

## ГЕМАТОЛОГИЯ

### Практика № 5. Геморрагические диатезы

Для диагностики геморрагических диатезов применяются следующие лабораторные тесты:

1. Клинический анализ крови с оценкой тромбоцитарного звена кроветворения.

Тромбоциты — безъядерные клетки размером от 1 до 5 мкм — являются фрагментами цитоплазмы мегакариоцитов, имеют гиаломер и грануломер. Популяция тромбоцитов неоднородна. В ней различают зрелые тромбоциты ( $87,0 \pm 0,19\%$ ), юные ( $3,2 \pm 0,13\%$ ), старые ( $4,5 \pm 0,21\%$ ) и формы раздражения ( $2,5 \pm 0,1\%$ ). Время циркуляции тромбоцитов — 10–12 суток. Разрушение тромбоцитов происходит в селезенке.

Подсчет количества тромбоцитов. В практике при подсчете тромбоцитов используют методы, основанные на двух принципах:

- непосредственный подсчет в крови (с помощью счетной камеры или счетчика).

- подсчет в мазках крови на определенное количество эритроцитов с пересчетом на 1 мкл или 1 л с учетом общего количества эритроцитов в крови.

Каждая группа методов имеет преимущества и недостатки. Существенным преимуществом первой группы методов является их точность. Непосредственный подсчет тромбоцитов в крови удобен еще и потому, что не требует для расчета сведений о количестве эритроцитов, но подсчет в камере более трудоемкий, поскольку тромбоциты в нативном виде представлены мелкими и плохо контрастированными элементами. Недостатком этих методов является необходимость подсчета тромбоцитов в ближайшие часы после взятия крови.

Подсчет тромбоцитов в мазках крови значительно уступает по своей точности методам непосредственного подсчета в камере или с помощью счетчиков или автоматов. Ошибки при подсчете в мазках крови могут быть обусловлены несколькими причинами: плохое качество мазка и связанное с этим неравномерное распределение тромбоцитов, неточный подсчет эритроцитов в крови. Существенное неудобство метода — необходимость одновременного подсчета тромбоцитов и эритроцитов в крови. Преимущество его — возможность подсчета тромбоцитов в любое время, независимо от момента взятия крови. В качестве унифицированных были утверждены два метода, основанные на обоих принципах.

#### **Метод подсчета в камере.**

Принцип. Подсчет тромбоцитов в 1 мкл (или 1 л) с учетом разведения крови и объема квадрата счетной сетки с применением фазово-контрастного устройства для контрастирования тромбоцитов.

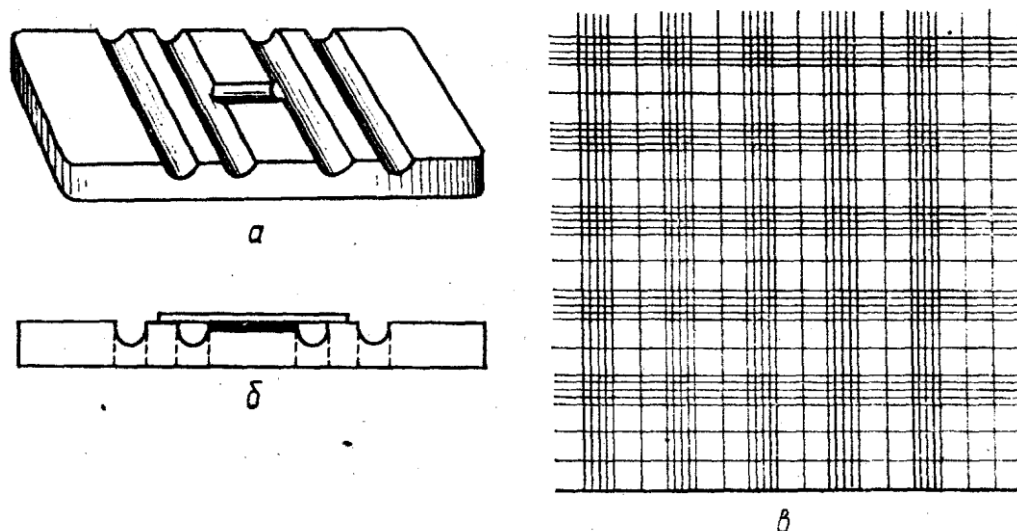
Реактивы. Применяют реактив 1 или 2.

1. Кокаина гидрохлорид — 3 г, натрия хлорид — 0,25 г, фурацилин — 0,025 г, дистиллированная вода — 100 мл.

2. 1%-й раствор оксалата аммония. Раствор кипятят и фильтруют, хранят в холодильнике. Сравнительный анализ разных разводящих жидкостей позволил считать лучшим 1%-й раствор оксалата аммония, так как он дает быстрый и полный лизис эритроцитов.

Ход определения: Разводят исследуемую кровь 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 минут для гемолиза эритроцитов. Подготавливают счетную камеру Горяева. Перемешивают разведенную кровь и заполняют камеру, подносят каплю ее с помощью пастеровской пипетки к краю покровного стекла, следя за тем, чтобы кровь равномерно, без пузырьков воздуха заполняла всю поверхность сетки, не затекая в бороздки. Помещают счетную камеру во влажную среду на 5 минут для оседания тромбоцитов (чашка Петри с

уложенной по краям смоченной водой фильтровальной бумагой). Производят подсчет тромбоцитов в 25 больших квадратах.



Тромбоциты выглядят в счетной камере в виде мелких, хорошо преломляющих свет образований. Расчет числа тромбоцитов проводят, исходя из разведения крови (200), числа сосчитанных квадратов (25) и объема одного большого квадрата ( $1/250$  мкл, так как сторона квадрата  $1/5$  мм, высота  $1/10$  мм).

$$X = (a \times 250 \times 200) / 25 = a \times 2000,$$

где  $X$  — число тромбоцитов в 1 мкл крови;

$a$  — число тромбоцитов, сосчитанных в 25 больших квадратах.

#### **Метод подсчета в мазках крови (по Фонию).**

Принцип. Метод основан на подсчете числа тромбоцитов в окрашенных мазках крови на 1000 эритроцитов с расчетом на 1 мкл (или 1 л) крови, исходя из содержания в этом объеме количества эритроцитов.

Реактивы. Применяют реактив 1 или 2.

1. 1.4%-ный раствор сульфата магния.

2. 6%-ный раствор этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА).

Ход определения. Смешивают кровь с реактивом 1 или 2; для этого взятый капилляром Панченкова реактив до метки «75» вносят в пробирку, затем добавляют кровь, взятую тем же капилляром до метки «0». Содержимое пробирки перемешивают и готовят тонкие мазки. Окрашивают по Романовскому-Гимзе в течение 2–3 часов (при использовании реактива 1) и в течение 40–45 минут (при использовании реактива 2). Высохшие мазки микроскопируют с иммерсионным объективом, подсчитывая количество тромбоцитов в тонких местах препарата (эритроциты должны быть расположены изолированно).

Подсчет производят следующим образом: в каждом поле зрения микроскопа считают число эритроцитов и тромбоцитов, передвигая мазок до тех пор, пока не будет прочитана 1000 эритроцитов. Для удобства счета и большей точности следует пользоваться специальным окуляром с уменьшенным полем зрения. При отсутствии готового окуляра его можно легко приготовить, для чего отвинчивают окуляр 7х, вкладывают в него кусок бумаги с вырезанным небольшим квадратиком и завинчивают. Параллельно берут кровь для подсчета эритроцитов в камере Горяева.

Сосчитав тысячу эритроцитов и количество встретившихся кровяных пластинок, определяют их количество по формуле:

$$TP = (A * B) / 1000, \text{ где}$$

TP- тромбоциты в 1 мкл (л) крови;

A- количество их на 1000 эритроцитов;

В- количество эритроцитов в 1 мкл (л) крови.

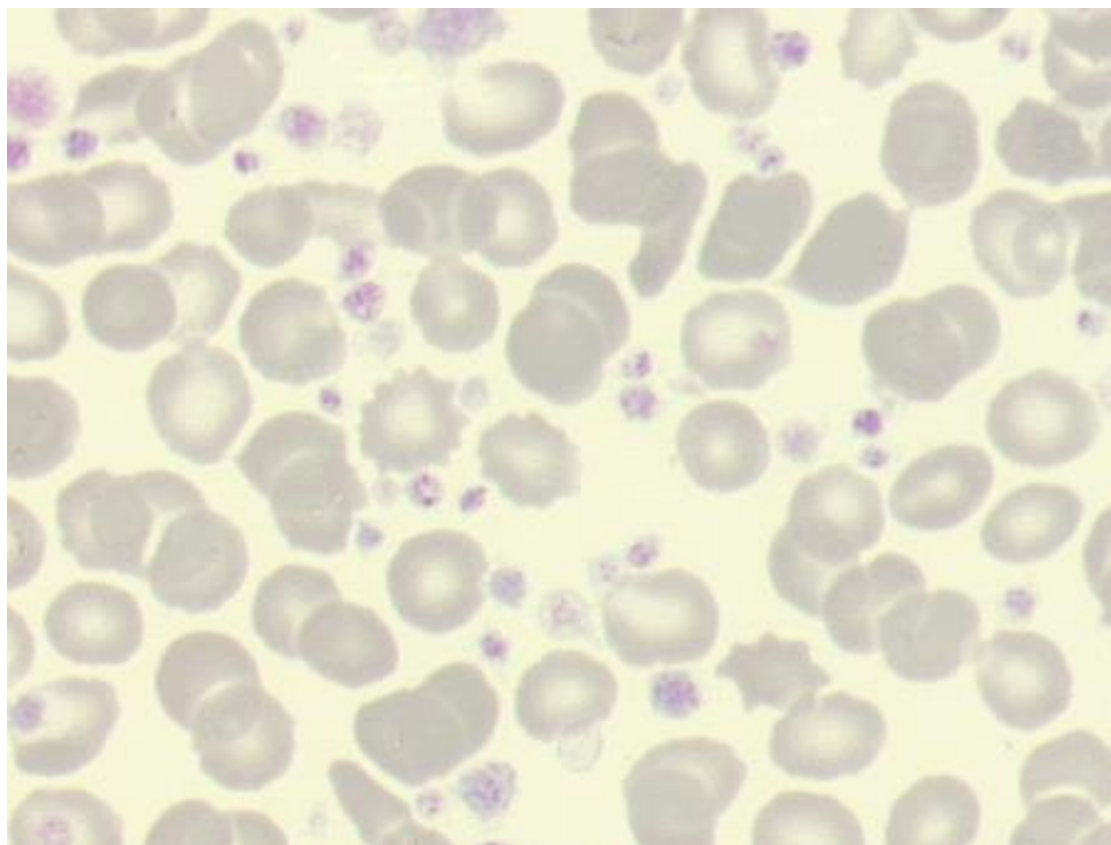


Рис. тромбоциты и эритроциты.

Подсчет числа тромбоцитов в гематологическом анализаторе. Применение гематологических анализаторов существенно повышает точность и скорость подсчета тромбоцитов в крови. Принцип работы большинства счетчиков основан на кондуктометрическом методе. Ход исследования изложен в инструкции по работе, прилагаемой к конкретному прибору.

Нормальные величины.

Количество тромбоцитов у здоровых людей составляет  $180\text{--}320 \times 10^9$  Г/л

2. Длительность кровотечения (увеличена – при патологии сосудисто-тромбоцитарного звена; в норме – при коагулопатиях). Определяется длительность кровотечения из капилляров после прокола кожи скарификатором.

Определение может проводиться при проколе пальца или мочки уха. Глубина прокола должна быть не менее 3мм – только при этом условии кровь из ранки выделяется самопроизвольно, без нажима. Сразу после прокола включают секундомер. Первую каплю крови не удаляют ватой, как обычно, а прикасаются к ней фильтровальной бумагой, которая впитывает кровь. Далее снимают фильтровальной бумагой выступающие капли крови через каждые 30 секунд. Постепенно капли крови становятся все меньше. Когда следы крови перестанут оставаться, секундомер выключают.

Нормальные величины. Длительность кровотечения по Дукке составляет 2-3 минуты.

Удлинение времени кровотечения наблюдается при тромбоцитопениях, заболеваниях печени, недостаточности витамина С, злокачественных опухолях и др. При гемофилии этот тест остается в пределах нормы.

### 3. Коагулограмма

-Время свертывания.

Кровь берут из пальца в чистый и сухой капилляр Панченкова. Первую каплю крови удаляют тампоном, затем в капилляр набирают столбик крови высотой 25-30мм и переводят ее в середину капиллярной трубки. Включают секундомер и через каждые 30 секунд капилляр наклоняют под углом 45 градусов. Кровь свободно перемещается внутри капилляра. С начала м свертывания ее движение замедляется. В момент полного свертывания кровь перестает двигаться. Начало свертывания у здорового человека - от 30с до 2мин, конец – от 2 до 5 мин. Время увеличивается при коагулопатиях, тромбоцитопатиях. -АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время). Один из наиболее ценных общих тестов для получения представления о системе свертывания крови. Референтные значения составляют 25-35с. Удлиняется при дефиците плазменных факторов свертывания, гемофилии, болезни Виллебранда

-ПВ (протомбиновое время), характеризует фазы протромбинообразования и тромбинообразования плазменного гемостаза. Референтные значения: взрослые 11-15с, новорожденные – 13-18с. Увеличено (говорит о наклонности к гипокоагуляции) – при дефиците витамина К, факторов II, V, VII, X, приеме антикоагулянтов, ), укорочено (наклонность к гиперкоагуляции).

-ТВ (тромбиновое время)- необходимое для образования сгустка фибрина в плазме при добавлении к ней тромбина. Оценивается образование фибрина, состояние естественных и патологических антикоагулянтов. Референтное значение: 12-16с. Удлиняется при ДВС-синдроме, сепсисе, гепаринотерапии).

-Фибриноген – белок, синтезирующийся в печени. В крови он находится в растворенном состоянии, но в результате ферментативного процесса при кровотечениях может превращаться в нерастворимый фибрин. Референтные значения: взрослые 2,00-4,00 г/л, новорожденные 1,25- 3,00 г/л. Снижен – при заболеваниях печени, ДВС-синдроме (2и 3 фазы), наследственной афибриногемии.

Так же для дифференциальной диагностики геморрагических диатезов в специализированных медицинских центрах проводят следующие исследования:

- иммунологические исследования (выявление аутоантител к тромбоцитам, плазменным факторам, фактору Виллебранда, иммунограмма, уровень криоглобулинов);
- определение уровня VIII фактора;
- определение функциональной активности тромбоцитов (содержание гликогена, активность ЛДГ), фактора Виллебранда, тромбоэластограмма;
- исследование костного мозга (миелограмма, трепанобиоптат);
- резистентность сосудистой стенки (проба щипка, проба жгута);
- факторы свертывания: I – фибриноген, II – протромбин, III – тканевой тромбопластин, IV – ионизированный кальций, V – проакцелерин, VI – акцелерин, VII – проконвертин (антифибринолизин), VIII – антигемофильный глобулин А, фактор Виллебранда, IX – фактор Кристмаса (антигемофильный глобулин В, плазменный тромбопластин), X – фактор Стюарта-Прауэр, XI – антигемофильный глобулин С (плазменный предшественник тромбопластина), XII – фактор Хагемана (инициатор внутрисосудистой коагуляции), XIII – фактор Лаки-Лоранда (фибринолизующий).