

ГЕМАТОЛОГИЯ

Практика № 2: Анемии.

Анемия - это гематологический синдром или самостоятельное заболевание, для которого характерно уменьшение количества эритроцитов и / или содержания гемоглобина в единице объема крови, что приводит к развитию гипоксии тканей.

Гемоглобин (Hb) — основной дыхательный пигмент эритроцитов, относящийся к хромопротеидам и обеспечивающий ткани кислородом; состоит из белка — глобина и гема — соединения протопорфирина с железом. Последний придает гемоглобину характерную окраску. Присоединение к гему различных химических групп сопровождается изменением окраски, на этом основано и определение концентрации гемоглобина в крови.

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 в крови находится главным образом в виде оксигемоглобина, восстановленного гемоглобина.

Унифицированная гемиглобинцианидная методика определения гемоглобина.

Принцип метода заключается в том, что гемоглобин окисляют в метгемоглобин железосинеродистым калием (красная кровяная соль). Метгемоглобин, вступая в реакцию с ацетонциангидрином, образует окрашенный цианметгемоглобин (гемиглобинцианид), интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию гемоглобина.

Реактивы. Трансформирующий раствор: ацетон-циангидрин — 0,5 мг; калий железосинеродистый — 0,2 г; натрия гидрокарбонат — 1 г; дистиллированная вода — до 1 л. Раствор желтого цвета, прозрачный. При обесцвечивании или появлении осадка непригоден. Стабилен в течение нескольких месяцев при хранении в посуде из темного стекла при комнатной температуре. Стандартный калибровочный раствор гемиглобинцианида промышленного изготовления. Точные значения концентрации гемиглобинцианида и гемоглобина для каждой серии указаны в паспорте набора.

Специальное оборудование. Фотоэлектроколориметр (КФК-2, КФК-2 МП, КФК-3), спектрофотометр или гемоглобинометр любой марки («Мини Гем 540»).

Ход определения. В пробирку к 5 мл трансформирующего раствора добавляют 20 мкл крови (разведение 1:251). Содержимое пробирки тщательно перемешивают и оставляют стоять на 10 мин. Измеряют на фотоколориметре при длине волны 540 нм (для СФ) или 520–560 нм (зеленый светофильтр для ФЭК) в кювете длиной оптического пути 1 см против холостой пробы (трансформирующий раствор).

Расчет содержания гемоглобина. Расчет содержания гемоглобина производят по калибровочному графику, построенному по 4 точкам. На миллиметровой бумаге по горизонтальной оси абсцисс откладывают концентрации гемоглобина в г/л, указанные в паспорте и соответствующие содержанию гемиглобинцианида в ампулах. На вертикальной оси ординат откладывают величину экстинкции или показания гемоглобинометра, полученные при измерении соответствующего раствора гемиглобинцианида. Калибровочный график должен представлять собой прямую линию, исходящую из начала координат. Получение кривой линии вместо прямой означает, что в работе были допущены ошибки, или прибор неисправен. Из калибровочного графика, построенного для данного прибора, рассчитывают фактор, который используется для программируемого фотометра или при расчете таблицы.

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

У здоровых людей концентрация гемоглобина в крови составляет:

мужчины 130–160 г/л,
женщины 120–140 г/л,

Снижение концентрации гемоглобина в крови является основным лабораторным симптомом анемии. При этом содержание гемоглобина варьирует в широких пределах в зависимости от формы анемии и ее степени. Для уточнения характера анемии необходимо исследование количества эритроцитов, расчетных индексов эритроцитов, гематокрита, морфологии эритроцитов.

Повышение концентрации гемоглобина в крови может наблюдаться при миелопролиферативных заболеваниях и симптоматических эритроцитозах, сопутствующих различным состояниям. Физиологическое увеличение содержания гемоглобина свойственно новорожденным.

Фракции гемоглобина. Существуют физиологические и патологические виды гемоглобина. К физиологическим относят три основных типа гемоглобина: примитивный — Р; fetalный — F; взрослый — А. Помимо физиологических, выделено более 200 форм патологических гемоглобинов, отличающихся друг от друга физико-химическими свойствами. Среди гемоглобинопатий наиболее известна гемоглобинопатия S — серповидно-клеточная анемия. Исследование патологических гемоглобинов является трудоемким и проводится в специализированных лабораториях.

Эритроциты — наиболее многочисленная популяция клеток. В кровеносном русле при нормальных физиологических условиях эритроцит имеет форму двояковогнутого диска. Сухое вещество эритроцита содержит около 95 % гемоглобина, остальные 5 % приходятся на долю других белков, липидов, ферментов. Основная функция эритроцитов — снабжение тканей кислородом и транспорт углекислого газа. Продолжительность жизни эритроцитов — 100–120 дней, разрушаются они макрофагами селезенки.

Подсчет эритроцитов в крови осуществляется двумя методами:

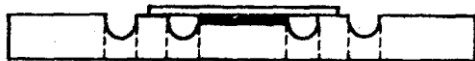
1. унифицированный метод подсчета в счетной камере. Подсчет эритроцитов под микроскопом в определенном количестве квадратов счетной сетки и пересчет на 1 мкл крови, исходя из объема квадратов и разведения крови.

Реактивы. 0,9%-ный раствор хлорида натрия (реактив 1).

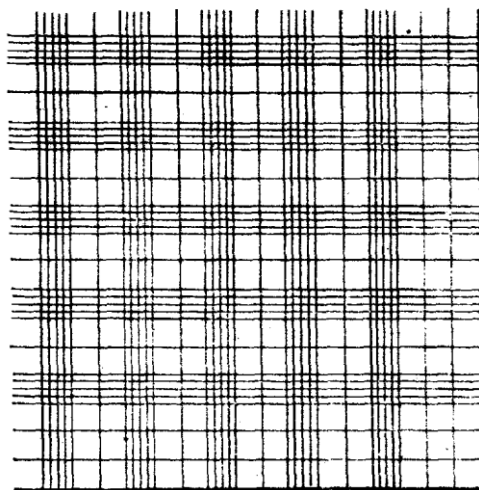
Специальное оборудование: Счетная камера Горяева. Микроскоп.



а



б



в

Ход исследования. Исследуемую кровь разводят в 200 раз. Для этого в сухую пробирку отмеривают 4 мл реактива 1. Пипеткой набирают 20 мкл крови. Кончик пипетки вытирают фильтровальной бумагой или марлей и кровь выдувают на дно пробирки с реактивом 1, пипетку тщательно промывают в верхнем слое жидкости, повторно набирая ее и выдувая в пробирку, содержимое пробирки перемешивают и оставляют стоять до момента счета (рекомендуется считать эритроциты в течение ближайших 2–3 часов после

взятия крови, а при гемолитических и В12 дефицитной анемии — сразу после взятия, так как эритроциты могут разрушиться).

Подготавливают счетную камеру: протирают насухо камеру с сеткой и покровное стекло, затем покровное стекло притирают к камере, слегка надавливая на него таким образом, чтобы по краям его появились радужные полосы (это свидетельствует о требуемой высоте камеры — 0,1 мм). Заполняют счетную камеру разведенной кровью: предварительно несколько раз тщательно встряхивают содержимое пробирки, затем пастеровской пипеткой или стеклянной палочкой отбирают каплю разведенной крови и подносят ее к краю покровного стекла, следя за тем, чтобы она равномерно без пузырьков воздуха заполнила всю поверхность камеры с сеткой, не затекая в бороздки. Заполненную камеру оставляют в горизонтальном положении на 1 мин. (для оседания эритроцитов).

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

Расчет количества эритроцитов в 1 мкл крови производят, исходя из разведения крови (200), числа сосчитанных квадратов (80) и объема 1 малого квадрата (1/4000 мкл).

$X=(A*4000*200)/80$, где

X – количество эритроцитов,

A – количество эритроцитов, посчитанное в 80 малых квадратах,

80 – количество сосчитанных малых квадратов,

200 - степень разведения крови,

4000 – множитель, приводящий результат к объему 1 мкл, поскольку объем малого квадрата составляет 1/4000 мкл.

сокращения в формуле получается, что количество эритроцитов, посчитанное в 5 больших квадратах умножают на 10000.

- причины ошибок при подсчете эритроцитов:

- неточность при взятии крови в пипетку.

-неудовлетворительная градуировка пипеток.

-образование сгустка крови.

-неправильное притирание покровного стекла камеры или недостаточная его толщина (менее 0,3 мм).

-подсчет производят сразу после заполнения камеры, когда клетки еще не успели осесть на дно.

-плохо вымытые и недостаточно высушенные пипетки и пробирки.

-недоброкачественность реактивов, вызывающих гемолиз.

-любое отклонение от правил подготовки камеры, ее заполнения и подсчета клеток.

2. гематологический анализатор.

Принцип работы большинства анализаторов основан на кондуктометрическом методе: определенное количество разведенной изотоническим раствором натрия хлорида или другого электролита крови пропускается через микроотверстие, проходящая через него клетка увеличивает сопротивление между электродами, и возникающий импульс передается на счетное устройство с цифровой индикацией. Исследование выполняется в соответствии с инструкцией, прилагаемой к анализатору. Количество эритроцитов в крови здорового человека составляет:

у мужчин — $4,0 \times 10^{12}/л$ — $5,0 \times 10^{12}/л$, у
женщин — $3,9 \times 10^{12}/л$ — $4,7 \times 10^{12}/л$.

Снижение количества эритроцитов (эритроцитопения) является одним из основных критериев анемического синдрома. Причиной анемии являются кровопотери, нарушения кроветворения в костном мозге и повышенный гемолиз. Кроме того, уменьшение количества эритроцитов имеет место при лейкозах, множественной миеломе, неходжкинских лимфомах, системной красной волчанке, ревматоидном артрите, метастазах злокачественных опухолей и др. Уменьшение количества эритроцитов наблюдается также при недостаточном содержании белка в пище, голодании, вегетарианской диете. Увеличение количества эритроцитов в единице объема крови называется эритроцитозом.

Исследование морфологии эритроцитов. В клинической практике морфологию эритроцитов обычно исследуют в окрашенных мазках крови с помощью иммерсионной системы микроскопа.

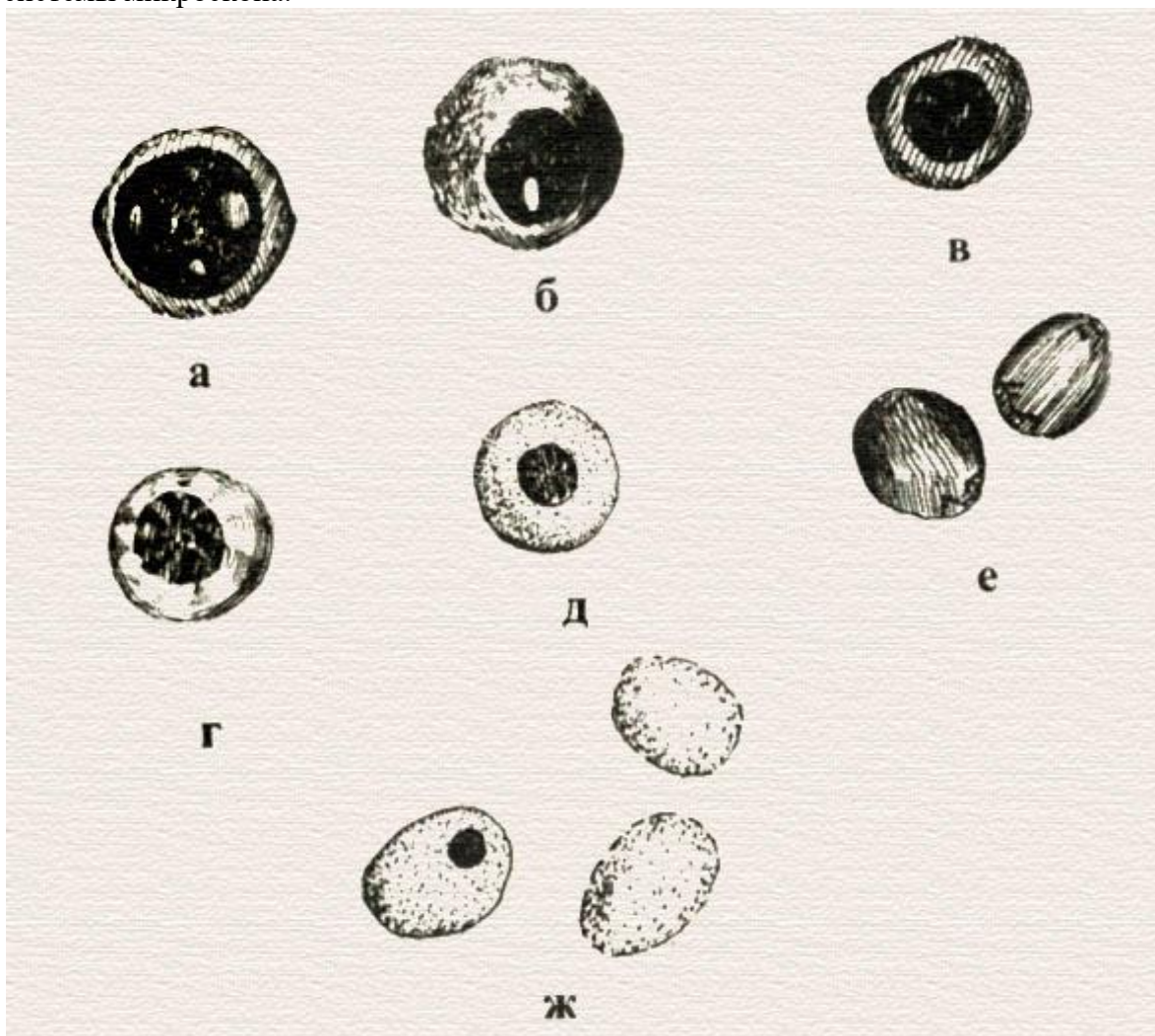


Рис. Морфология клеток эритроцитного ряда: а) эритробласт; б) пронормоцит; в) базофильный нормоцит; г) полихроматофильный нормоцит; д) оксифильный нормоцит; е) ретикулоциты; ж) эритроциты.

Морфология клеток эритроидного ряда: предметное стекло с окрашенным и высушенным мазком крови помещают на столик микроскопа и с помощью малого увеличения находят край мазка. Не меняя положения стекла, наносят каплю иммерсионного масла на край мазка, на место, расположенное под объективом. Переводят иммерсионный объектив в вертикальное по отношению к мазку положение, при этом объектив погружается в каплю масла. Осторожно с помощью макровинта добиваются получения изображения в поле зрения микроскопа. 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. После этого приступают к изучению морфологии эритроцитов, обращая внимание на их форму, размеры, интенсивность окраски, наличие патологических форм, внутриклеточных включений и т. п. Поскольку клетки имеют определенный объем, для лучшего их рассмотрения необходимо постоянно менять с помощью микровинта фокусное расстояние. Для получения более полного представления о морфологии клеток необходимо просматривать несколько полей зрения, передвигая мазок. Изучать морфологию эритроцитов нужно в тонких участках мазка, где они располагаются одиночно, не образуя так называемых «монетных столбиков», обычно на краю мазка вблизи краевой «метелки».

У здоровых людей эритроциты имеют примерно одинаковый размер. Нормальная величина эритроцитов $7,55 \pm 0,01$ мкм. Эритроцит имеет форму двояковогнутого диска с утолщением по краям. В окрашенных препаратах эритроциты имеют форму диска с небольшим просветлением в центре. Оксифилия (способность воспринимать кислые красители) клетки обусловлена присутствием гемоглобина, поэтому по интенсивности окраски можно судить о степени насыщения эритроцитов гемоглобином.

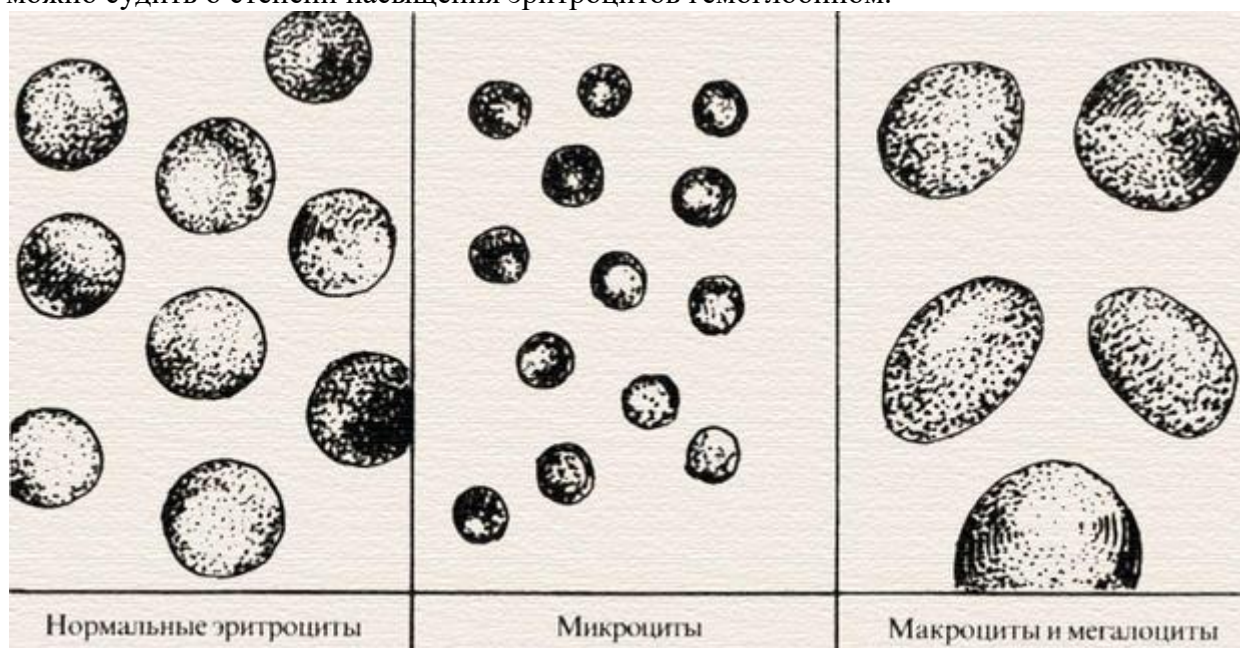


Рис. Эритроциты разных размеров.

Изменение морфологии эритроцитов в виде появления эритроцитов разного размера (анизоцитоз), разной формы (пойкилоцитоз), разной окраски (анизохромия) являются важными морфологическими симптомами различных форм анемии. Анизоцитоз — наличие в крови эритроцитов разного размера. Микроцитоз — это состояние, когда 30–50 % от общего числа эритроцитов составляют микроциты (эритроциты, диаметр которых меньше 6,5 мкм). Макроцитоз — это состояние, когда 50% и более от общего числа эритроцитов составляют макроциты (эритроциты, диаметр которых более 8 мкм). Мегалоцитоз — это состояние, когда 50% от общего числа эритроцитов составляют мегалоциты (эритроциты, диаметр которых более 9,5 мкм).

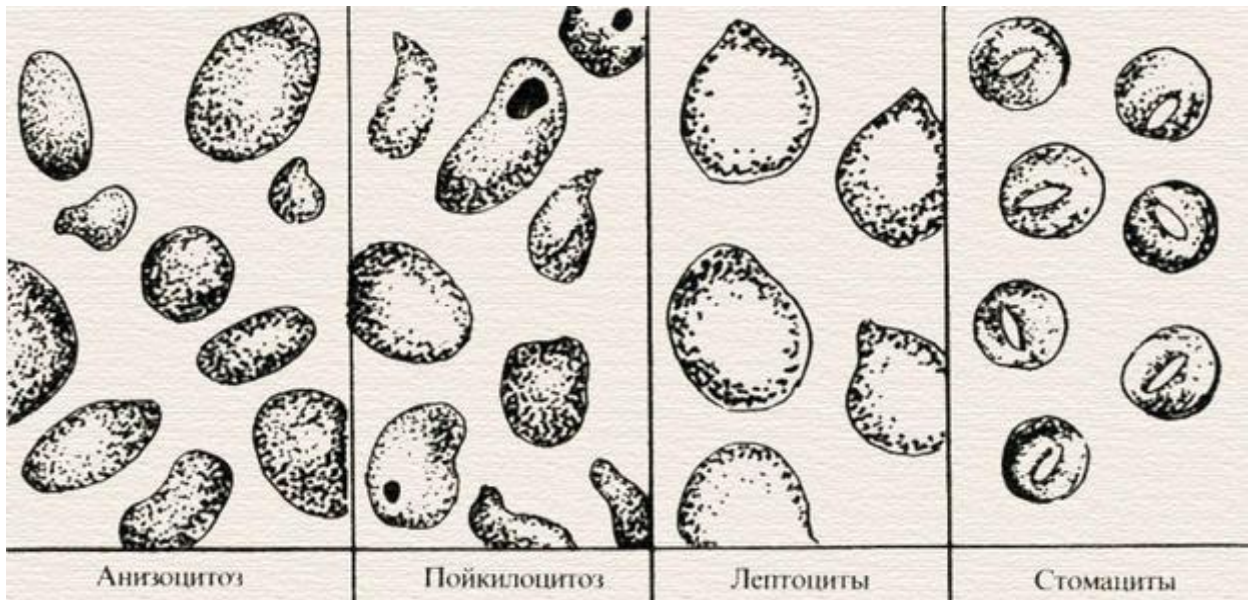


Рис. Эритроциты разной формы.

Описаны следующие патологические формы эритроцитов: микросфероциты (шаровидные эритроциты с увеличенной толщиной и уменьшенным диаметром без просветления в центре), являющиеся патогномичным признаком наследственной гемолитической микросфероцитарной анемии; овалциты или эллиптоциты; мишеневидные эритроциты (с окрашенным участком в центре клетки на фоне неокрашенной зоны) часто встречаются при талассемии, при железодефицитных анемиях; шизоциты (мелкие фрагменты величиной 2–3 мкм); акантоциты (эритроциты с зубчатым краем); дрепаноциты (эритроциты серповидной формы), встречающиеся при серповидно-клеточной анемии; платоциты или лентоциты (плоские эритроциты).

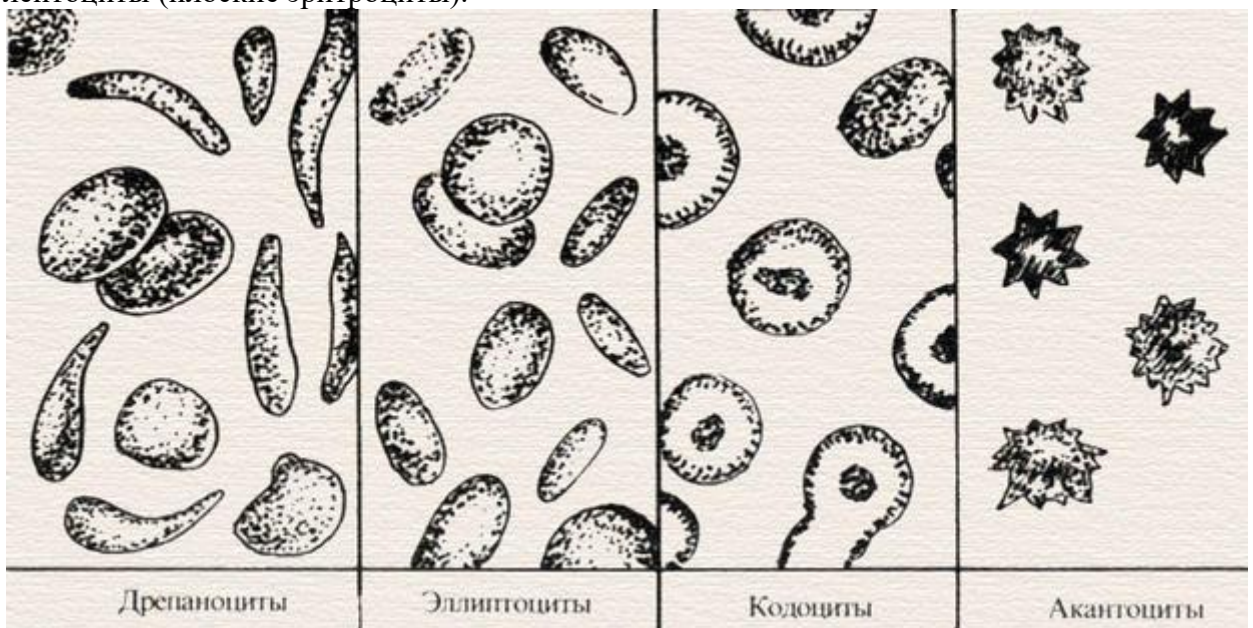


Рис. Эритроциты разной формы.

Окраска эритроцитов. Эритроциты окрашиваются кислыми красителями в розовато-красный цвет. Степень оксифилии клетки обусловлена присутствием гемоглобина и его количеством. Эритроциты здоровых людей имеют равномерную окраску и небольшое просветление в центре (нормохромия). Бледная окраска эритроцитов с широкой неокрашенной центральной частью называется гипохромией. Гипохромия эритроцитов обусловлена низким содержанием гемоглобина в эритроцитах и чаще характерна для дефицита железа, но также имеет место при свинцовом отравлении, талассемии. Гипохромия обычно сочетается с микроцитозом. Анизохромия — различная интенсивность окрашивания

отдельных эритроцитов или участков одного эритроцита, часто встречается при железодефицитной анемии

При морфологическом исследовании эритроцитов необходимо определить наличие в мазке патологических форм эритроцитов или включений в эритроцитах.

Включения в эритроцитах - при В12-дефицитной анемии встречаются эритроциты с остатками ядер в виде колец Кебота, телец Жолли.

Гематокритная величина, или показатель гематокрита, дает представление о соотношении между объемами плазмы и форменных элементов крови (главным образом — эритроцитов), полученном после центрифугирования крови. Принято гематокритной величиной выражать объем эритроцитов.

У здоровых людей гематокрит венозной и капиллярной крови равен:

для мужчин — 40–48%;

для женщин — 36–42%;

Снижение гематокрита характерно для анемий (до 20–25%), по его величине можно судить о степени анемии. Увеличение (до 65%) наблюдается при полицитемии. Используют значения гематокрита для расчетных показателей, характеризующих эритроциты: средний объем, средняя концентрация гемоглобина.

Индексы эритроцитов

В клинической практике используют различные расчетные характеристики, отражающие физико-химические свойства эритроцитов.

Среднее содержание гемоглобина в эритроците (МСН). Показатель отражает абсолютное содержание гемоглобина в одном эритроците в пикограммах (ПГ). Определяют путем деления концентрации гемоглобина на число эритроцитов.

Кроме того, расчет данного показателя можно произвести с помощью современных автоматических гематологических анализаторов. Нормальные величины составляют 27–31 ПГ.

Показатель среднего содержания гемоглобина в эритроците важен для суждения о гипо- и нормохромии эритроцитов.

Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (МСНС — Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration). Показатель отражает степень насыщения эритроцита гемоглобином в процентах. Вычисляют среднюю концентрацию гемоглобина в эритроцитах по формуле: $МСНС = (\text{гемоглобин в г/л} / \text{гематокрит в \%}) \times 100$. Расчет входит в программу современных гематологических анализаторов.

Нормальные величины МСНС колеблются в пределах 30–38 %. Это довольно постоянная величина, и насыщение более 38 % встречается очень редко. Снижение показателя отражает абсолютную гипохромию и является характерным для железодефицитных анемий.

Средний объем эритроцитов (MCV — Mean Corpuscular Volume). Показатель является важным при диагностике различных форм анемий. Вычисляют путем деления гематокритной величины на общее количество эритроцитов в крови: $MCV = \text{гематокрит в \%} / \text{число эритроцитов в } 1 \text{ мкл}$.

Выражают в мкм^3 или в фемтолитрах: $1 \text{ фл} = 1 \times 10^{-15} \text{ л} = 1 \text{ мкм}^3$.

Расчет входит в программу современных гематологических анализаторов.

Нормальные величины: взрослые — 80-100 фл.

На основании значений MCV анемии делят на микроцитарные, нормоцитарные и макроцитарные.