытые и недостаточно высушенные пипетки и пробирки.
7. Недоброкачественность реактивов, вызывающая гемолиз.
8. Любое отклонение от правил подготовки камеры, ее заполнения и подсчета клеток.

Примечание. При гемолитических анемиях, В₁₂-дефицитной анемии подсчет эритроцитов следует осуществлять незамедлительно после взятия крови, так как они быстро разрушаются.

Вопросы для подготовки к сдаче лабораторной работы:

1. Современная схема кроветворения.
2. Стволовая кроветворная клетка (СКК). Полустволовые (частично детерминированные) кроветворные клетки, их свойства.
3. Характеристика клеток, относящихся к классу коммитированных (унипотентных) клеток-предшественниц гемопоэза, бластных клеток крови, клеток миело- и лимфопоэза, относящихся к классу созревающих клеток.
4. Зрелые клетки крови, их свойства.
5. Виды регуляция гемопоэза.
6. Теории пролиферации и дифференцировки СКК.
7. Роль гемопоэзиндуцирующего микроокружения в регуляции процессов кроветворения.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 4 (2ч)

Форма проведения – «решение проблемных ситуаций»

ТЕСТЫ НА СЕРПОВИДНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ. ГЕМАТОКРИТ.

Серповидные эритроциты возникают в результате присутствия аномального гемоглобина, который в состоянии дезоксигенации полимеризуется за счет гидрофобных связей. Ригидная основа гемоглобина S приводит к формированию ригидных серповидных клеток. Серповидно-клеточная аномалия встречается у 10 % лиц негроидной расы (гетерозиготная форма), но лишь немногие из них имеют анемию (гомозиготная форма). Тесты на серповидность эритроцитов основаны на том, что при понижении парциального давления кислорода гемоглобин S кристаллизуется в виде тактоидов, придавая эритроцитам форму серпа.

Методика влажных препаратов

Каплю свежезятой крови накрывают покровным стеклом, края заклеивают парафином или специальным клеем. Выдерживают при комнатной температуре и исследуют на присутствие серповидных клеток каждые 12 ч в течение 72 ч.

Методика Даланда и Да Слива

Принцип. Понижение содержания кислорода в препаратах с помощью редуцирующих веществ.

Реактивы: гидросульфит натрия (NaHSO₃) или аскорбиновая кислота: 2 г в 100 мл дистиллированной воды (свежеприготовленный раствор).

Ход определения. 1 каплю капиллярной крови на предметном стекле смешивают с 2 каплями любого из реагентов, накрывают покровным стеклом, края заклеивают.

Оценка результатов. Если через 4 ч серповидных форм не выявляется, тест считается отрицательным. При 10 % или больше серповидных форм эритроцитов тест считается положительным.

Вопросы для подготовки к сдаче лабораторной работы:

1. Гематокрит, его клиническое значение.
2. Метод определения гематокрита.

3. Индексы эритроцитов (цветовой показатель, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроците, средний объем эритроцита). Их клиничко-диагностическое значение, способы вычисления.
4. Границы колебаний гематокритной величины и эритроцитарных индексов у здорового человека.
5. Основные методы определения диаметра эритроцитов (прямой микроскопический, электронно-автоматические методы).

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 5 (2ч)

Форма проведения – «решение проблемных ситуаций»

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ

Морфологические исследования эритроцитов проводят в нативных препаратах и окрашенных мазках с помощью световых микроскопов.

Унифицированная методика приготовления мазков крови

Подготовка и обработка стекол. Новые чистые стекла могут использоваться после обезжиривания в смеси Никифорова (равные части 96% этилового спирта и эфира). Исползованные стекла замачиваются в течение суток в теплом мыльном растворе или растворе стирального порошка (1 столовая ложка порошка на 5 л воды). Через сутки раствор сливают, стекла промывают проточной водой. Затем их снова заливают теплым мыльным раствором или раствором стирального порошка и доводят до кипения, кипятят в этом же растворе 5-10 мин (не более, во избежание помутнения стекол). После охлаждения раствора его снова сливают, прополаскивают стекла проточной водой и каждое стекло промывают щеткой под проточной водой. Обработанные таким образом стекла раскладывают на чистой простыне для высыхания. Чистые стекла для обезжиривания помещают в смесь Никифорова или 96% этиловый спирт на 60 мин, затем вытирают насухо и хранят в чистой посуде с широким горлом. Чистые стекла рекомендуется брать либо пинцетом, либо руками за боковые края.

Приготовление мазков. На сухое подготовленное предметное стекло ближе к короткой стороне наносят стеклянной палочкой (или непосредственно из места укола пальца) небольшую каплю крови. Оставляют стекло в горизонтальном положении и размазывают кровь по стеклу с помощью сухого чистого шлифованного стекла, держа его под углом 45°. Коротким ребром, подождав, пока вся кровь не расплывется по нему, быстро проводят по предметному стеклу. Сильно нажимать на предметное стекло не следует, так как это может привести к повреждению форменных элементов крови. Мазки высушивают на воздухе и маркируют (лучше простым карандашом). Высохший мазок должен быть равномерно тонким, желтоватого цвета, достаточной величины, располагаться на расстоянии 1,0-1,5 см от краев стекла, занимать почти всю длину стекла и заканчиваться «метелочкой». Толстые (густо-розового цвета) мазки использовать не следует, так как в них морфология клеток трудноразличима.

Стандартные качественные мазки получаются при использовании автоматических устройств, предназначенных для приготовления мазков и выпускаемых различными фирмами.

Фиксация и окраска мазков крови. Перед окраской мазки крови обычно фиксируют 5-10 мин в метиловом спирте для предотвращения гемолиза, который может произойти при контакте с водой в процессе окрашивания водорастворимой краской или при последующем контакте с водой. Методики фиксации описаны ниже вместе с методиками окраски. Для окраски по Райту и Лейшману фиксация не требуется, так как эти краски содержат метиловый спирт.

Сухие мазки могут храниться в течение 2 дней в сухом теплом месте, в жаркой влажной атмосфере без фиксации они хранятся значительно меньше.

Клетки крови содержат базофильные и ацидофильные структуры, различающиеся по реакции (рН). Ядра являются базофильными и окрашиваются в голубой цвет. Высоко базофильные (кислые) гранулы базофила также синие. Гемоглобин (будучи основным) окрашивается ацидофильно, т. е. в красный цвет. Окраска с помощью комбинации кислых и основных красителей называется окраской по Романовскому и имеет различные модификации (Паппенгейма, Райта, Нохта, Лейшмана, Гимзы, Джейнера и др.). В качестве основного красителя, как правило, используется метиленовый синий, но также применяется и толуидиновый синий. В качестве кислого красителя используются эозин, азур I и азур II.

Критерии хорошей окраски: розовый цвет эритроцитов, фиолетовое окрашивание зернистости нейтрофилов на розовом фоне, нежная азурофильная зернистость моноцитов.

Для разведения краски лучше всего использовать нейтральную свежую дистиллированную воду. Несвежая дистиллированная вода становится кислой из-за захвата углекислого газа из атмосферы. Если дистиллированная вода имеет щелочную реакцию, эритроциты окрашиваются в грязный голубовато-зеленый цвет; та часть лейкоцитов, которая должна окрашиваться голубым цветом, приобретает фиолетовый оттенок, гранулы эозинофилов становятся голубоватыми и зеленоватыми вместо розовых, а гранулы нейтрофилов переокрашиваются. При кислой воде эритроциты окрашиваются в ярко-оранжевый цвет, а ядра лейкоцитов очень бледные. Идеальной является дистиллированная вода с рН 7,0, для сохранения которой применяется ее забуферивание. Можно использовать готовые к употреблению буферные таблетки, растворяемые в дистиллированной воде.

Для окраски мазков костного мозга идеальной является краска с рН 7,4-7,5.

В качестве унифицированных приняты *методики окраски по Нохту и Паппенгейму*.

Реактивы для фиксации: 1) метиловый спирт или 2) раствор эозин-метиленового синего по Маю-Грюнвальду.

Реактивы для окраски мазков по Нохту: 1) основной раствор азура II: 1 г краски растворяют в 1 л дистиллированной воды, оставляют в посуде из темного стекла на 12-14 дней при комнатной температуре, после чего используют; 2) основной раствор эозина калия: 1 г краски растворяют в 1 л дистиллированной воды, оставляют в посуде из темного стекла на 12-14 дней при комнатной температуре, после чего используют; 3) фосфатный буфер (смесь Вейзе), рН 7,4-7,5: смешивают 0,49 г дигидрофосфата калия (KH_2PO_4) и 0,909 г гидрофосфата натрия (Na_2HPO_4) и растворяют в 1 л дистиллированной воды; 4) рабочий раствор азурэозина: перед употреблением смешивают 25 мл основного раствора азура II, 20 мл основного раствора эозина калия и 55 мл буферного раствора (пропорции красителей могут варьировать, их устанавливают опытным путем при приготовлении свежих партий основных растворов).

Реактивы для окраски мазков по Паппенгейму: 1) раствор эозин-метиленового синего по Маю-Грюнвальду. При отсутствии готового раствора красителя его готовят растворением 1 г сухой краски в 1 л метилового спирта; 2) рабочий раствор азур-эозина по Нохту.

Фиксация мазков. Фиксирующий раствор наливают в кювету либо в широкогорлую посуду с притертой пробкой. Мазки помещают в контейнер, который погружают в кювету или кладут по одному в посуду на 5-10 мин. Контейнер со стеклами вынимают из фиксирующего раствора (или вынимают пинцетом стекла и устанавливают их в штативе) и оставляют на воздухе до полного высыхания.

Окраска по Нохту. Высохшие фиксированные мазки, не вынимая из контейнера, помещают в кювету с рабочим раствором краски на строго определенное время (20-45 мин), которое подбирают опытным путем для каждой партии краски. При отсутствии кюветы с контейнером стекла помещают горизонтально на параллельно положенные две стеклянные палочки («рельсы») мазком сверху и наливают на них по 3-4 мл рабочего

раствора краски. Вынимают контейнер со стеклами из кюветы с красителем и помещают в кювету с водопроводной водой (при отсутствии контейнеров краску со стекол смывают водой, не снимая их со стеклянных палочек). Мазки высушивают на воздухе.

Окраска по Паппенгейму. Сухие нефиксированные мазки крови помещают в контейнер и опускают в кювету с раствором Мая-Грюнвальда на 3-5 мин (или на нефиксированный мазок наливают пипеткой 3-4 мл красителя). Контейнер с мазками ополаскивают в кювете с дистиллированной водой, а затем помещают в кювету с азуроэозиновой краской по Нохту на 8-15 мин. На стекла, помещенные на «рельсы», не сливая краситель, добавляют на 1 мин дистиллированную воду, а затем на 8-15 мин наливают на мазок краску, затем краску смывают водой. Мазки высушивают на воздухе.

Окраска по Романовскому-Гимзе. Производится так же, как по Нохту. В качестве красителя используют готовый раствор Романовского-Гимзы, который перед употреблением разводят из расчета 1 капля краски на 1 мл дистиллированной воды. Время окраски устанавливают опытным путем для каждой партии красителя (25-40 мин).

Окраска по Райту. Реактивы: 0,2 г краски Райта (сухой порошок, BDH/E. Merck) растворяют в 100 мл метилового спирта и дают постоять несколько дней. Если эритроциты окрашиваются недостаточно четко, готовят 0,25% или 0,3% раствор.

Ход окраски. На мазок наносят несколько (примерно 8) капель краски, выдерживают 2-3 мин (следят, чтобы краска не высохла), затем наливают на мазок равное количество забуференной воды. Если краска созрела, на поверхности разведенной краски появится пена или пленка с металлическим блеском. Разведенную краску оставляют на мазке на 2-3 мин, а затем смывают буферным раствором или водой. Нельзя допускать, чтобы краска осаждалась на поверхности мазка. Если это произошло, мазок заливают неразведенной краской на 15-20 с и затем еще раз буферным раствором или водой.

Приготовление фосфатного буфера.

Раствор А (0,2 М KH_2PO_4): 27,2 г соли растворить в 1 л дистиллированной воды.

Раствор Б (0,2 М Na_2HPO_4): 35,6 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ растворить в 1 л дистиллированной воды.

Для получения 100 мл буферного раствора с нужным рН следует слить растворы А и Б в количествах, указанных в табл. 13.2. Величину рН проверяют с помощью рН-метра.

Окраска по Лейшману. Реактивы: 0,15 г сухой краски Лейшмана растворяют в 133 мл абсолютного метилового спирта. Краска должна полностью раствориться, желателно предварительно кристаллы краски растереть в ступке. Хранят краску в бутылки со стеклянной пробкой, не фильтруют.

Таблица 13.2 Приготовление фосфатного буферного раствора

Раствор, мл	Величина рН						
	6,0	6,5	7,0	7,2	7,4	7,6	8,0
а	87, 9	68, 7	48, 8	27, 4	18, 2	11, 5	3,1
б	12, 1	31, 3	51, 2	72, 6	81, 8	88, 5	96, 9

Ход окраски. Осуществляют подобно окраске по Райту, но с двойным разведением буферного раствора. Несколько капель краски (около 8) наливают на мазок, выдерживают 2 мин. Добавляют двойное количество буферного раствора (16 капель), размешивают покачиванием и оставляют на 7-10 мин. Краску смывают дистиллированной водой за 2-3 секунды. При более длительном смывании окраска ухудшается. Мазки высушивают в штативе на воздухе.

Приготовление толстой капли крови. Три капли крови, нанесенные на предметное стекло на некотором расстоянии друг от друга, расширяют углом чистого предметного

стекла до размера в диаметре примерно 1 см, маркируют карандашом, затем подсушивают на воздухе в течение 1-2 ч.

Окраска толстой капли крови. Толстые капли крови не фиксируют. Предметные стекла с хорошо просушенными толстыми каплями располагают на «рельсах» на некотором расстоянии друг от друга и на 8-10 мин наливают на них рабочий раствор азур-эозина по Нохту. Происходит «выщелачивание» эритроцитов. Затем краску сливают и на препараты наливают новую порцию рабочего раствора азур-эозина по Нохту на 30-35 мин. После этого предметные стекла осторожно ополаскивают дистиллированной водой и высушивают.

Вопросы для подготовки к сдаче лабораторной работы:

1. Морфологически идентифицируемые формы клеток эритроидного ряда.
2. Виды физиологического (нормобластического) эритропоэза – эффективный, терминальный, неэффективный. Критерии эффективности эритропоэза.
3. Морфологическая характеристика ретикулоцитов разных степеней зрелости и зрелых эритроцитов.
4. Функции эритроцитов (транспортная, регуляторная). Биохимические особенности эритроцитов.
5. Поверхностные антигены эритроцитов (полисахаридные и белковые). Механизмы разрушения эритроцитов.
6. Причины патологического внутрисосудистого и внутриклеточного гемолиза.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 6 (2ч)

Форма проведения – «решение проблемных ситуаций»

СКОРОСТЬ ОСЕДАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ (ERYTHROCYTE SEDIMENTATION RATE, ESR).

Скоростью оседания эритроцитов называется скорость разделения несвернувшейся крови на два слоя: нижний, состоящий из осевших эритроцитов, и верхний - из прозрачной плазмы. Исследование СОЭ - один из самых распространенных методов в лабораторной практике и входит в состав общего клинического анализа крови.

Унифицированная микрометодика Панченкова

Принцип. Свойство крови, смешанной с цитратом натрия, не свертываться при стоянии, а разделяться на два слоя: нижний - эритроциты, верхний - плазма. Расслоение происходит с различной скоростью в зависимости от изменения химических и физических свойств крови. Скорость оседания измеряется в мм за 1 ч.

Реактив. 5% раствор трехзамещенного цитрата натрия ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 5H_2O$). Раствор фильтруют. Показатель pH раствора должен быть нейтральным или слабощелочным. Помутневший раствор для употребления не пригоден.

Специальное оборудование: аппарат Панченкова, состоящий из штатива с гнездами и капилляров с просветом канала в 1 мм. На капиллярах нанесена миллиметровая шкала длиной 100 мм. Верхнее деление шкалы отмечено цифрой 0 и буквой К (кровь). Через каждые 10 делений имеются цифры 10, 20, 30 и так далее до 100. Против деления 50 имеется буква Р (реактив). Отверстия концов капиллярных пипеток, вставленных в прибор, герметически закрываются резиновыми пробками. Капиллярные пипетки и пробирки должны быть химически чистыми.

Ход определения. Капиллярные пипетки предварительно промывают 5% раствором цитрата натрия, набрав его до метки Р и вылив в пробирку. Затем тем же капилляром из пальца набирают два раза кровь до метки К, каждый раз выливая ее в ту же пробирку (с антикоагулянтом). Получают соотношение раствора цитрата натрия и крови 1 : 4. Хорошо перемешивают, затем смесь набирают в капилляр до отметки 0. Закрыв пальцем верхний

конец капилляра, осторожно, чтобы кровь из капилляра не вылилась, устанавливают капилляр в штативе строго вертикально, упирая нижний его конец в резиновую прокладку и прижимая верхний конец прокладкой или пробкой. Через 1 ч отмечают скорость оседания эритроцитов по высоте отстоявшегося слоя плазмы в миллиметрах.

Нормальные величины. У здоровых мужчин 1-10 мм/ч, у женщин 2-15 мм/ч.

Примечание. При температуре воздуха в помещении, где проводится определение, ниже 20 °С СОЭ снижается, выше 20 °С - увеличивается.

Клиническое значение. Одна из основных причин увеличения СОЭ - изменение соотношения между белковыми фракциями крови в сторону увеличения доли крупнодисперсных белков. Играет роль и соотношение между холестерином и лецитином. Уменьшение количества эритроцитов также ведет к увеличению ТОЭ. Наиболее частые причины увеличения ТОЭ - воспалительные заболевания самой различной этиологии (пневмония, сепсис, холецистит), а также острые и хронические инфекции (туберкулез, инфекционный мононуклеоз, краснуха), инфаркт миокарда, анемии, оперативные вмешательства, беременность, гипопроотеинемии. Особенно значительные величины ТОЭ отмечены при парапротеинемических гемобластозах (до 60-80 мм/ч) и симптоматических парапротеинемиях, сопутствующих злокачественным новообразованиям (особенно при распаде опухоли), хроническому активному гепатиту, циррозу печени, системным заболеваниями соединительной ткани.

Снижение СОЭ наблюдается при истинной полицитемии, гиперпротеинемии, механической желтухе, вирусном гепатите и симптоматических эритроцитозах.

Вопросы для подготовки к сдаче лабораторной работы:

1. Определение понятий «осмотическая резистентность эритроцитов» (ОРЭ), «верхняя граница», «нижняя граница», «амплитуда» и «зона» резистентности эритроцитов. Пределы колебаний верхней и нижней границ ОРЭ у здорового человека. Факторы, влияющие на ОРЭ.
2. Методы определения ОРЭ. Механизм оседания эритроцитов.
3. Величина реакции оседания эритроцитов (РОЭ) в норме. Факторы, обуславливающие угнетение и активацию РОЭ.
4. Макро- и микрометоды исследования РОЭ. Источники ошибок при оценке РОЭ. Клинико-диагностическое значение определения ОРЭ и РОЭ.

Раздел 2. Форменные элементы крови

Тема 4. Морфофункциональная характеристика клеток белой крови в норме и при патологии. Кинетика лейкоцитов. Патологические формы лейкоцитов.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 7 (2ч)

Форма проведения – «решение проблемных ситуаций»

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ЛЕЙКОЦИТОВ

Количество лейкоцитов зависит от многих причин. Это и внешние факторы, такие как время суток, сезон, изменения климата и метеорологических условий. Это и прием лекарственных препаратов, влияние диагностических процедур, физиологическое состояние организма (возраст, пол, беременность, фазы менструального цикла, прием пищи, воздействия тепла или холода, физических нагрузок); а также патологические изменения в организме. Для того чтобы убедиться в стойкости изменений числа лейкоцитов, необходимо выполнять повторные исследования. Исследования целесообразно проводить не только при наличии признаков заболевания, но и у практически здоровых людей при профилактических осмотрах.

Унифицированная методика подсчета в счетной камере Горяева.

Принцип. Подсчет лейкоцитов при микроскопии в определенном числе квадратов счетной камеры и расчет их количества в 1 л крови с учетом разведения крови и объема счетной камеры.

Реактив: 3-5% раствор уксусной кислоты, подкрашенный для окраски ядер лейкоцитов несколькими каплями раствора метиленового синего. Раствор имеет голубой цвет, может длительно храниться.

Ход определения. В сухую пробирку наливают 0,4 мл раствора уксусной кислоты. Из пальца набирают 0,02 мл крови (можно использовать стабилизированную антикоагулянтном венозную кровь). Вытирают кончик пипетки, затем выдувают из нее кровь на дно пробирки, перемешивают, повторно набирая и выдувая смесь крови и реактива (пипетируя). Маркируют пробирку и оставляют ее до момента подсчета. Хранить смесь крови с раствором уксусной кислоты рекомендуется не более 2-4 ч.

Кровь, разведенную в пробирке уксусной кислотой, тщательно перемешивают и заполняют ею счетную камеру. Заполненную камеру оставляют в горизонтальном положении на 1 мин для оседания лейкоцитов. Не меняя горизонтального положения камеры, помещают ее на столик микроскопа и при малом увеличении (окуляр 10х, объектив 8х) подсчитывают лейкоциты в 100 больших квадратах, что соответствует 1600 малым.

Для большей точности лейкоциты считают по всей сетке в больших квадратах, не разделенных на малые квадраты и полосы, начиная с верхнего левого угла сетки. Для лучшего контрастирования затемняют поле зрения, опуская конденсор и закрывая диафрагму. Считают клетки, расположенные внутри квадрата и лежащие на любых двух линиях, чтобы дважды не подсчитывать одну и ту же клетку.

Расчет числа лейкоцитов проводят по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 250 \cdot 20}{100} a \cdot 50,$$

где X - число лейкоцитов в 1 мкл крови; а - число лейкоцитов в 100 больших квадратах; 20 - разведение крови; 100 - число больших квадратов; 250 - коэффициент пересчета на 1 мкл, так как объем одного большого квадрата равен 1/250 мкл (сторона квадрата - 1/5 мм, высота - 1/10 мм).

На практике для расчета количества лейкоцитов в 1 мкл крови их число в 100 больших квадратах умножают на 50, а в 1 л - полученную величину умножают на 10⁶.

Примечание. При подсчете лейкоцитов неизбежна ошибка в 6-8 % случаев.

Причины ошибок.

1. При большом количестве нормоцитов в периферической крови их засчитывают в число лейкоцитов (и лейкоциты, и нормоциты - ядродержащие клетки). Для того чтобы правильно установить количество лейкоцитов, из общего числа ядродержащих клеток крови следует вычесть количество нормоцитов.

2. Остальные ошибки аналогичны тем, которые возникают при подсчете в счетной камере количества эритроцитов.

Клиническое значение. В основе *повышения* количества лейкоцитов (лейкоцитоза) могут лежать различные патофизиологические механизмы, связанные с увеличением продукции, повышенной мобилизацией костномозгового резерва, а также перераспределением пристеночного пула. Перераспределительный лейкоцитоз обусловлен тем, что в сосудистом русле существует два пула лейкоцитов: пристеночный, или маргинальный, и циркулирующий. В связи с этим лейкоцитоз может развиваться вследствие поступления лейкоцитов из пристеночного пула или из органов, служащих для них депо. Это часто наблюдается при различных физиологических состояниях (физиологический лейкоцитоз): физические нагрузки (миогенный лейкоцитоз); пищеварительный лейкоцитоз (через 2-3 ч после приема пищи, особенно богатой белком); беременность (особенно вторая

половина); эмоциональный стресс; введение некоторых лекарственных препаратов (адреналин, кортикостероиды).

Наиболее частые причины патологического лейкоцитоза - большинство острых инфекционных заболеваний (кроме брюшного тифа, бруцеллеза и вирусных инфекций); воспалительные заболевания (крупозная пневмония, тонзиллит, экссудативный плеврит, перикардит); гнойные процессы (сепсис, рожистое воспаление, менингит, аппендицит, перитонит, эмпиема плевры); инфаркты различных органов (миокарда, селезенки, легких); обширные ожоги (лейкоцитоз вызывается всасыванием продуктов тканевого распада и присоединением вторичной инфекции); интоксикации; уремия; диабетическая кома; шок; острые кровопотери (постгеморрагический лейкоцитоз вследствие гипоксемии); гемолитический криз; почечная колика; аллергические реакции; в ряде случаев - злокачественные новообразования, особенно при распаде опухоли. Умеренный лейкоцитоз может наблюдаться при истинной полицитемии, при злокачественных лимфомах с поражением костного мозга, иногда при острых лейкозах, в начальных стадиях хронических лейкозов. Значительное повышение числа лейкоцитов (более $200 \cdot 10^9/\text{л}$) имеет место при хроническом миелолейкозе и хроническом лимфолейкозе.

Снижение количества лейкоцитов - лейкопения. Причины лейкопений перечислены ниже:

1. Недостаточность кроветворения в костном мозге (лейкопении центрального генеза) в результате гибели стволовых клеток (некоторые формы острого лейкоза, лучевая болезнь, хроническая интоксикация бензолом, метастазирование новообразований в костный мозг), жирового перерождения костного мозга (апластическая анемия) или развития соединительной ткани (хронический миелофиброз). К развитию лейкопений центрального генеза приводит воздействие ионизирующей радиации, бензола, прием некоторых лекарственных препаратов (производные пипразолона, нестероидные противовоспалительные препараты; антибиотики, особенно левомецетин; сульфаниламидные препараты, препараты золота, цитостатические средства и др.).

2. При сохраненном кроветворении может быть нарушен выход лейкоцитов из костного мозга в периферическую кровь (синдром «ленивых лейкоцитов»).

3. При сохраненном кроветворении количество лейкоцитов снижается в результате их усиленного разрушения в кровеносном русле или при увеличении пристеночного пула (перераспределительные лейкопении). К развитию периферических лейкопений приводят некоторые заболевания, протекающие со спленомегалией и синдромом гиперспленизма (хронический активный гепатит, цирроз печени, туберкулез селезенки, болезнь Гоше, синдром Фелти). Функциональные лейкопении наблюдаются при гипотонических состояниях, упадке общего тонуса, голодании. Лейкопении развиваются при вирусных и бактериальных инфекциях (брюшной тиф, грипп, малярия, бруцеллез, вирусный гепатит, корь, краснуха), а также при аутоиммунных заболеваниях (системная красная волчанка).

Вопросы для подготовки к сдаче лабораторной работы:

1. Морфологически идентифицируемые формы клеток грануломоноцитарного и лимфоидного рядов.
2. Виды лейкоцитов периферической крови. Морфологические свойства палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, больших гранулированных, средних, малых лимфоцитов, плазмочитов, моноцитов (внешний диаметр, особенности ядра и цитоплазмы).
3. Кинетика, цитохимические маркеры, функции и признаки активации нейтрофильных, эозинофильных, базофильных гранулоцитов, моноцитов, лимфоцитов. Патологические формы лейкоцитов.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 8 (2ч)

Форма проведения – «решение проблемных ситуаций»

ЛЕЙКОЦИТАРНАЯ ФОРМУЛА. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФОРМУЛЫ.

Лейкоцитарную формулу - процентное соотношение различных видов лейкоцитов - подсчитывают в окрашенных мазках крови.

Унифицированная методика морфологического исследования форменных элементов крови с дифференцированным подсчетом лейкоцитарной формулы

Принцип. Микроскопия сухих фиксированных и окрашенных мазков крови с дифференцированием различных форм лейкоцитов.

Подготовка предметных стекол, приготовление мазков крови, их фиксация и окраска описаны ранее при исследовании морфологии эритроцитов.

Реактивы: 1) иммерсионное масло; 2) диэтиловый эфир.

Специальное оборудование: 1) микроскоп; 2) 11-клавишный счетчик для подсчета лейкоцитарной формулы.

Ход исследования. Предметное стекло с окрашенным, высохшим на воздухе мазком крови помещают на столик микроскопа и с помощью малого увеличения (окуляр 7х, объектив 8х) находят край мазка. Не меняя положения стекла, наносят каплю иммерсионного масла на край мазка на место, расположенное под объективом. Переводят иммерсионный объектив (90 х) в вертикальное по отношению к мазку положение, при этом объектив погружается в каплю масла.

Осторожно вращают макровинт до появления в поле зрения микроскопа изображения. Затем с помощью микровинта устанавливают четкую видимость препарата. Критерием правильно подобранного для каждого глаза фокусного расстояния будет ясное изображение клеток с четкими границами и внутриклеточной структурой.

Приступают к дифференцированию лейкоцитов, отмечая клетки с помощью 11-клавишного счетчика. Необходимо просчитывать не менее 100 лейкоцитов. Если при исследовании выявляется какой-либо патологический процесс, то изучению подлежат 200-400 и даже более лейкоцитов.

При выраженных лейкопениях, особенно при содержании в 1 мкл крови менее 1000 лейкоцитов, можно считать 50 клеток и полученный результат умножить на 2.

В связи с тем, что более крупные виды клеток (моноциты, нейтрофилы, миелобласты и др.) располагаются больше по периферии, вдоль верхнего и нижнего краев мазка, а более мелкие (лимфоциты, микромиелобласты и др.) - ближе к его центру, подсчет клеток производят всегда по одной и той же схеме. Половину клеток считают на одном конце мазка, а другую - на противоположном. Счет ведут по зигзагу (линия «меандра»): отступив 3-4 поля зрения по краю мазка, затем 3-5 полей зрения под прямым углом к середине мазка, затем проводят счет в 3-5 полях зрения параллельно краю мазка и возвращаются к краю мазка, где просчитывают 3-5 полей зрения. Такое движение при счете продолжают до тех пор, пока не сосчитают половину клеток, а затем переходят на противоположный край, где подсчитывают вторую половину клеток.

Клиническое значение изменений лейкоцитарной формулы

Исследование лейкоцитарной формулы имеет большое значение в диагностике большинства гематологических заболеваний для оценки тяжести состояния и эффективности проводимой терапии. Изменения лейкоцитарной формулы имеют место при целом ряде заболеваний, порой они являются неспецифическими. Например, выявление большого числа бластных форм свидетельствует об остром лейкозе. При исследовании дифференциальной формулы одним из гематологических показателей является сдвиг влево или вправо, указывающий на степень изменения функций костного мозга.

Увеличение числа нейтрофилов (нейтрофилез, или нейтроцитоз), как правило, сочетается с увеличением общего числа лейкоцитов в крови. Нейтрофильный лейкоцитоз развивается вследствие увеличения продукции нейтрофилов, повышенной мобилизации костномозгового резерва или перераспределения пристеночного пула. Острые инфекционные заболевания и воспалительные процессы способствуют мобилизации костномозгового резерва и пристеночного пула нейтрофилов в периферической крови. Количество нейтрофилов при этом может увеличиваться до $25-30 \cdot 10^9/\text{л}$. Повышенная продукция нейтрофилов связана также с хроническими миелопролиферативными заболеваниями. Кортикостероиды стимулируют выведение нейтрофилов из костного мозга. Выделение адреналина при стрессовых ситуациях может привести к мобилизации пристеночного пула и удвоению количества нейтрофилов в периферической крови.

Увеличение количества сегментоядерных и палочкоядерных нейтрофилов встречается значительно чаще, чем сегментоядерных. Могут также появляться незрелые формы гранулоцитов (миелоциты, метамиелоциты). Сдвиг лейкоцитарной формулы влево - увеличение количества незрелых нейтрофилов в периферической крови: миелоцитов, метамиелоцитов, палочкоядерных нейтрофилов.

Степень зрелости ядер нейтрофилов определяется индексом сдвига ядер. Индекс сдвига ядер (ИС) вычисляют по формуле:

$$\text{ИС} = \frac{\text{Миелоциты} + \text{Метамиелоциты} + \text{Палочкоядерные сегментоядерные}}{\text{Сегментоядерные}}.$$

В норме ИС составляет 0,06.

При острых воспалительных процессах (крупозная пневмония), сепсисе, метастазах злокачественных опухолей в костный мозг, интоксикациях, шоке, кровотечениях, инфаркте миокарда, гемолитическом кризе, туберкулезе, некоторых инфекционных заболеваниях (скарлатина, рожистое воспаление, дифтерия) довольно часто наблюдается реактивный сдвиг лейкоцитарной формулы влево - лейкомоидные реакции по миелоидному типу. Максимальной степени эти изменения достигают при миелопролиферативных заболеваниях, особенно при хроническом миелолейкозе. Резко увеличивается и общее количество лейкоцитов (до $50-100 \cdot 10^9/\text{л}$ и более), в лейкоцитарной формуле в значительном количестве определяются промиелоциты, миелоциты, метамиелоциты и даже бласты. Степень изменений зависит от стадии заболевания. Число зрелых нейтрофилов при этом уменьшается.

Уменьшение нормального количества палочкоядерных нейтрофилов и увеличение числа сегментоядерных нейтрофилов с гиперсегментированными ядрами называют сдвигом лейкоцитарной формулы вправо. Сдвиг вправо наблюдается при V_{12} - и фолиеводефицитных анемиях, истинной полицитемии.

Снижение числа нейтрофилов (нейтропения) обычно сочетается с лейкопенией и наблюдается при вирусных инфекциях, хронических воспалительных заболеваниях, гемобластозах (в результате гиперплазии опухолевых клеток и редукции нормального гемопоэза), после приема некоторых лекарственных препаратов, особенно цитостатиков, и лучевой терапии. Резкое снижение количества нейтрофилов может привести к угрожающим жизни инфекционным осложнениям. Риск развития инфекции возрастает при снижении количества нейтрофилов менее $1,0 \cdot 10^9/\text{л}$; при нейтропии менее $0,2 \cdot 10^9/\text{л}$ проявления воспалительного процесса, как правило, отсутствуют.

Тяжелая степень нейтропии приводит к развитию агранулоцитоза. Агранулоцитоз - клинико-гематологический синдром, характеризующийся снижением количества нейтрофильных гранулоцитов в крови менее $0,45 \cdot 10^9/\text{л}$. К развитию агранулоцитоза приводят прием некоторых препаратов (производные пипразолона, нестероидные противовоспалительные препараты, антибиотики, особенно левомецетин, сульфаниламидные препараты, препараты золота, цитостатические средства); воздействие

ионизирующей радиации, токсических агентов (бензол) и алиментарно-токсических факторов (употребление в пищу испорченных перезимовавших злаков и др.).

Увеличение числа эозинофилов (эозинофилия) наблюдается при аллергических заболеваниях (бронхиальная астма, эозинофильный гранулематозный васкулит); аллергических реакциях на продукты питания, лекарственные препараты; при глистных инвазиях. Умеренная эозинофилия отмечается при лимфогранулематозе: у 20 % больных содержание эозинофилов колеблется от 6 до 20 %, у 3 % больных достигает 80-90 %; при опухолях; некоторых детских инфекциях (скарлатина, ветряная оспа). Эозинофилия различной степени отмечается при хроническом миелолейкозе.

Эозинопения и анэозинофилия наблюдаются в начальном периоде острых инфекций, при воспалительных процессах, инфаркте миокарда. Появление эозинофилов в крови в этих случаях является благоприятным прогностическим признаком.

Увеличение количества базофилов (базофилия) встречается редко и вместе с эозинофилией может быть признаком миелопролиферативного заболевания - эозинофильно-базофильная ассоциация при хроническом миелолейкозе. Базофилия может иметь место после лечения железодефицитных анемий, при В₁₂-дефицитной анемии, гипотиреозе, нефрите, сахарном диабете, остром гепатите с желтухой, в начале менструаций.

Наследственные аномалии лейкоцитов

Пельгеровская аномалия (пельгеровский семейный вариант лейкоцитов) (Кост Е. А., 1975) - это изменение крови, наследуемое по доминантному типу, при котором нарушается процесс сегментации ядер нейтрофильных лейкоцитов: форма лейкоцита остается юной, похожей на метамиелоцит, а ядро уже «старое», созревшее. Структура ядер пельгеровских лейкоцитов грубоглыбчатая, пикнотическая. Большинство пельгеровских нейтрофилов имеют однодолевое, несегментированное ядро, по форме сходное с палочкоядерными клетками, что приводит к лабораторным ошибкам и гипердиагностике палочкоядерного сдвига. Ядро пельгеровских лейкоцитов может иметь вид эллипса, окружности, боба или почки, но короче, чем у обычных нейтрофилов. Реже наблюдаются ядра с намечающейся перетяжкой посередине, напоминающие по форме гимнастическую гирию или земляной орех. Пельгеровские особенности - короткие перемычки и комковатое строение ядра. Встречаются двусегментированные ядра, трехсегментированные ядра почти не наблюдаются. Могут обнаруживаться нейтрофилы с круглыми ядрами, напоминающими по форме миелоциты, однако их особенная грубоглыбчатая, пикнотическая структура не позволяет отнести эти нейтрофилы к миелоцитам. Некоторые пельгеровские нейтрофилы имеют крупную, обильную зернистость, в других случаях зернистость мелкая, скудная.

В базофилах, эозинофилах, моноцитах и лимфоцитах описанные выше изменения при пельгеровской аномалии встречаются реже и менее выражены.

По способности к фагоцитозу, содержанию ферментов, длительности жизни пельгеровские нейтрофилы не отличаются от нормальных зрелых нейтрофилов.

Изменения нейтрофилов, сходные с пельгеровской аномалией, могут возникнуть и как вторичное явление (псевдопельгеровская аномалия) при некоторых заболеваниях - острые кишечные инфекции, агранулоцитоз, лейкозы. Такие изменения носят временный, преходящий характер, после выздоровления псевдопельгеровские лейкоциты исчезают.

Для уточнения диагноза пельгеровской аномалии необходимо исследовать кровь родителей пациента, что позволит избежать гипердиагностики сдвига лейкоцитарной формулы влево.

Асегментация ядер гранулоцитов, вариант Штодмейстера (Кассирский И. А., Алексеев Г. И., 1970). В отличие от типично пельгеровских кругло-ядерных нейтрофилов с грубоглыбчатой, фрагментированной структурой и четкими контурами ядер, ядра клеток Штодмейстера характеризуются менее выраженной конденсацией хроматина и своеобразной бахромчатостью, состоящей из нежных хроматиновых нитей, как бы

выступающих из основного ядерного массива в цитоплазму. Клетки Штодмейстера - вполне зрелые формы нейтрофильного ряда. Феномен асегментации ядер отмечается также в эозинофилах и базофилах, но отсутствует в моноцитах.

Врожденная гиперсегментация ядер нейтрофилов (Кост Е. А., 1975). В этом случае преобладают нейтрофилы с четырьмя и более сегментами ядер. Морфологическая картина напоминает гиперсегментацию нейтрофилов при мегалобластных анемиях.

Врожденная гиперсегментация ядер эозинофилов (Кост Е. А., 1975). Отмечается увеличение числа эозинофилов с тремя ядерными сегментами. Иногда выявляется и сегментация ядер моноцитов.

Вопросы для подготовки к сдаче лабораторной работы:

1. Понятие и классификация регенеративных и дегенеративных патологических форм лейкоцитов.
2. Основные методы определения ОКЛ в периферической крови. Источники ошибок при подсчете ОКЛ в счетной камере Горяева. Границы колебаний ОКЛ в периферической крови у здорового человека и лабораторных животных.
3. Изучение морфологии различных морфологических форм лейкоцитов периферической крови у здорового человека и лабораторных животных.
4. Лейкоцитарная формула, ее клинико-диагностическое значение.

Раздел 2. Форменные элементы крови

Тема 5. Морфофункциональная характеристика тромбоцитов в норме и при патологии. Кинетика тромбоцитов. Понятие о гемостазе. Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз (СТГ).

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 9 (3ч)

Форма проведения – «решение проблемных ситуаций»

МЕТОДИКИ ПОДСЧЕТА КОЛИЧЕСТВА ТРОМБОЦИТОВ. ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИИ ТРОМБОЦИТОВ. АДГЕЗИВНАЯ ФУНКЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ.

Унифицированная методика подсчета количества тромбоцитов в счетной камере Горяева

Принцип. Подсчет числа тромбоцитов в разведенной крови в счетной камере с применением фазово-контрастного устройства и расчет их количества в 1 мкл или 1 л крови.

Реактивы: 1) реактив 1: кокаина гидрохлорид - 3 г; натрия хлорид - 0,25 г; фурацилин - 0,25 г; дистиллированная вода - 100 мл; 2) реактив 2: 1% раствор оксалата аммония. Раствор кипятят и фильтруют, хранят в холодильнике.

Наиболее быстрый и полный лизис эритроцитов вызывает 1% раствор оксалата аммония.

Ход определения. Для подсчета тромбоцитов предпочтительнее использовать венозную кровь. В качестве антикоагулянта рекомендуется применять ЭДТА (этилендиаминтетраацетат натрия). При взятии капиллярной крови из пальца высока вероятность агрегации тромбоцитов. Перед исследованием необходимо убедиться в отсутствии сгустков крови.

Исследуемую кровь разводят в 200 раз, для этого в сухую пробирку набирают 4 мл реактива 1 или 2 и 0,02 мл крови. Перемешивают и оставляют на 25-30 мин для гемолиза эритроцитов. Подготавливают камеру Горяева и заполняют ее предварительно перемешанной разведенной кровью (см. «Подсчет эритроцитов, лейкоцитов»). Счетную камеру помещают во влажную среду (чашка Петри с уложенной по краям смоченной водой фильтровальной бумагой) на 5 мин для оседания тромбоцитов. Используя объектив

40х с фазово-контрастным устройством, производят подсчет тромбоцитов в 25 больших квадратах счетной камеры.

Тромбоциты выглядят в счетной камере как мелкие, хорошо преломляющие свет образования.

Расчет числа тромбоцитов в 1 мкл крови проводят по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 200}{25 \cdot 250^{-1}} = \frac{a \cdot 250 \cdot 200}{25} = a \cdot 2000,$$

где X - число тромбоцитов в 1 мкл крови; a - число тромбоцитов, сосчитанных в 25 больших квадратах счетной камеры; 200 - разведение крови; 25 - число больших квадратов; $250^{-1}(1/250)$ - объем одного большого квадрата, так как сторона квадрата равна 5^{-1} мм, а высота - 10^{-1} мм.

На практике число сосчитанных тромбоцитов умножают на 2000. При пересчете на 1 л крови умножают еще на 10^6 .

Примечание. Вся используемая стеклянная посуда и камера Горяева должны быть тщательно вымыты, иначе грязевые и пылевые частицы, сходные по размеру с тромбоцитами, могут быть ошибочно учтены при подсчете.

Унифицированная методика подсчета тромбоцитов в мазках крови по Фонио (A. Fonio)

Принцип. Подсчет количества тромбоцитов на 1000 эритроцитов в окрашенных мазках крови и перерасчет их числа на 1 мкл или 1 л, в соответствии с количеством эритроцитов в этом объеме крови.

Реактивы: 1) 14% раствор сульфата магния; 2) 2,6% раствор этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА).

Ход определения. В пробирку вносят реактив 1 или 2, взятый капилляром Панченкова до отметки «75», затем добавляют кровь, взятую тем же капилляром до отметки «К (0)». Содержимое пробирки перемешивают и готовят тонкие мазки. Фиксируют и окрашивают по Романовскому-Гимзе (см. «Окраска мазков крови») в течение 2-3 ч (при использовании реактива 1) или 35-45 мин (при использовании реактива 2).

Высохшие мазки микроскопируют с иммерсионным объективом, подсчитывая тромбоциты в тонких местах препарата (эритроциты должны располагаться изолированно друг от друга). Тромбоциты окрашиваются в розовато-фиолетовый цвет, имеют округлую форму, размер 2-4 мкм, в центре клетки отчетливо определяется зернистость - грануломер, периферическая часть имеет более светлую окраску, незернистая - гиаломер.

Подсчет производят следующим образом. В каждом поле зрения микроскопа считают число эритроцитов и тромбоцитов, передвигая мазок до тех пор, пока не будут просчитаны 1000 эритроцитов. Для удобства и большей точности счета рекомендуется пользоваться окуляром с уменьшенным полем зрения. Параллельно берут кровь для подсчета числа эритроцитов в камере Горяева.

Расчет. Зная количество эритроцитов в 1 мкл (или 1 л) крови и количество тромбоцитов на 1000 эритроцитов, легко рассчитать и содержание тромбоцитов в крови:

$$X = \frac{a \cdot b}{1000},$$

где X - количество тромбоцитов в 1 мкл (1 л) крови; a - количество тромбоцитов, подсчитанных в мазке крови на 1000 эритроцитов; b - количество эритроцитов в 1 мкл (1 л) крови; 1000 - количество эритроцитов, подсчитанных в мазке крови.

Клиническое значение.

Снижение количества тромбоцитов (*тромбоцитопения*) - важный симптом некоторых форм геморрагического диатеза. Тромбоцитопения характерна для тромбоцитопенической пурпуры (менее $50 \cdot 10^9/\text{л}$), апластической анемии, острых лейкозов, хронических лейкозов в терминальной стадии, волосатоклеточного лейкоза, неходжскинских лимфом при вовлечении в процесс костного мозга. Менее выраженная тромбоцитопения выявляется при системных заболеваниях соединительной ткани, В₁₂-дефицитной анемии, заболеваниях печени, метастазах в костный мозг злокачественных опухолей, значительных кровопотерях.

Повышение количества тромбоцитов (*тромбоцитоз*) имеет место при миелопролиферативных заболеваниях (хронический миелофиброз, истинная полицитемия, хронический миелолейкоз), злокачественных новообразованиях, после спленэктомии.

Исследование морфологии тромбоцитов

Тромбоциты имеют округлую или овальную форму. Периферическая часть, называемая гиаломером, бесструктурная, окрашена в светлые базофильные тона, иногда сиреневатого цвета. В гиаломере различают вакуоли и псевдоподии. Центральная часть клетки - грануломер, или хромомер, розового или розовато-фиолетового оттенка, состоит из 5-20 мелких азурофильных гранул. У здоровых лиц также находят юные тромбоциты, чуть округлые, с бледно-голубым гиаломером и скудной зернистостью. Тромбоциты с неровными очертаниями и плотным грануломером, иногда занимающим всю клетку, считаются старыми. В патологических условиях тромбоциты могут приобретать различные, иногда причудливые формы, но определить их всегда легко. Формы раздражения представлены в виде мелких или гигантских хвостатых тромбоцитов. Выявляют также серые пластинки, лишенные грануломерной субстанции. Нормальные тромбоциты имеют диаметр 1,5-3,0 мкм. Кровяные пластинки диаметром 1 мкм называются микропластинками, более 3 мкм - макропластинками (мегапластинками).

При сравнении размеров тромбоцитов выявлено, что количество овальных тромбоцитов (при разнице диаметров не менее 0,2 мкм) составляет в норме 5 %, вакуолизированных - 4-6 %. Число тромбоцитов с диаметром до 1,9 мкм составляет 44,67 %, от 2 до 3,9 мкм - 53,44 %, от 4 до 5,9 мкм - 1,76 % и более 5 мкм - 0,13 %. Средний диаметр одного тромбоцита равен 2,16 мкм; средняя площадь - 4,39 мкм².

Клиническое значение. После кровопотери число юных тромбоцитов возрастает параллельно с увеличением количества тромбоцитов, могут появляться и незрелые юные тромбоциты, а также в большом количестве - патологические формы раздражения (до 100 мкм длиной). Количество юных тромбоцитов возрастает и при ремиссии тромбоцитопенической пурпуры. Незрелые юные тромбоциты в небольшом количестве появляются при гемолитическом кризе, после переливаний крови с осложнениями, при лейкозах. Фрагменты ядер мегакариоцитов в виде округлых образований величиной с лимфоцит или больше появляются при хроническом миелолейкозе, В₁₂-дефицитной анемии. Увеличение процента старых и дегенеративных тромбоцитов наблюдается при наследственных и приобретенных тромбоцитопатиях (бензолная интоксикация, цирроз печени).

Адгезивная функция тромбоцитов

Известны прямые и непрямые методы оценки адгезивности (ретенции) тромбоцитов (Кост Е. А., 1975; Меньшиков В. В., 1987; Баркаган З. С., 1988). *Прямые* заключаются в подсчете тромбоцитов, фиксированных на стандартной (обычно стеклянной) пластине, при нанесении на нее крови или погружении ее в кровь. *Непрямые* методы основаны на установлении разницы между количеством тромбоцитов в венозной крови и в крови из ранки на коже пальца руки (адгезивность *in vivo*) или в венозной крови до и после ее контакта с какой-либо поверхностью (адгезивность *in vitro*). Наибольшее распространение получили методы определения адгезивности тромбоцитов *in vitro*. За 7-10 дней до проведения исследования целесообразно отменить лекарственные препараты, так как многие из них угнетают

функцию тромбоцитов, что может исказить результаты; особенно это касается дипиридаола и его производных, ацетилсалициловой кислоты и ее производных, индометацина, фенилбутазона, сульфинпиразона, низкомолекулярных декстранов, трициклических антидепрессантов.

Модифицированная методика оценки ретенции тромбоцитов

Принцип основан на определении количества тромбоцитов, оседающих на стеклянных шариках, при пропускании через колонку со стандартной скоростью определенного объема крови.

Реактивы: 1) 3,8% раствор цитрата натрия; 2) 1% раствор оксалата аммония.

Оборудование: 1) все необходимое для подсчета тромбоцитов в камере Горяева; 2) инфузионный насос, позволяющий отсасывать кровь из шприца емкостью 5-10 мл со скоростью 2 мл/мин; 3) полихлорвиниловая трубка с внутренним диаметром 3,0-3,5 мм; 4) стеклянные или пластиковые силиконированные шприцы емкостью 5-10 мл; 5) зажимы; 6) стеклянные шарики диаметром 0,2-0,4 мм, промытые в ацетоне.

Подготовка колонки. Отрезок полихлорвиниловой трубки длиной 23-25 см неплотно закрывают с одной стороны зажимом так, чтобы через отверстие не проходили шарики, а с другого конца насыпают в трубку 2,5 г стеклянных шариков.

Ход исследования. Забирают кровь для подсчета тромбоцитов. В шприц набирают 2 мл крови и присоединяют его к колонке со стеклянными шариками (с незакрытого конца). К другому концу колонки подсоединяют инфузионный насос, включают его и пропускают кровь через колонку за 1 мин. Прошедшую через колонку кровь собирают в силиконированную пробирку, перемешивают и отбирают из нее пробу для подсчета числа тромбоцитов.

Расчет. Индекс ретенции (адгезивности) тромбоцитов (U_p) вычисляют по формуле:

$$U_p = \frac{A - B}{A} \cdot 100 \%,$$

где A - количество тромбоцитов в крови до пропускания ее через колонку; B - количество тромбоцитов в крови после пропускания ее через колонку.

Нормальные величины: 20-55 %.

Клиническое значение. Уменьшение индекса адгезивности тромбоцитов вплоть до 0 наблюдается при ряде врожденных тромбоцитопатий, наследственном дефекте тромбоцитов (тромбастении Гланцмана), болезнях Бернара-Сулье и Виллебранда, при изменениях в плазме, угнетающих функцию тромбоцитов, при тромбоцитопениях, при вторичных тромбоцитопатиях (множественная миелома, уремия, цирроз печени). В ряде случаев ретенция тромбоцитов может нарушаться при приеме ацетилсалициловой кислоты.

Повышение адгезивности наблюдается при тромбозах (но не в первые часы, когда число адгезивных тромбоцитов может быть снижено за счет их потребления).

Вопросы для подготовки к сдаче лабораторной работы:

1. Методика приготовления, фиксации и окраски препаратов периферической крови для подсчета тромбоцитов.
2. Техника подсчета тромбоцитов в мазке крови (по Фонио).
3. Метод подсчета тромбоцитов в счетной камере Горяева.
4. Автоматизированные методы подсчета тромбоцитов (с помощью гематологических анализаторов).
5. Морфологическая характеристика отдельных видов тромбоцитов. Процентное содержание тромбоцитов и их отдельных морфологических форм в крови здорового человека.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

основная литература:

1. Абакумова Т.В., Генинг Т.П., Михайлова Н.Л., Долгова Д.Р., Просина Л.В. Физиология крови. Учебное пособие к практическим занятиям по нормальной физиологии для студентов медицинского факультета / Ульяновск, 2017. URL[^] <ftp://10.2.96.134/Text/Abakumova2017.pdf>
2. Тимирбулатов, Р. А. Кровь. Методы физико-химического анализа. Аппаратное обеспечение : учебное пособие / Р. А. Тимирбулатов, С. А. Тумаков. — Самара : РЕАВИЗ, 2010. — 130 с. — ISBN 2227-8397. — Текст : электронный // Электронно-библиотечная система IPR BOOKS : [сайт]. — URL: <http://www.iprbookshop.ru/10179.html>
3. Кривов, Ю. И. Переливание крови, ее компонентов и препаратов : учебное пособие / Ю. И. Кривов, А. П. Торгунаков, В. И. Рудаев. — Кемерово : Кемеровская государственная медицинская академия, 2007. — 104 с. — ISBN 2227-8397. — Текст : электронный // Электронно-библиотечная система IPR BOOKS : [сайт]. — URL: <http://www.iprbookshop.ru/6189.html>

дополнительная литература:

1. Барышева, Е. С. Биохимия крови: лабораторный практикум / Е. С. Барышева, К. М. Бурова. — Оренбург : Оренбургский государственный университет, ЭБС АСВ, 2013. — 141 с. — ISBN 2227-8397. — Текст : электронный // Электронно-библиотечная система IPR BOOKS : [сайт]. — URL: <http://www.iprbookshop.ru/30085.html>
2. Переливание компонентов крови и кровезаменителей / П. П. Курлаев, В. К. Есипов, Р. Г. Гильмутдинов [и др.] ; под редакцией П. П. Курлаев. — Оренбург : Оренбургская государственная медицинская академия, 2014. — 336 с. — ISBN 978-5-91924-062-4. — Текст : электронный // Электронно-библиотечная система IPR BOOKS : [сайт]. — URL: <http://www.iprbookshop.ru/51483.html>

учебно-методическая:

1. Напалкова С. М., Селиванова О. С., Прокофьева Л. В., Саенко Ю. В. Средства, влияющие на систему крови : учеб.-метод. пособие для мед. фак. / С. М. Напалкова [и др.]. - Ульяновск : УлГУ, 2012. - 85 с. - Библиогр.: с. 84-85. - б/п. URL[^] <ftp://10.2.96.134/Text/napalkova2.pdf>
2. Песков А. Б. Биоэнергетика в гематологии : учебно-метод. комплекс / А. Б. Песков, Р. Х. Булиева, С. В. Пескова. - Ульяновск : УлГУ, 2006. - 71 с. - б/п.