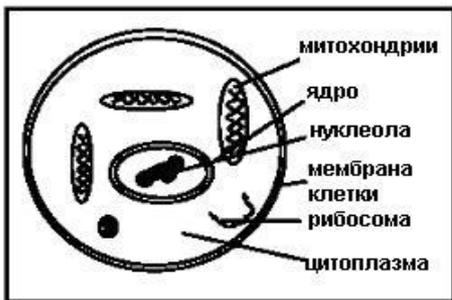


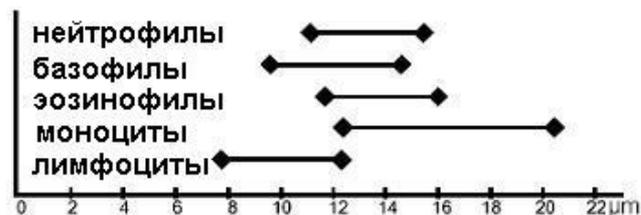
ОБЩАЯ ГЕМАТОЛОГИЯ.
СЕМИНАР

1. Оценка гистограмм.



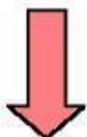
Дифференцировка лейкоцитов на основании метода Культера.

До добавления лизирующего реагента

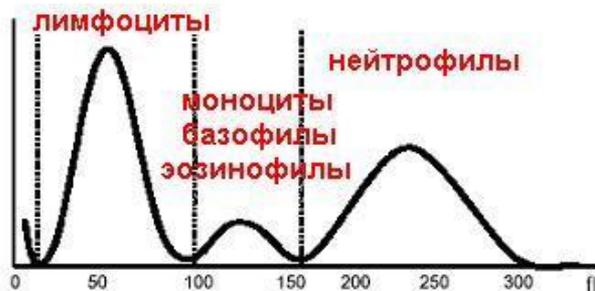


Диаметр клеток в μm

- 10 - 15
- 9 - 14
- 11 - 16
- 12 - 20
- 7 - 12



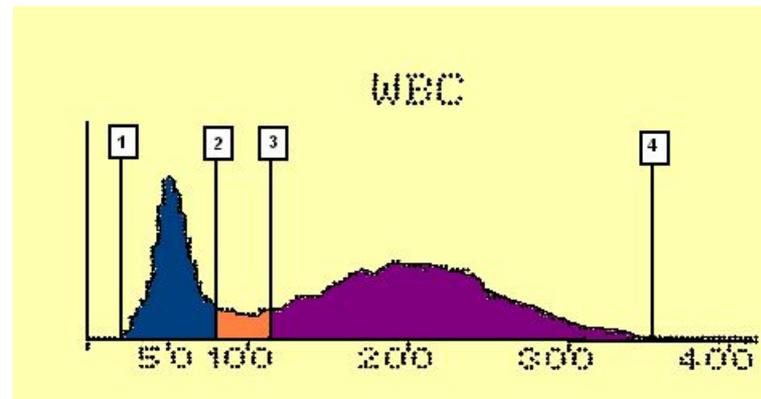
После добавления лизирующего реагента



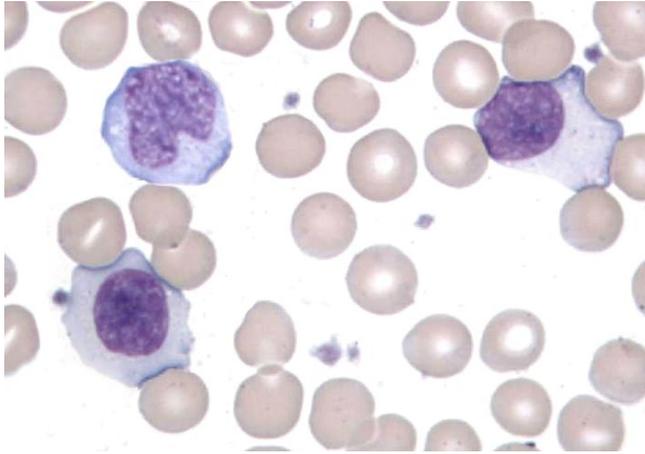
Действие лизирующего реагента приводит к потере цитоплазмы моноцитами и разбуханию нейтрофилов, тем самым изменяются размеры клеток

Объем клеток в фл

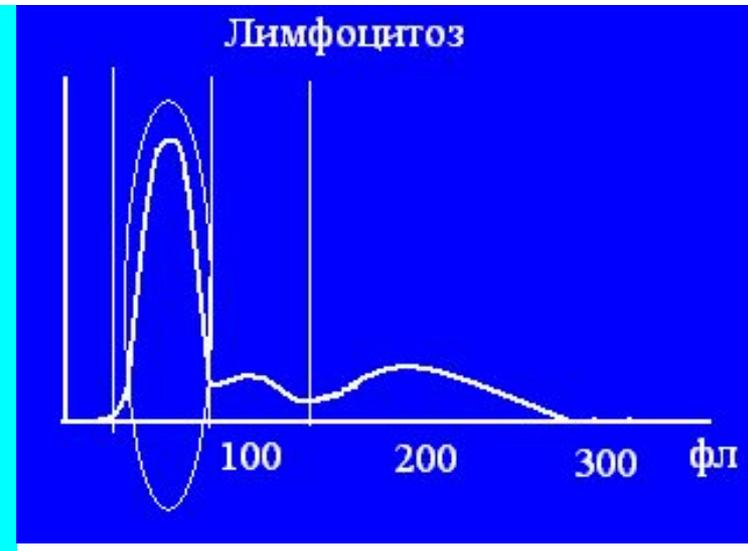
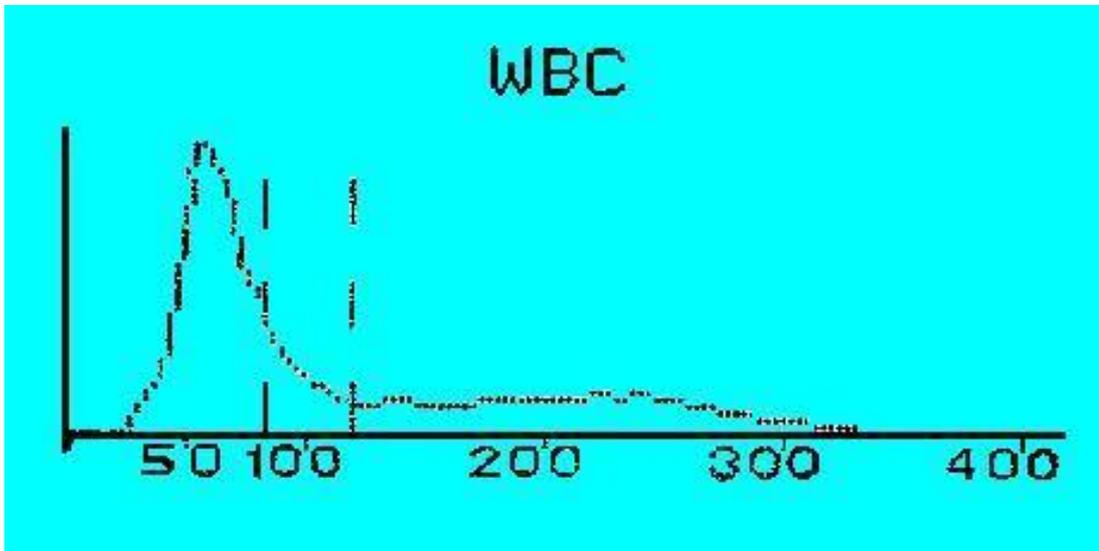
- лимфоциты 30 - 80
- моноциты 60 - 120
- базофилы 70 - 130
- эозинофилы 80 - 140
- нейтрофилы 120 - 250



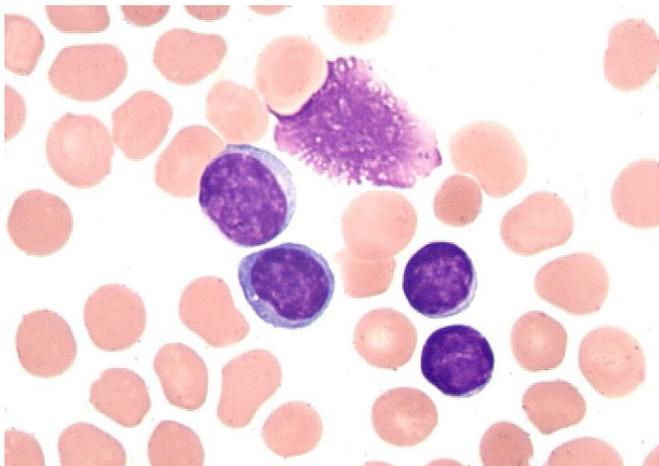
Изменения WBC-гистограмм. Лимфоцитоз



**WBC – $7,9 \times 10^9/\text{л}$,
палочкоядерные нейтрофилы – 14%,
сегментоядерные нейтрофилы – 13%,
моноциты – 7%,
лимфоциты – 66% (из них 30 –
атипичные мононуклеары).**

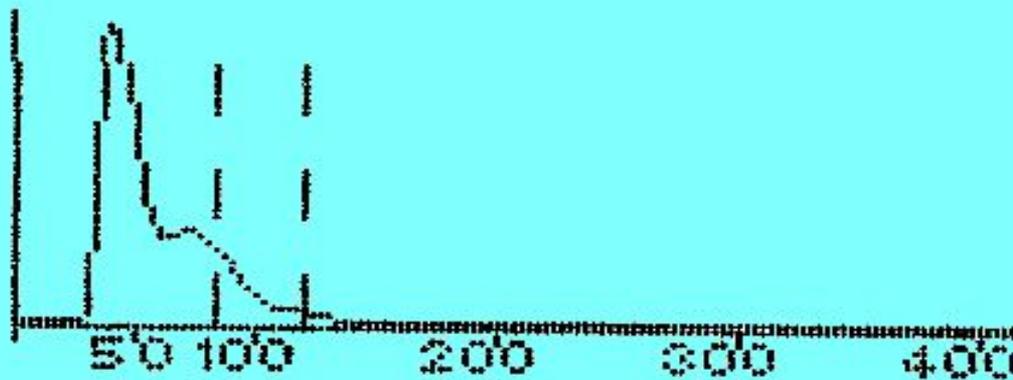


Изменения WBC-гистограмм. Лимфоцитоз

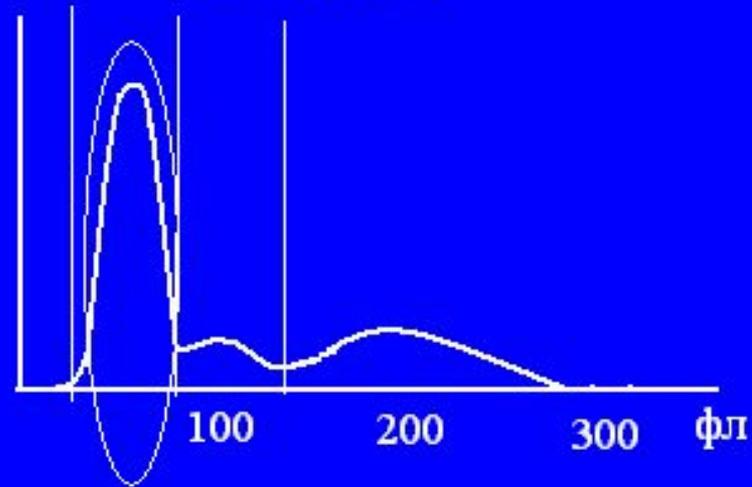


WBC – $229.0 \times 10^9/\text{л}$,
сегментоядерные нейтрофилы – 2%,
лимфоциты – 98%.

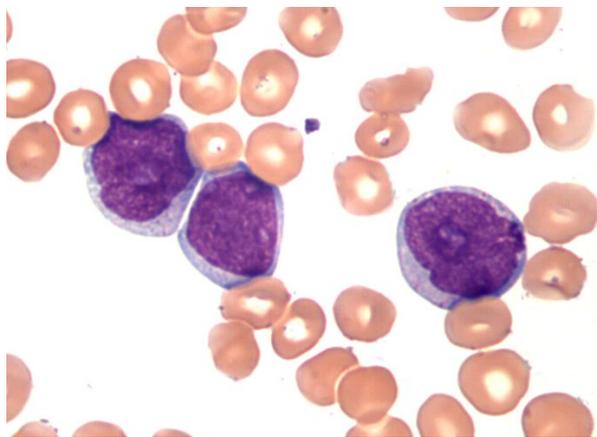
WBC



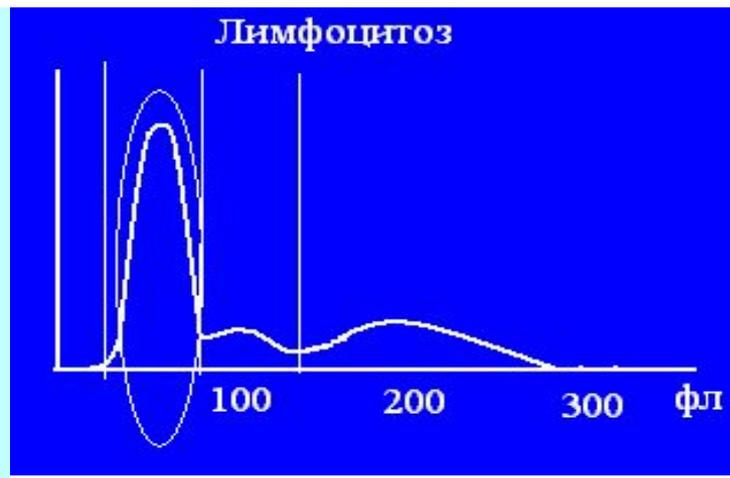
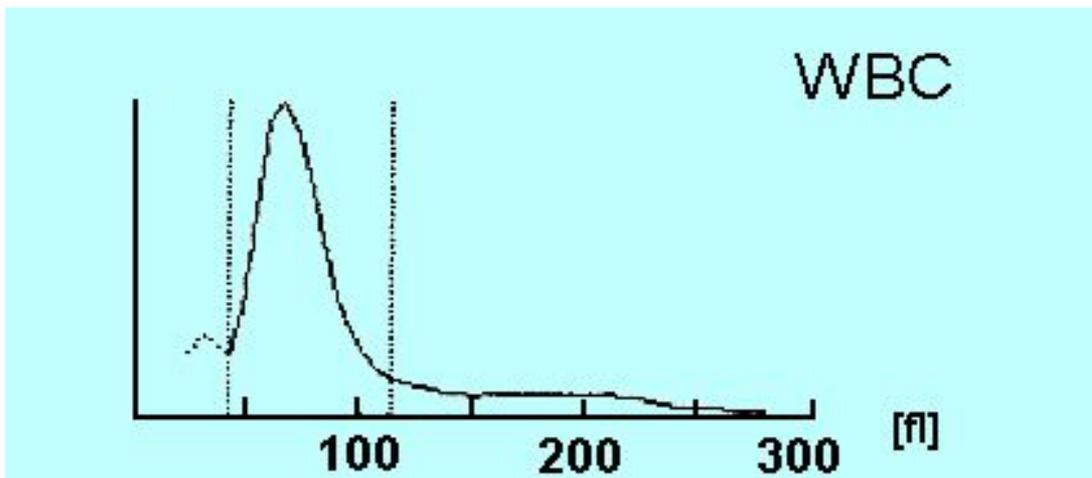
Лимфоцитоз



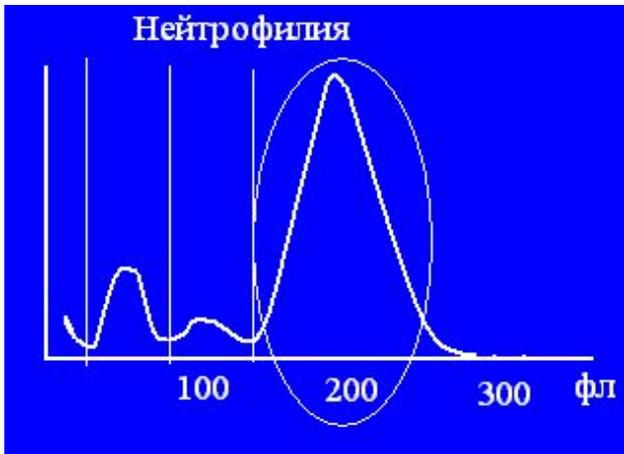
Изменения WBC-гистограмм. Лимфоцитоз



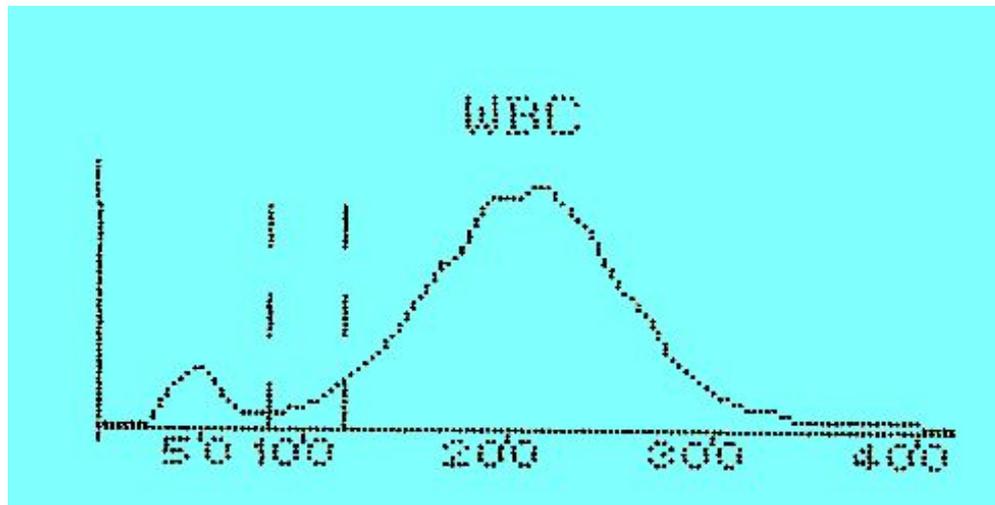
**WBC – $35,0 \times 10^9/\text{л}$,
бласты - 66%,
миелоциты – 7%,
палочкоядерные нейтрофилы – 4%,
сегментоядерные нейтрофилы – 13%,
моноциты – 2%,
лимфоциты – 8%.**



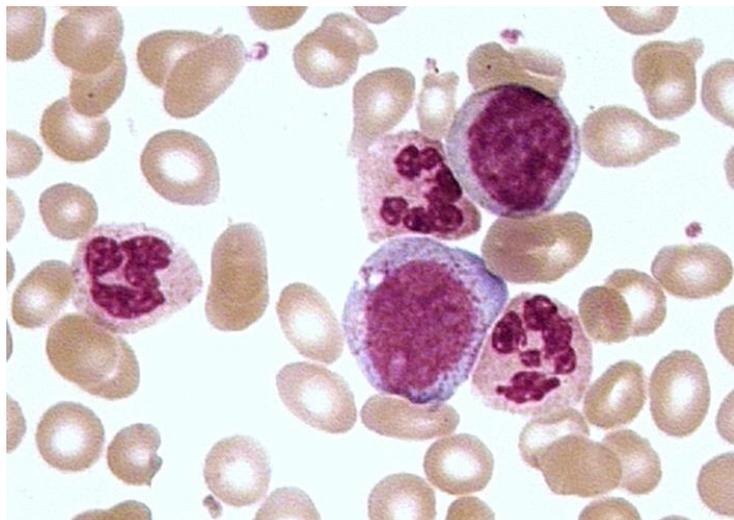
Изменения WBC-гистограмм. Нейтрофилез



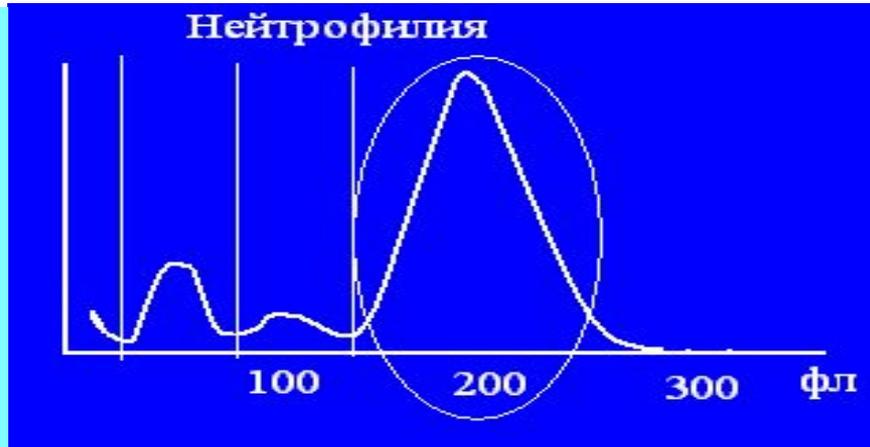
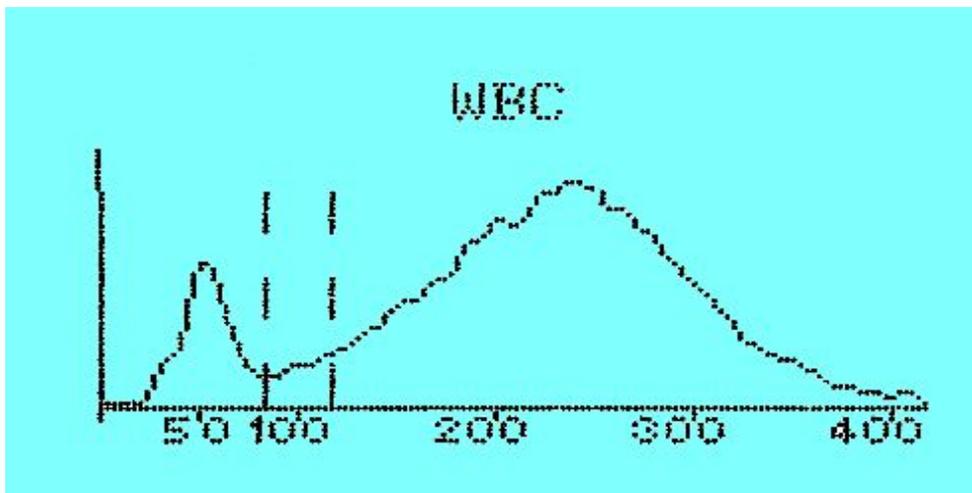
Лейкоцитарная гистограмма периферической крови больного с лейкоцитозом ($13,1 \times 10^9/\text{л}$) и палочкоядерным сдвигом (11%).



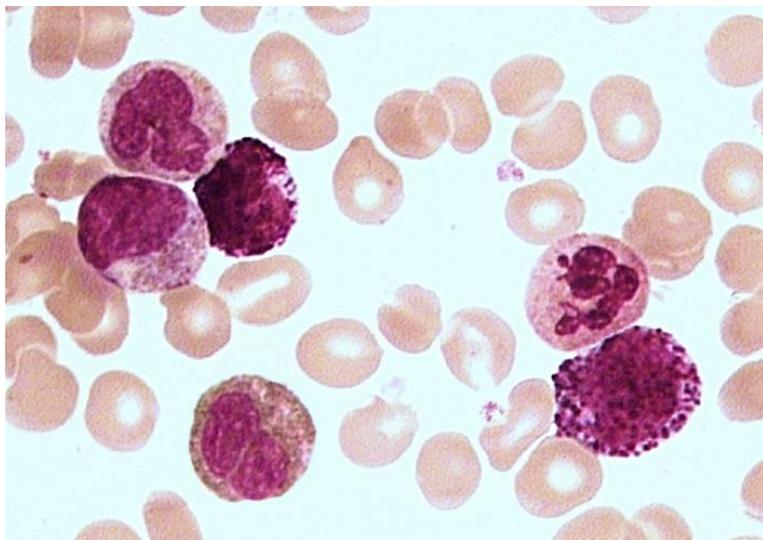
Изменения WBC-гистограмм. Нейтрофилез



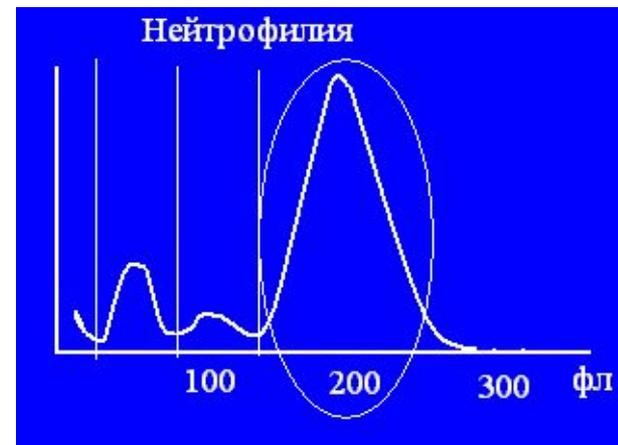
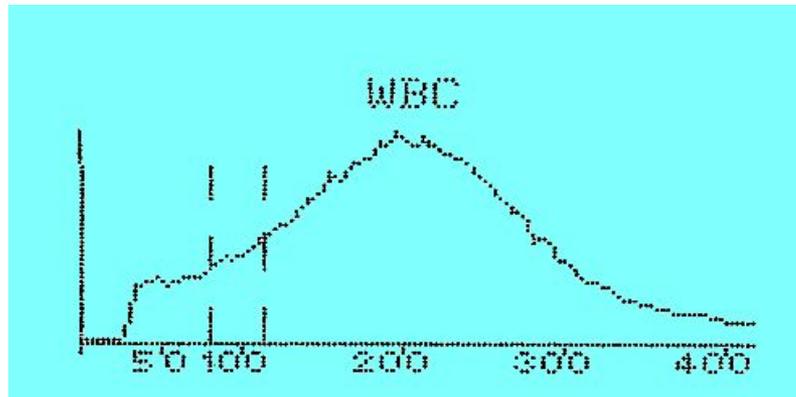
WBC – $34,5 \times 10^9/\text{л}$,
бласты – 7%,
миелоциты – 18%,
метамиелоциты – 2%,
палочкоядерные нейтрофилы – 16%,
сегментоядерные нейтрофилы – 39%,
базофилы – 6%,
моноциты – 6%,
лимфоциты – 6%.



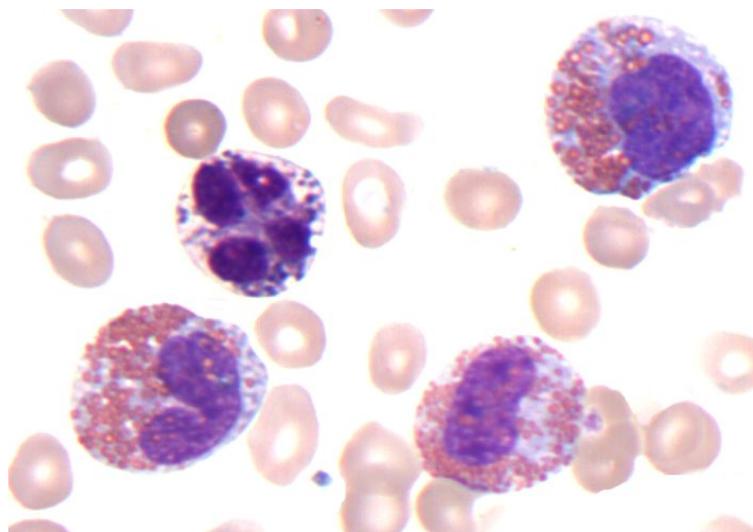
Изменения WBC-гистограмм. Нейтрофилез



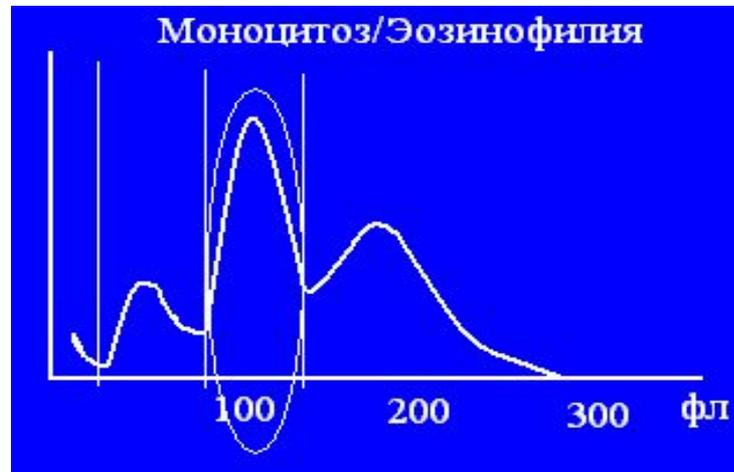
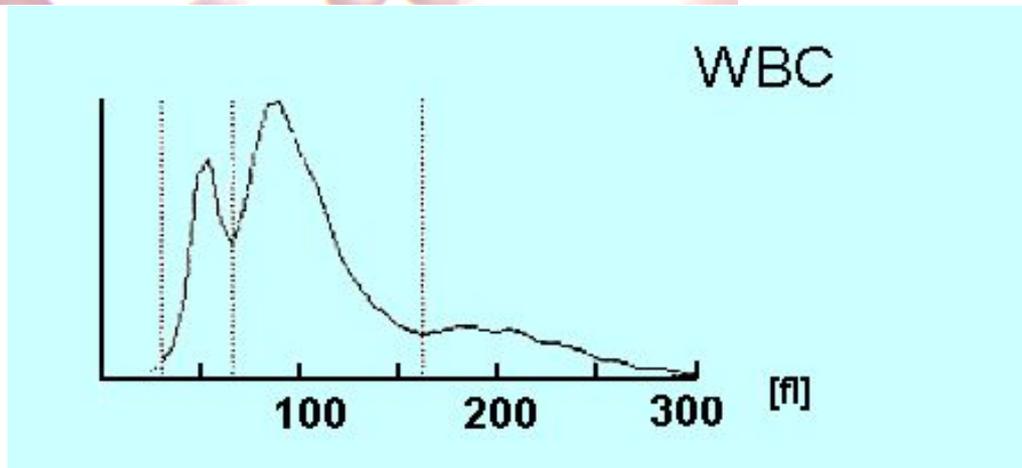
WBC – $117,2 \times 10^9/\text{л}$,
бласты – 8%,
миелоциты – 22%,
метамиелоциты – 4%,
палочкоядерные нейтрофилы – 15%,
сегментоядерные нейтрофилы – 16%,
эозинофилы – 15%,
базофилы – 14%,
моноциты – 3%,
лимфоциты – 3%.



Изменения WBC-гистограмм. Эозинофилия

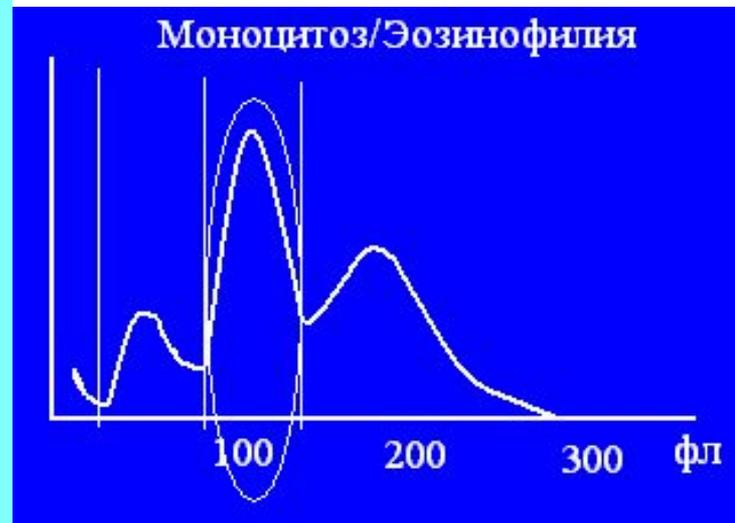
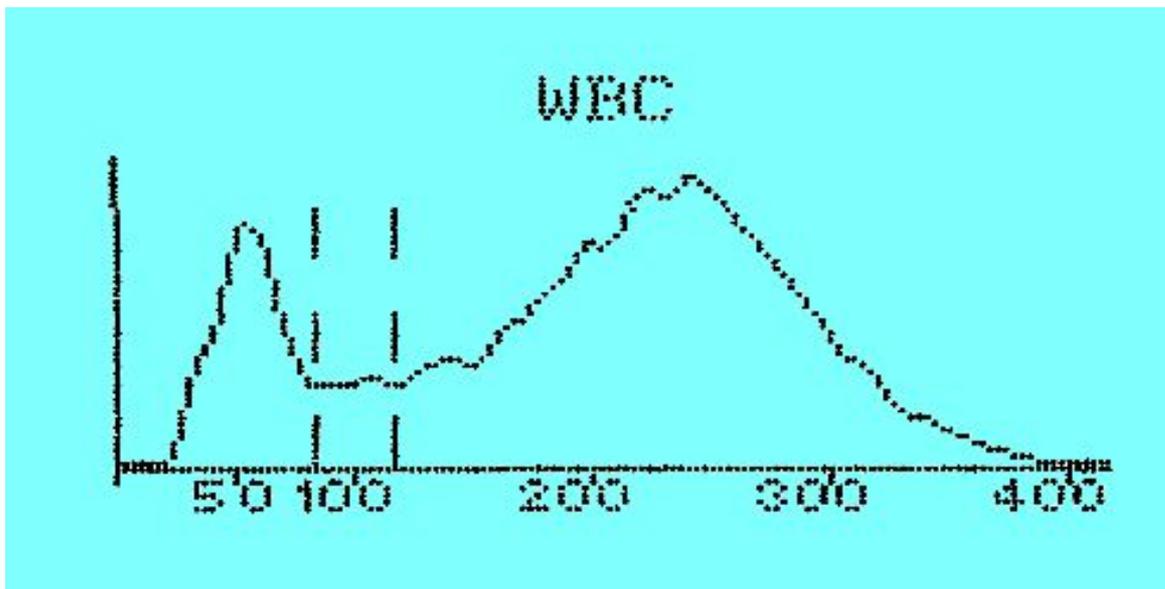


. WBC – $12,1 \times 10^9/\text{л}$,
палочкоядерные нейтрофилы – 2%,
сегментоядерные нейтрофилы – 22%,
эозинофилы – 53%,
моноциты – 3%,
базофилы – 1%,
лимфоциты – 19%.



Изменения WBC-гистограмм. Моноцитоз.

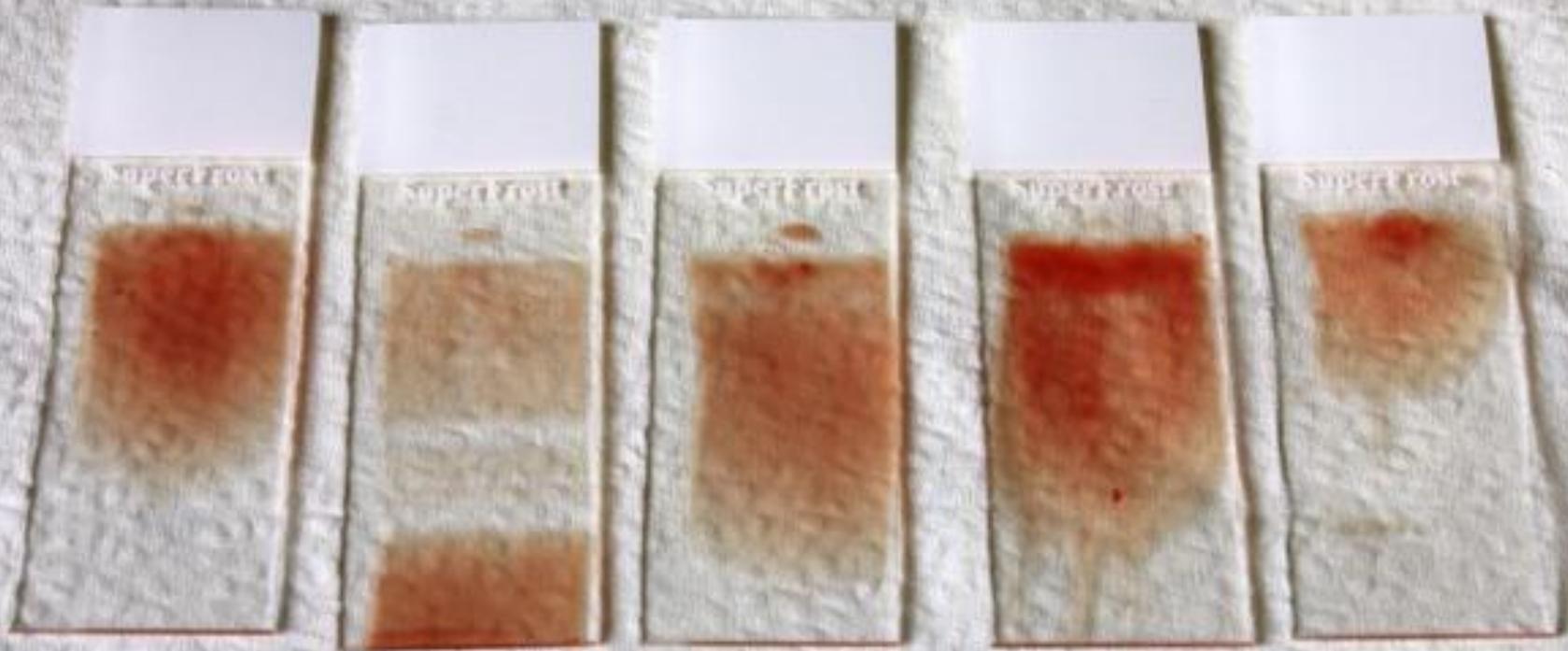
WBC – $9,5 \times 10^9/\text{л}$,
палочкоядерные нейтрофилы – 4%,
сегментоядерные нейтрофилы – 59%,
эозинофилы – 1%,
моноциты – 14%,
лимфоциты – 22%.



2. Морфология клеток крови

Приготовление, фиксация и окраска гематологических мазков.

Какой мазок выполнен
правильно?



Высохший мазок должен быть

- равномерно тонким;
 - желтоватого цвета;
 - занимать не более $\frac{3}{4}$ и не менее $\frac{1}{2}$ длины предметного стекла;
 - мазок заканчивается «метелочкой».
-
- Толстые (густо-розового цвета) мазки использовать не следует, так как в них морфология клеток трудноразличима.
-
- Сухие мазки могут храниться в течение 2 дней в сухом, теплом месте.

Фиксаторы:

- Фиксатор – краска Май – Грюнвальда – 3 МИН;
- Этанол 96%, 15-25 минут;
- Смесь Никифорова (этанол 96% + эфир) (в настоящее время практически не используется из-за наличия в составе эфира).

Зачем фиксируем?

- Фиксация предохраняет эритроциты от гемолиза (под действием воды при смывании лишней краски) и закрепляет мазок на стекле

Окраска мазков крови

- Мазки крови окрашивают краской Романовского.
- Титр краски (разведение) и время окраски определяют экспериментальным путем.
- Обычно используют соотношение краска:дистиллированная вода как 1 к 4
- Время колеблется от 5 минут (свежая краска) до 40 минут и более

Окраска по Романовскому

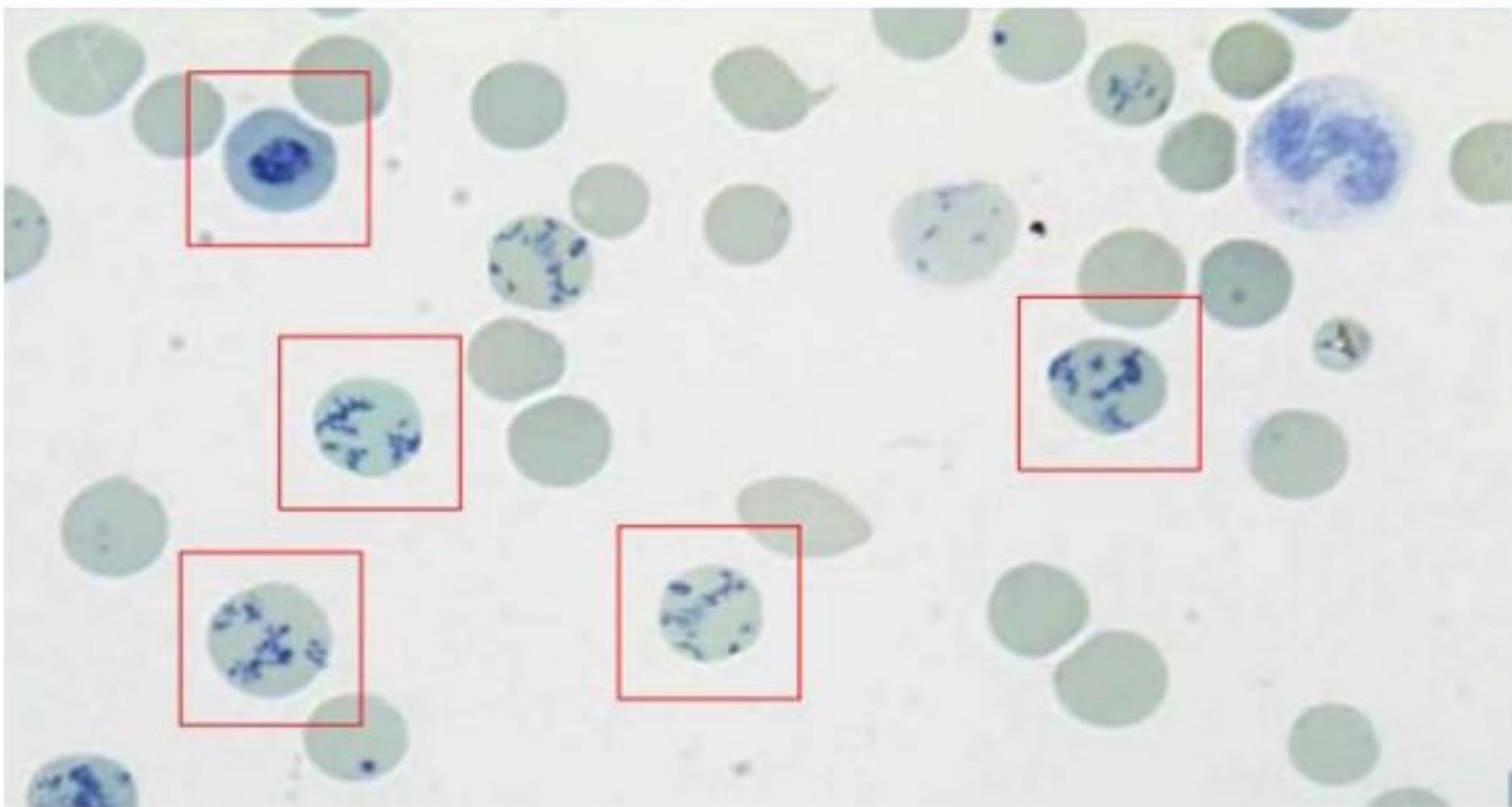
- Д.Л. Романовский — русский ученый-маляриолог, предложивший в 1891г. состав нового красителя — азур.
- Азур состоит из смеси двух красителей: метиленового синего (имеющего щелочную реакцию) и эозина (имеющего кислую реакцию).
- При окраске различные компоненты клетки воспринимают краситель противоположный по реакции (например, цитоплазма лимфоцита имеет кислую реакцию, значит окрасится метиленовым синим в голубой цвет).

NB!

В хорошо окрашенных мазках эритроциты должны иметь розовый цвет, ядра лейкоцитов — фиолетового цвета различной интенсивности, нейтрофилы, эозинофилы и базофилы должны иметь характерную для них окраску зернистости.

Окраска на ретикулоциты

- Метод суправитальной (прижизненной) окраски бриллиантовым крезоловым синим
- Зернистая субстанция ретикулоцитов окрашивается в фиолетово-синий цвет, выделяясь на зеленовато-голубом фоне эритроцитов.
- В пробирке смешивают кровь с 1%-ным бриллиантовым крезоловым в физиологическом растворе в соотношении 1 к 4.
- Пробирку оставляют на 30 минут, затем из капли смеси делают тонкий мазок на предметном стекле, фиксируют и считают ретикулоциты на 1000 эритроцитов.



ПОДСЧЕТ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФОРМУЛЫ

- Просматривают мазок крови под малым увеличением (объектив - 90х, окуляр - 7х или 10х).
- Подсчет лейкоцитов и оценка морфологии эритроцитов допустимы только в тонкой части мазка, где эритроциты лежат одиночно, а не сложены в «монетные столбики».
- Лучше считать в тонком месте («метелка»), где хорошо видна структура клеток.

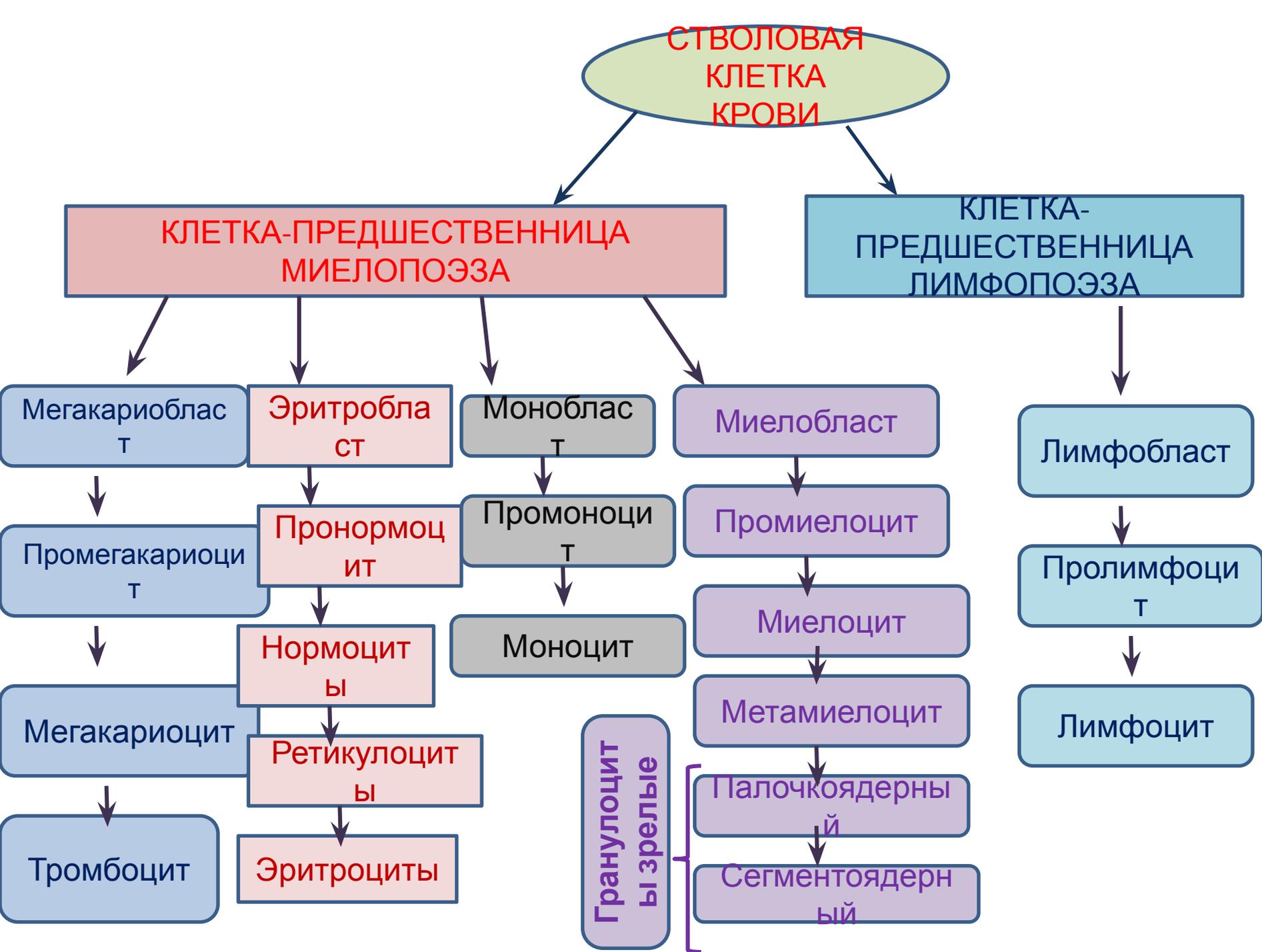
ПОДСЧЕТ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФОРМУЛЫ

- Подсчет лейкоцитов ведут, отступая 2-3 поля зрения от края мазка, по зигзагу (по линии «Меандра»);
- 3-5 полей зрения вдоль края мазка, затем 3-5 полей зрения под прямым углом к середине мазка, потом 3-5 полей зрения параллельно краю мазка и вновь под прямым углом возвратиться к краю мазка.
- Такое движение продолжают до тех пор, пока не будет сосчитана половина клеток.
- Затем переходят на противоположную сторону мазка и считают вторую половину клеток.

VISION НЕМА – новая цифровая система автоматизированного анализа



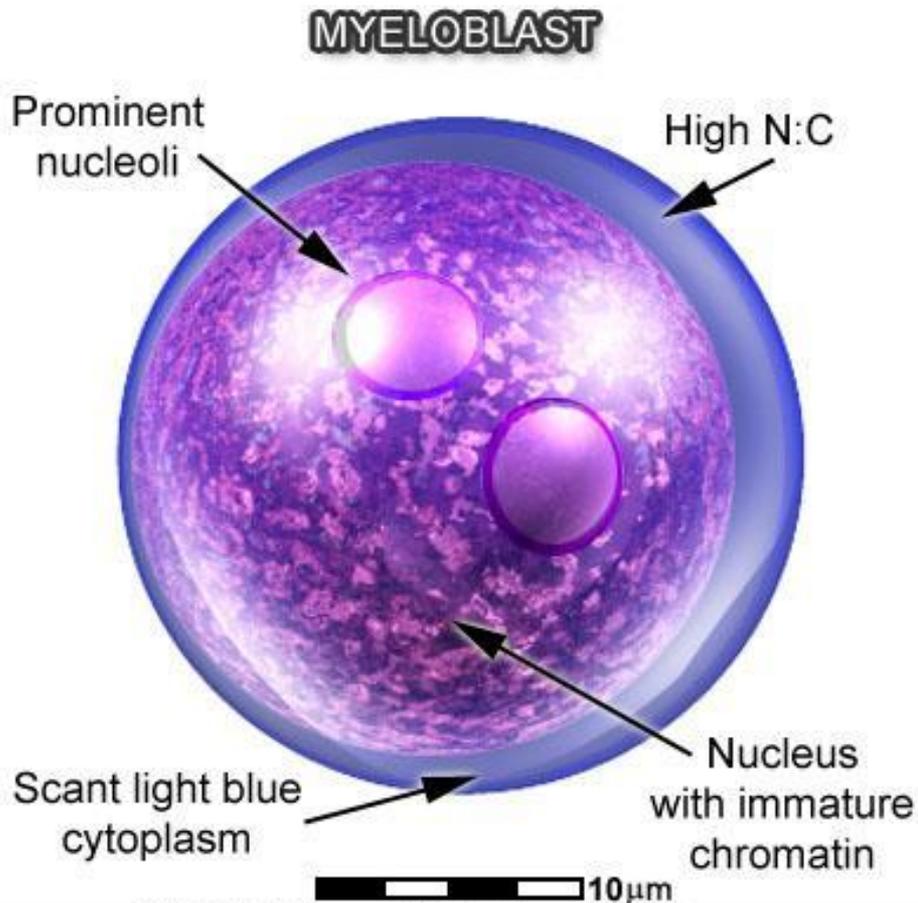
- Моторизованный биологический микроскоп с оптикой «на бесконечность»
- Цифровая камера Vision, с выводом «живого» видео на экране монитора и захватом цифрового микроскопического препарата.
- Персональный компьютер с программным обеспечением Vision, монитор высокого разрешения и цветной принтер.



2.1. Морфология клеток гранулоцитарного ряда

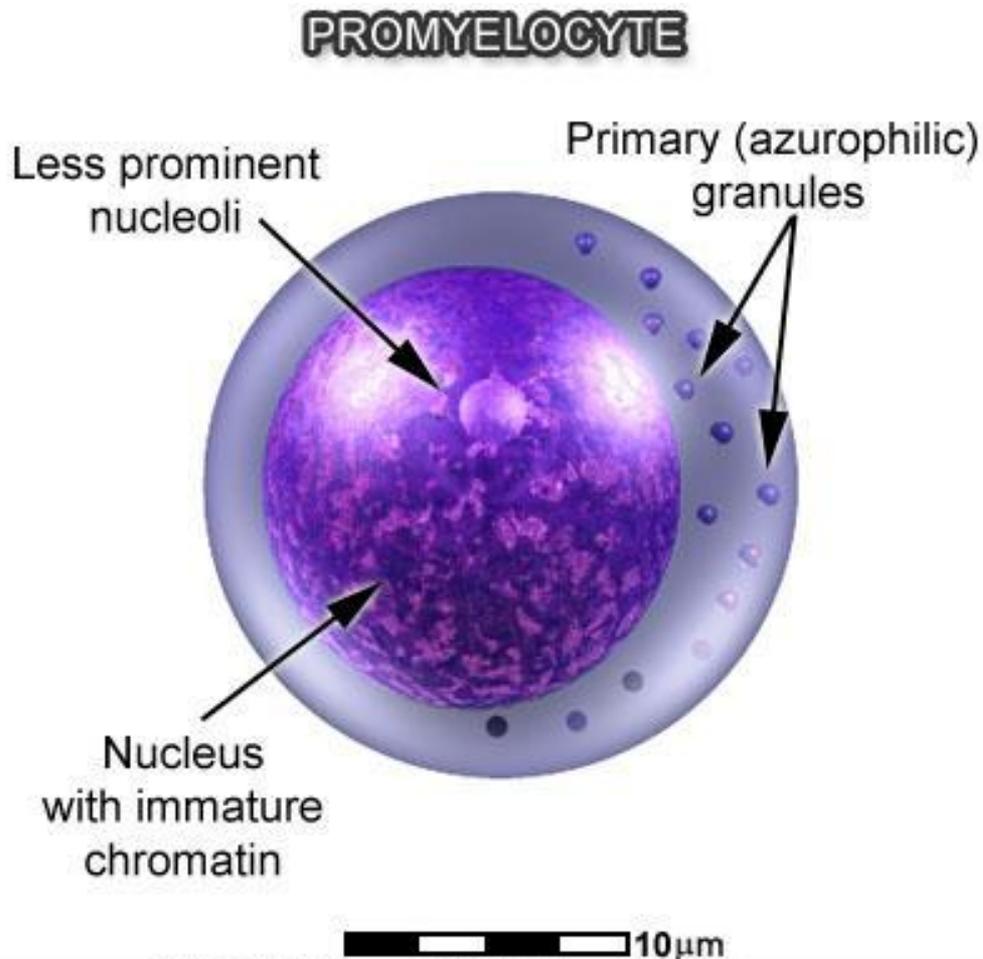
- 1. Миелобласт
- 2. Промиелоцит
- 3. Миелоцит (нейтрофильный, базофильный, эозинофильный)
- 4. Метамиелоцит (юный нейтрофил, эозинофил или базофил)
- 5. Палочкоядерные нейтрофилы
- 6. Сегментоядерные нейтрофилы

Миелобласт



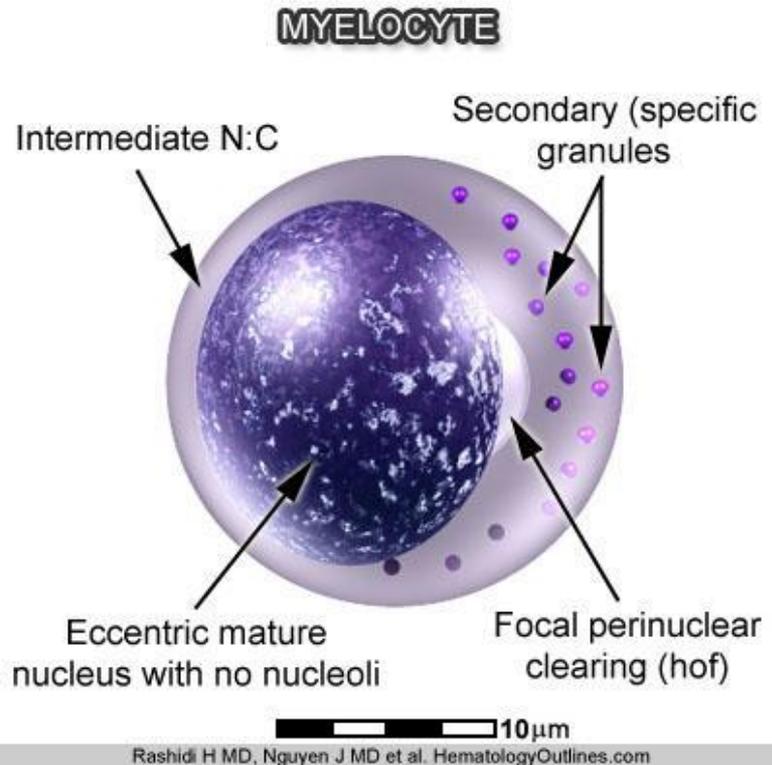
- Крупное ядро
- Нежная структура ядра
- Наличие ядрышек (нуклеол)
- Малый объем цитоплазмы
- Цвет цитоплазмы чаще всего базофильный (синий)

Промиелоцит - «перченная клетка»



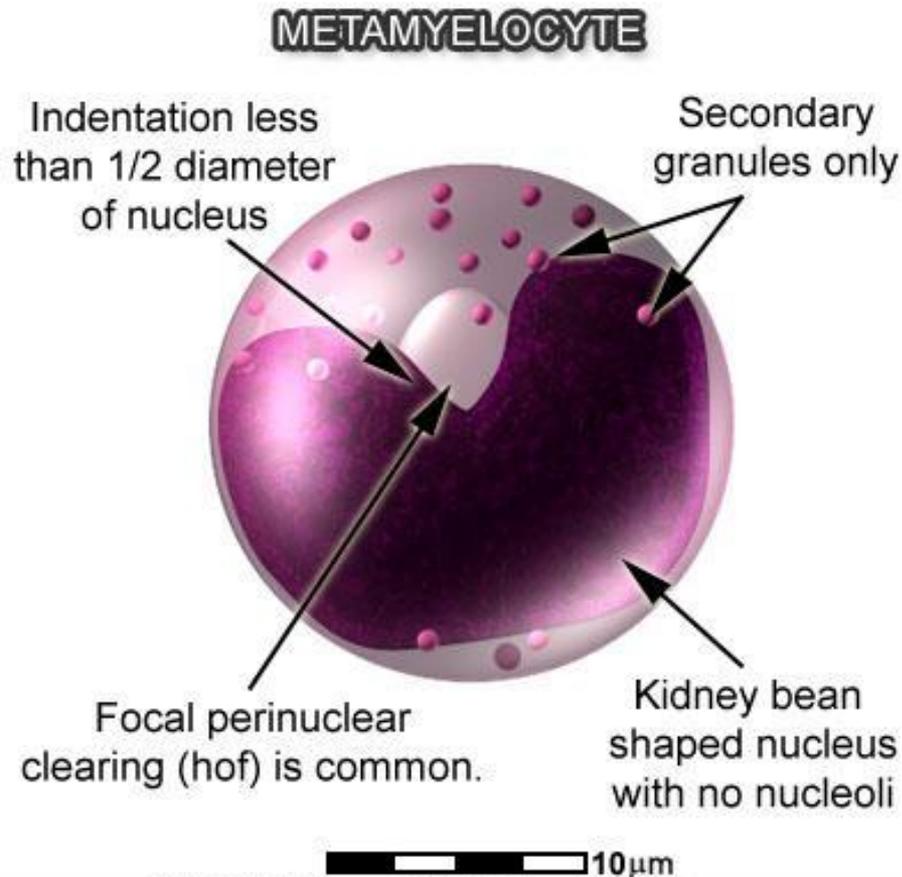
- Ядро меньших размеров, чем у бласта
- Имеются остатки ядрышек (неполноценные ядрышки)
- Появляются участки более грубого хроматина
- В цитоплазме – большое количество **НЕСПЕЦИФИЧЕСКО** **Й ЗЕРНИСТОСТИ**

Миелоцит – «чесаная клетка»



- Ядро грубой структуры с участками грубого (зрелого) хроматина, который чередуется с участками более нежного хроматина - «чесаная» клетка
- В цитоплазме появляется **СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЗЕРНИСТОСТЬ**
- Выделяют миелоциты нейтрофильные, базофильные и эозинофильные

Метамиелоцит

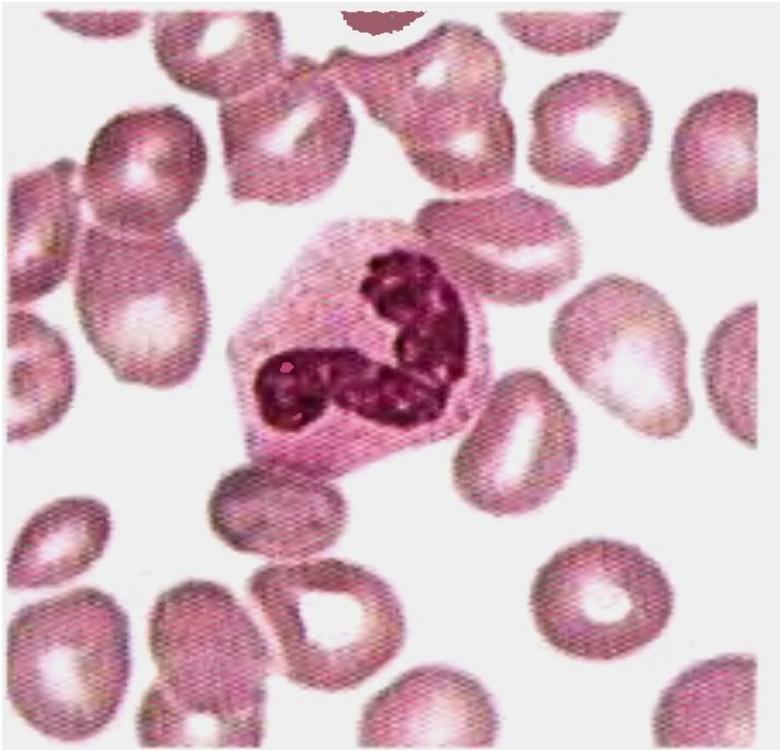


- Ядро становится более компактным и принимает бобовидную или почкообразную форму
- Наличие специфической зернистости

Метамиелоцит

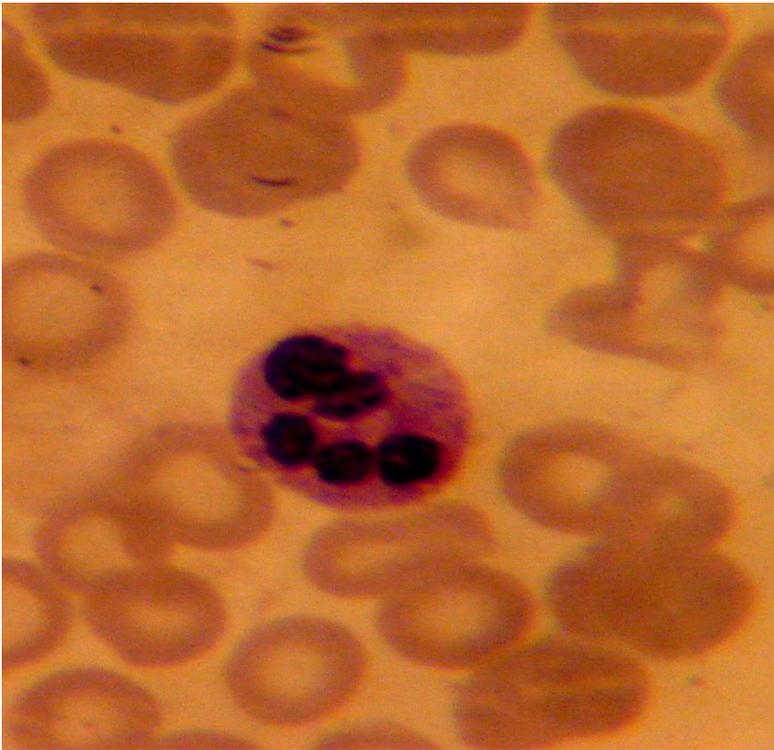


Палочкоядерный нейтрофил



- Ядро палочковидной формы
- Наличие специфической зернистости

Сегментоядерный нейтрофил



- Ядро сегментировано
- Наличие специфической зернистости

Дифференцировка палочкоядерных нейтрофилов от сегментоядерных

Варианты сегментоядерных нейтрофилов:

1. Т- или Y-образная форма ядра:



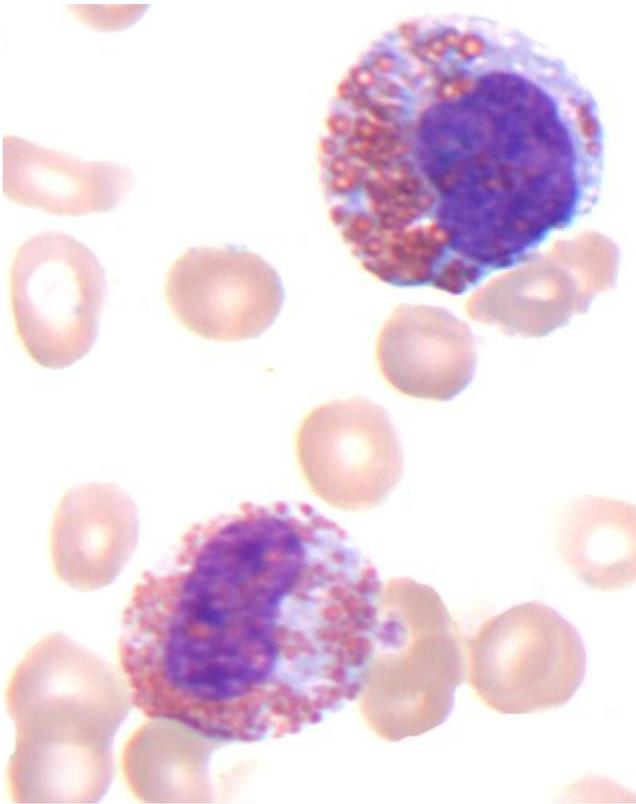
2. Наслаивающиеся сегменты:



3. Ядро в виде узла:



Эозинофилы



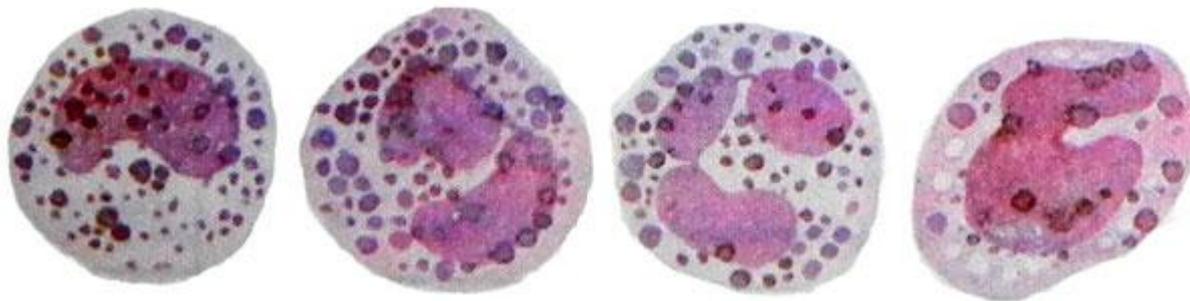
- Ядро может быть сегментировано, но может быть и палочковидной формы
- Специфическая зернистость рыжего цвета

Эозинофилы

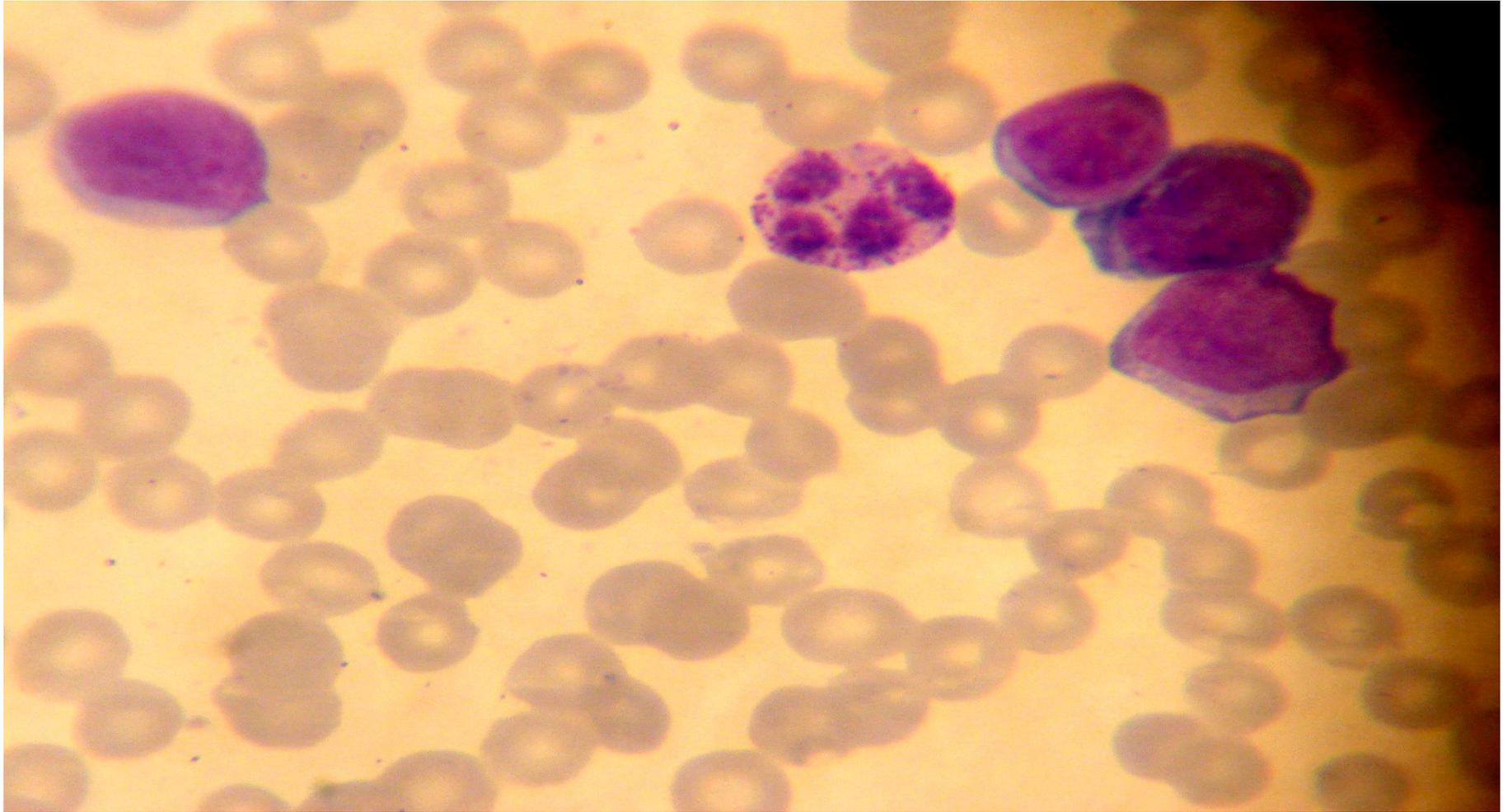


Базофилы

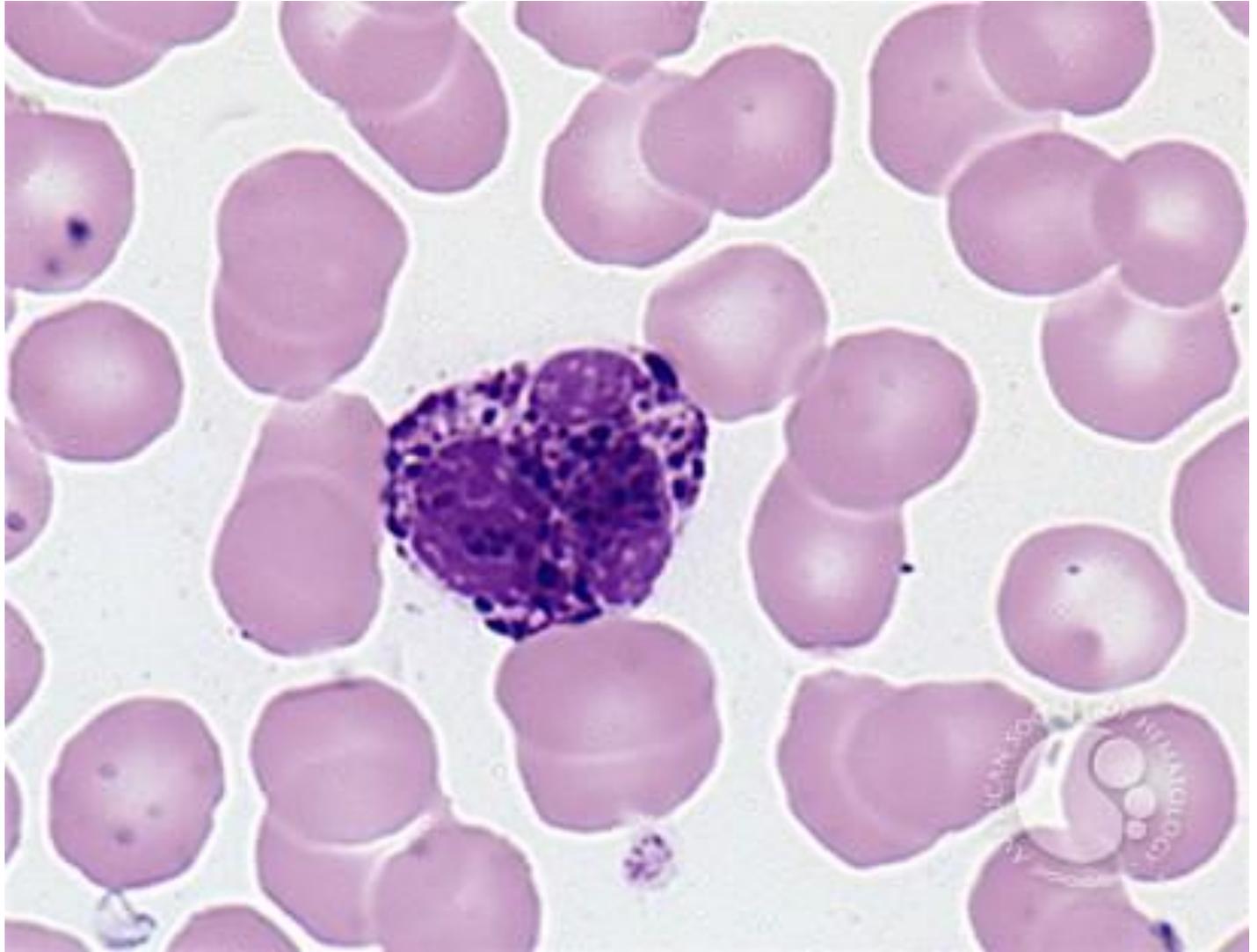
- Ядро может быть сегментировано, но может быть и палочковидной формы
- Специфическая зернистость темно-фиолетового цвета



Базофил и бласты



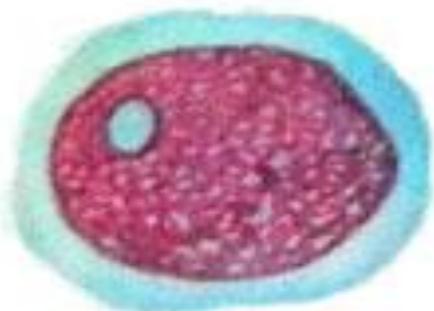
Базофилы



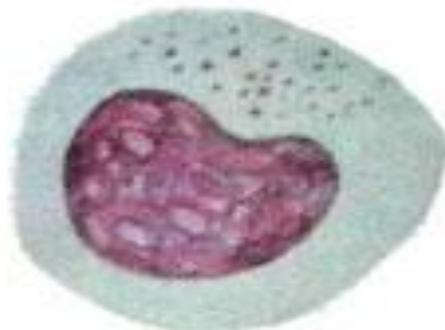
2.2. Морфология клеток МОНОЦИТОПОЭЗА

- На данный момент регистрируется много лейкозов моноцитарного происхождения, как острых, так и хронических
- Важно дифференцировать клетки данного ряда
 - Монобласт
 - Промоноцит
 - Моноцит
- На данный момент гематологи рекомендуют при микроскопии промоноциты относить к монобластам

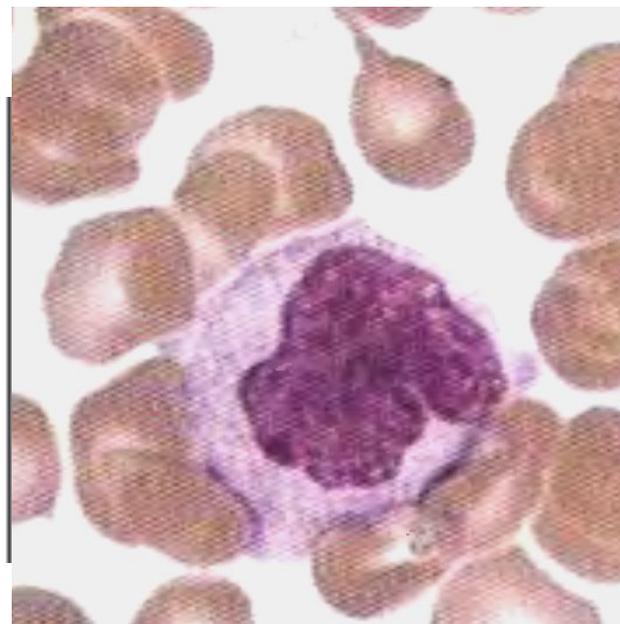
Моноциты



Монобласт

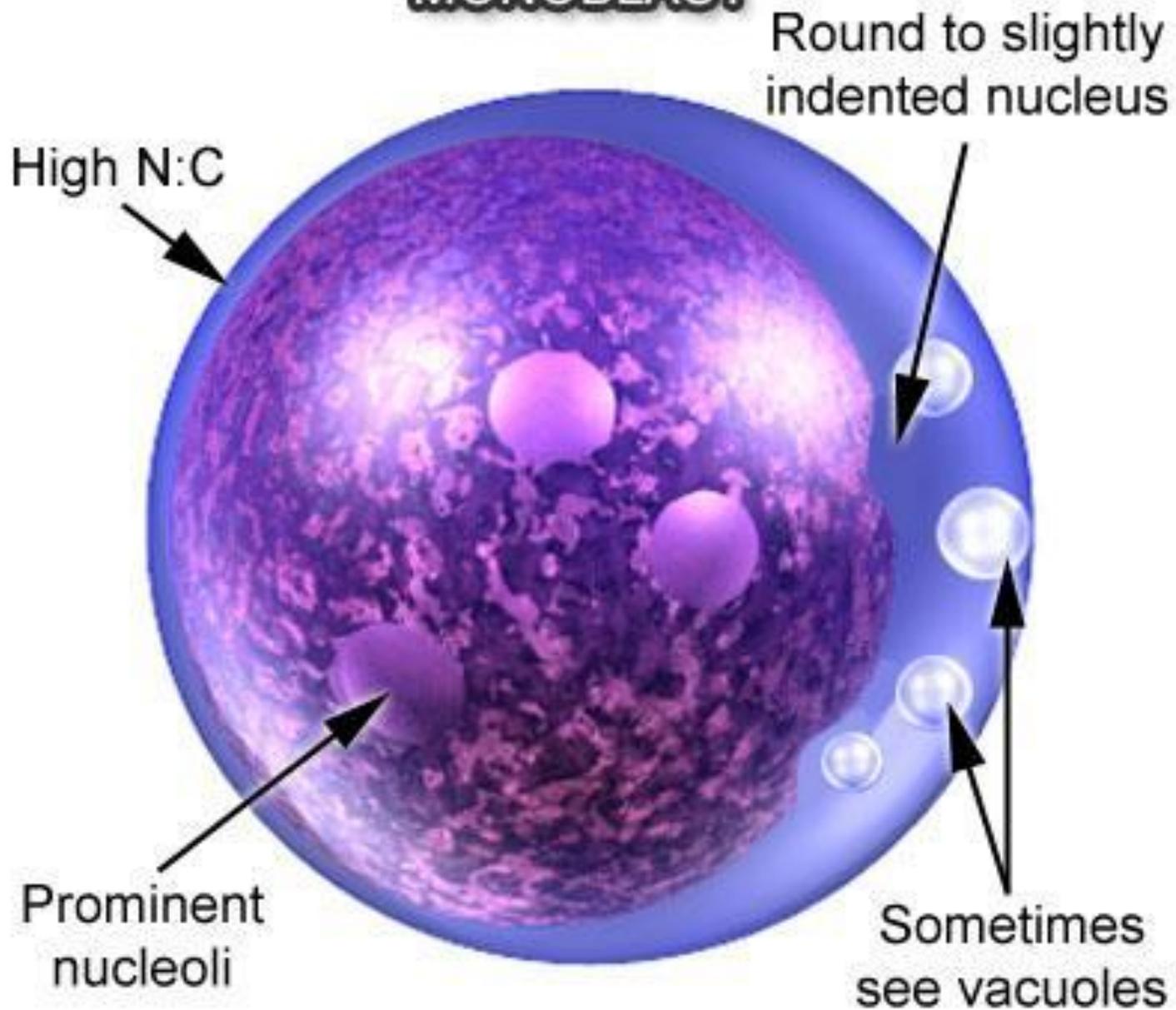


Промоноцит



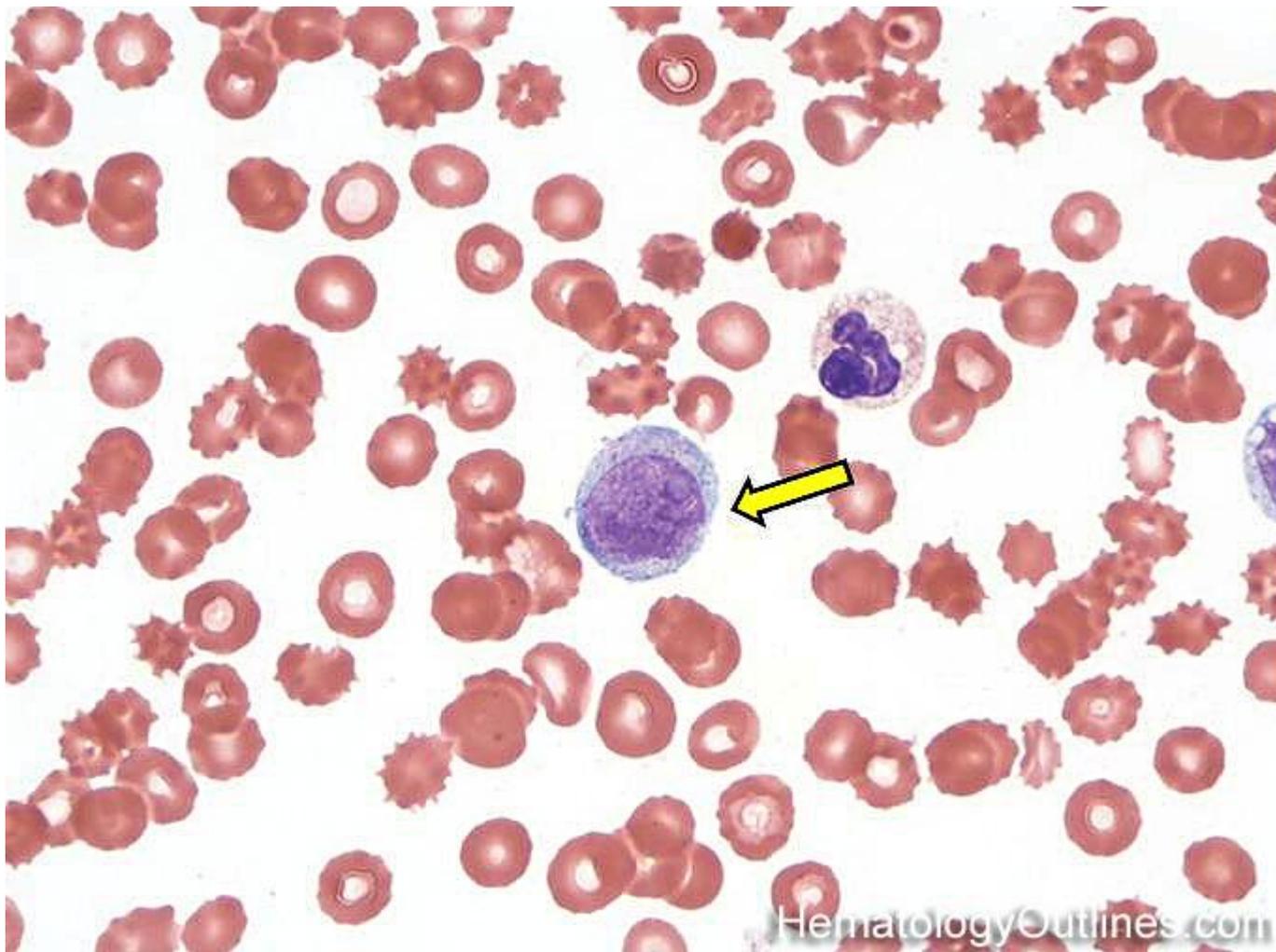
- В процессе дифференциации промоноцита в моноцит у ядра появляется бухтообразное вдавление, которое в дальнейшем углубляется.
- *Ядро моноцита* может приобретать самые причудливые формы, иногда оно становится сегментированным, подобно сегментоядерным нейтрофильным гранулоцитам.
- Цитоплазма моноцита чаще всего светло-голубых тонов, содержит пылевидную азурофильную зернистость (цвет Питерского неба, цвет табачного дыма).

MONOBLAST

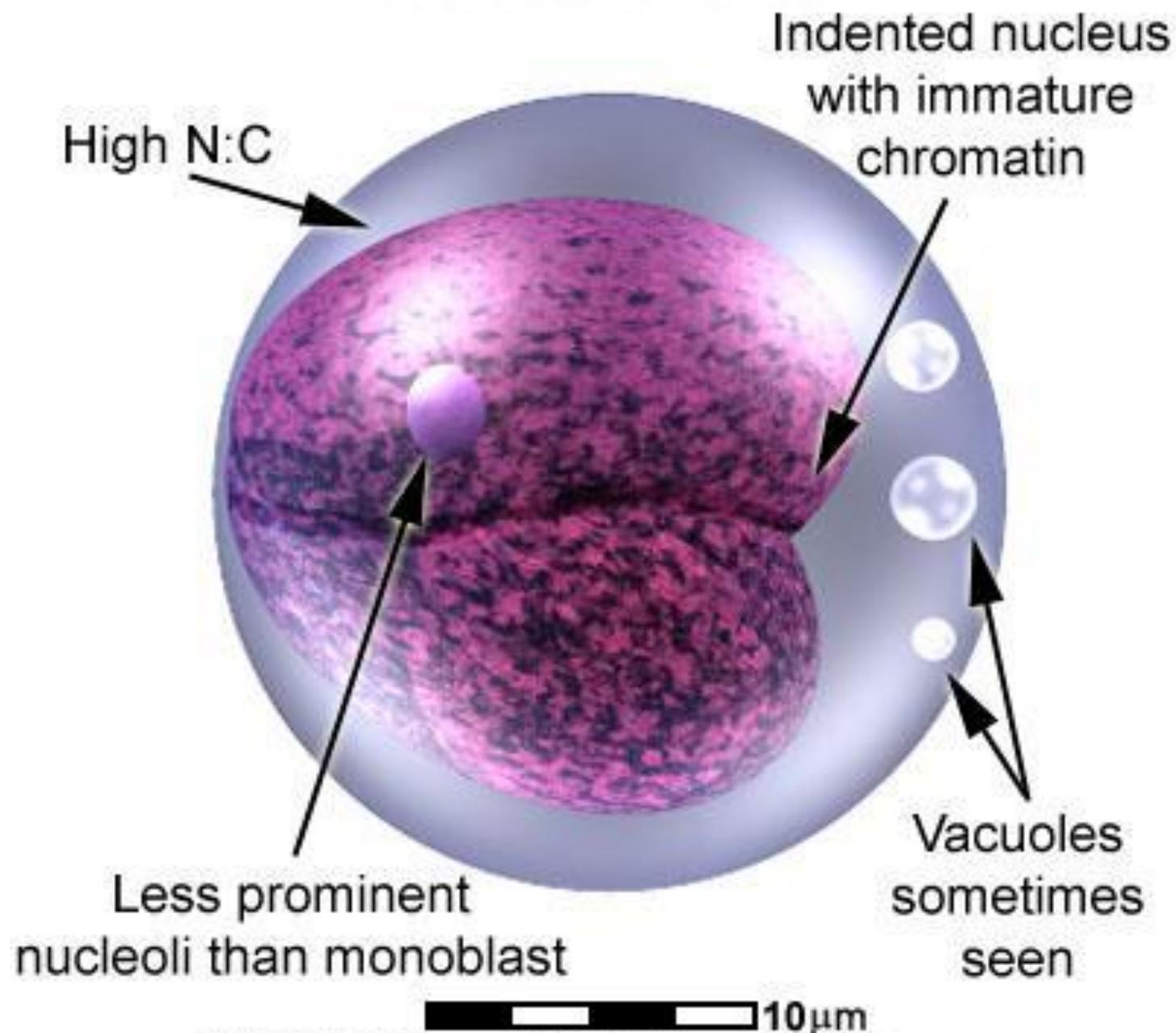


10 μ m

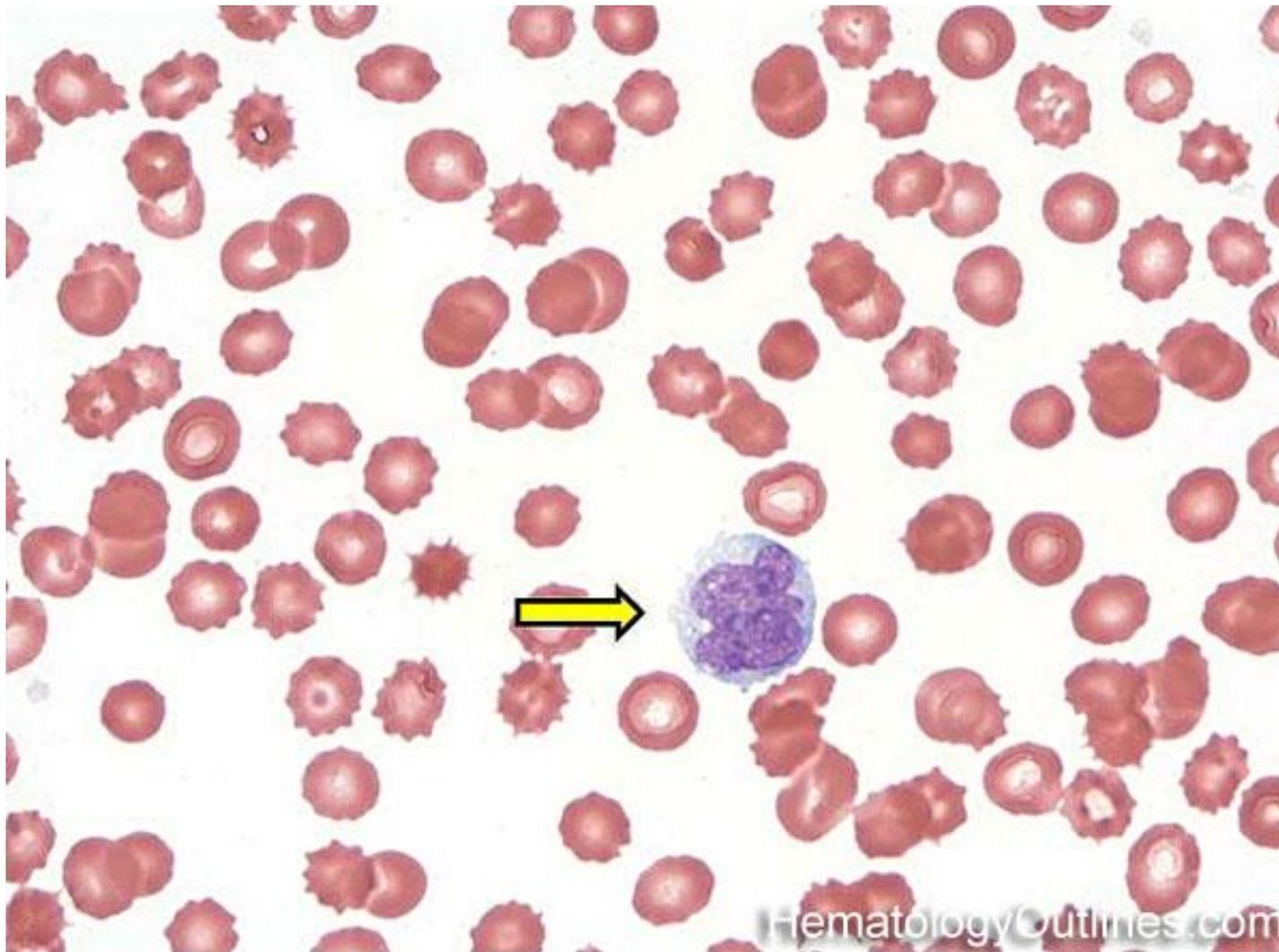
Монобласт



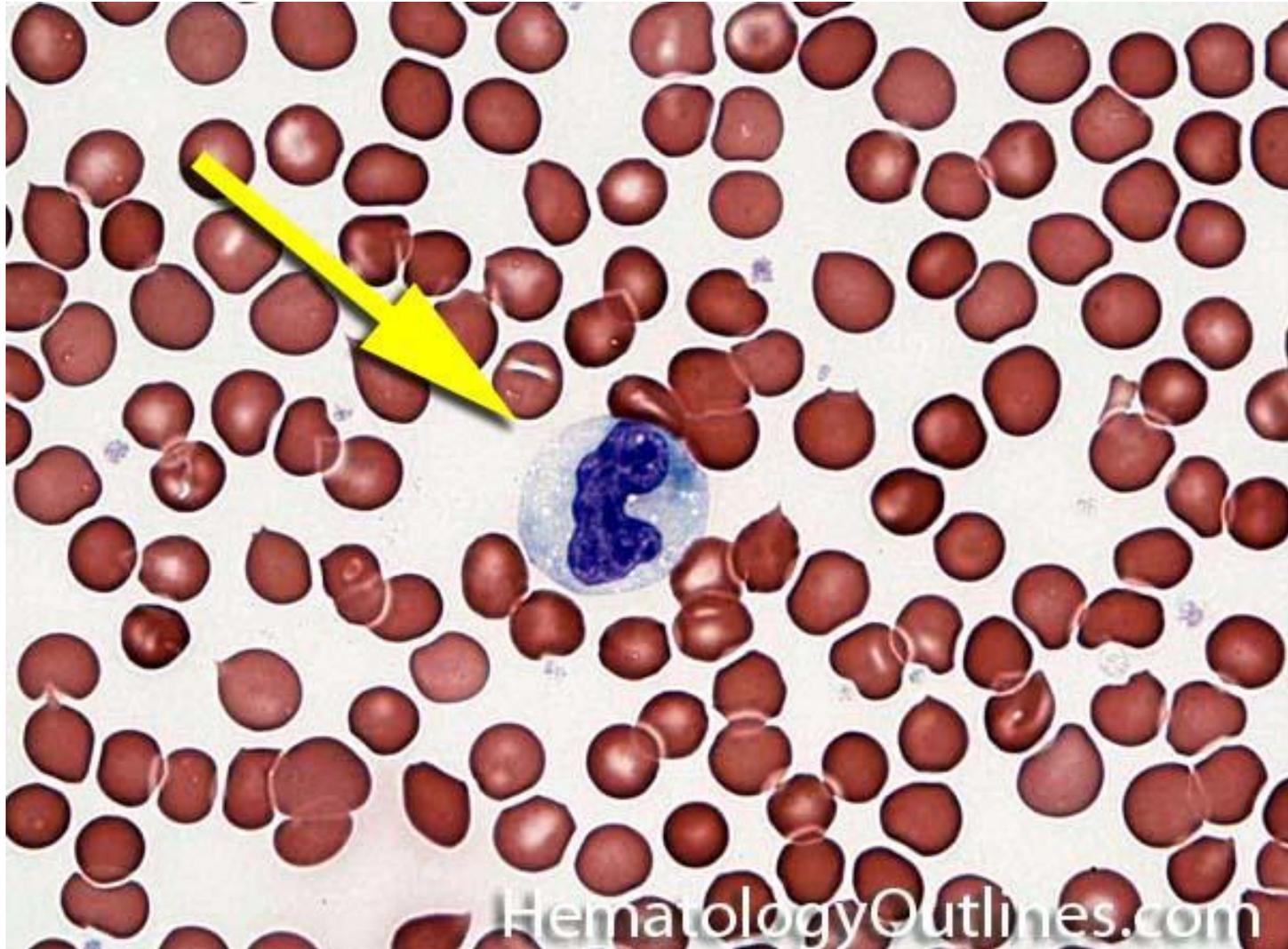
PROMONOCYTE



Промоноцит



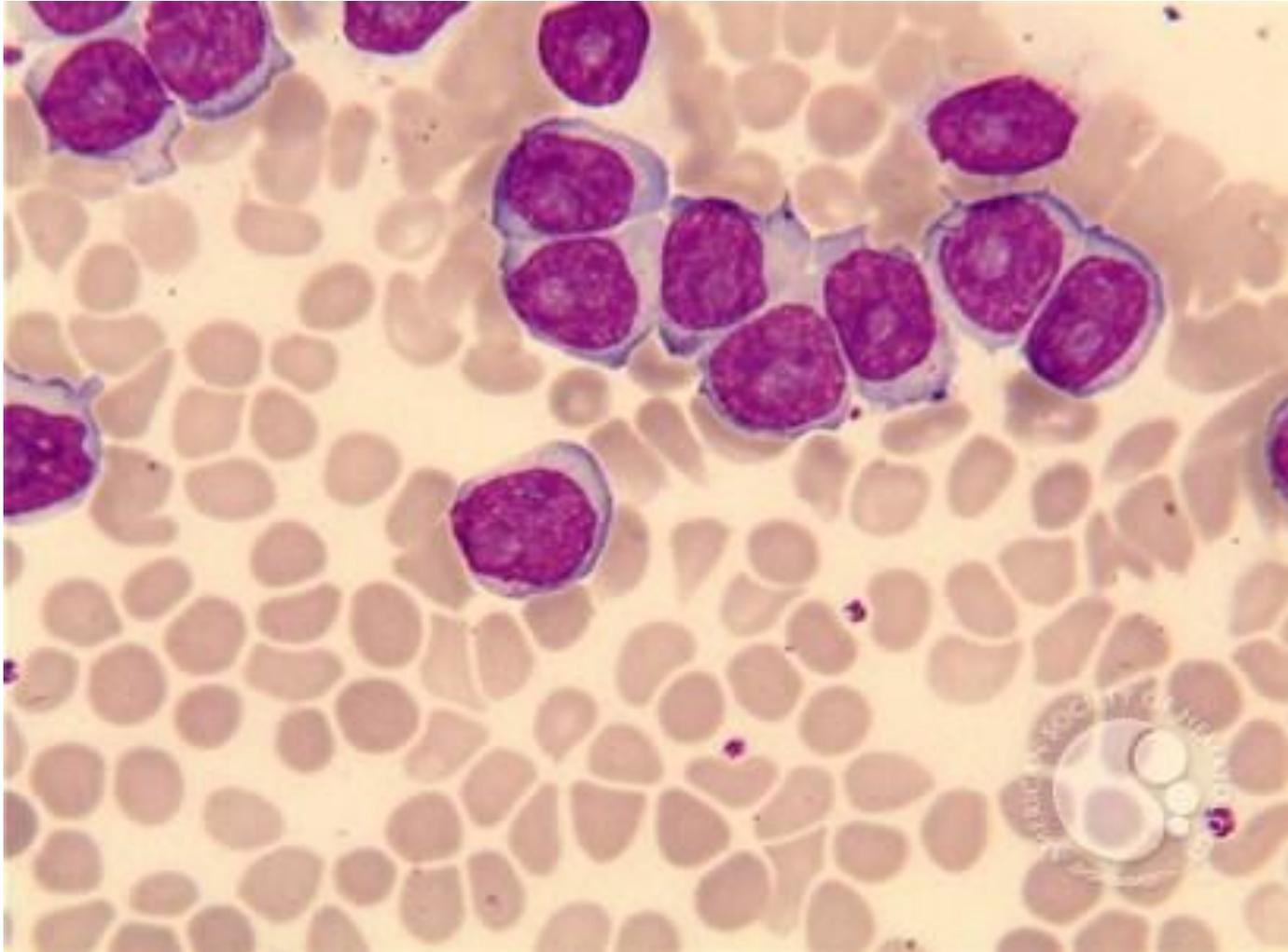
Моноцит



2.3. Морфология клеток лимфоцитарного ряда

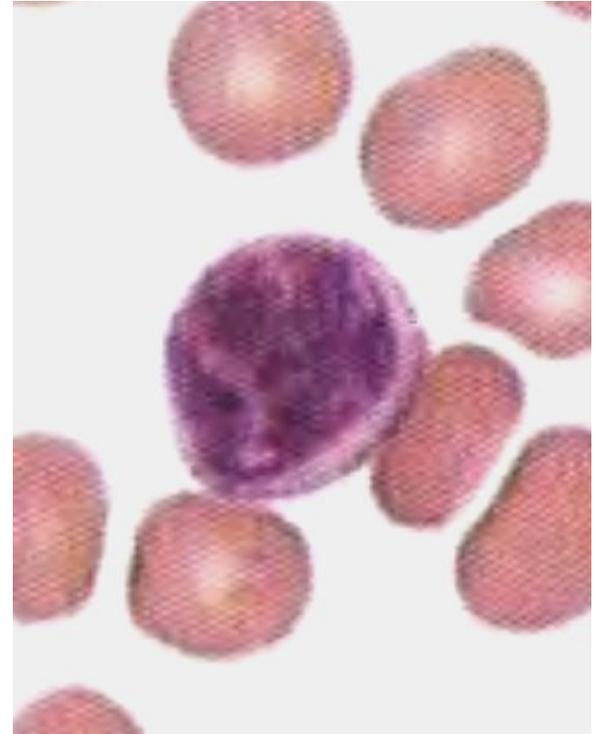
- Лимфобласт
- Пролимфоцит
- Лимфоцит

Пролимфоциты

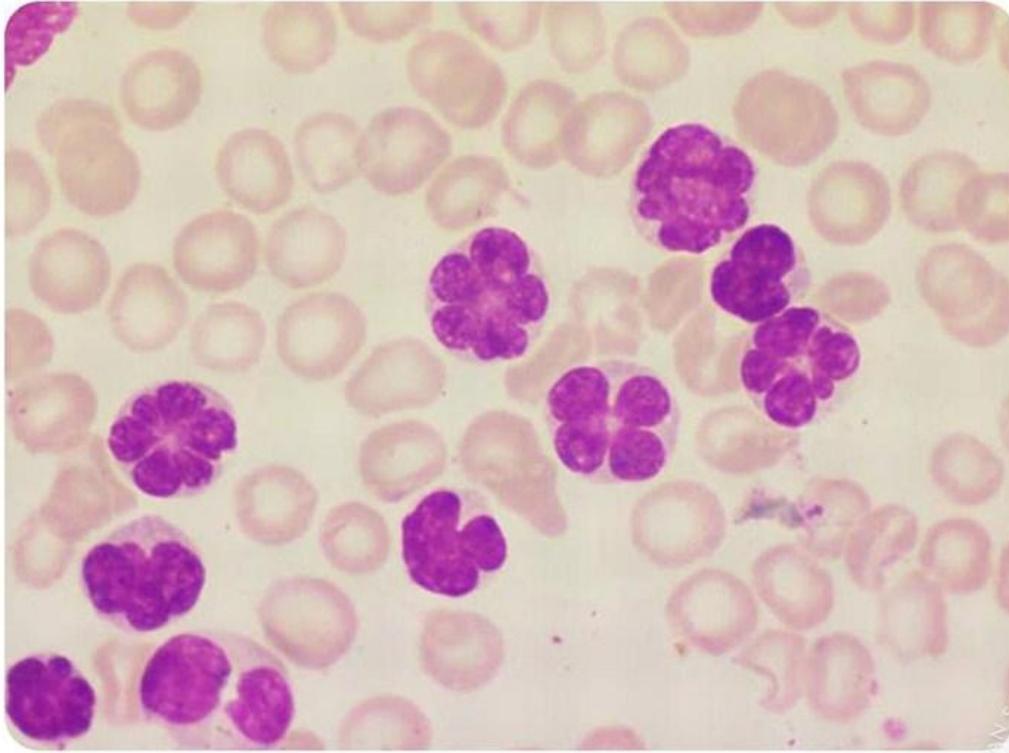


Лимфоциты

- Ядро округлое, занимает большую часть цитоплазмы, расположено в центре или эксцентрично.
- Цитоплазма голубого или синеватого цвета, иногда в ней можно рассмотреть неспецифическую азурофильную зернистость
- Структура ядра – глыбчатая (напоминает рисунок колеса велосипеда).
- Лимфоциты могут быть малые – до 8 мкм, средние – до 12 мкм, большие – более 12 мкм.



70-year-old female presented with 2 weeks of fever, anemia, generalized lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, and skin rashes.



et al. Blood 2010;115:1668-1668



©2010 by American Society of Hematology

Иногда ядро может быть некруглым (форма Ридера)
Такие лимфоциты полноценны в функциональном отношении.
В норме могут встречаться в небольшом количестве: их не
отмечаем отдельно.

Но если их много – обязательно отмечаем.

Причины: инфекционный мононуклеоз, хронический

Морфология плазматических клеток

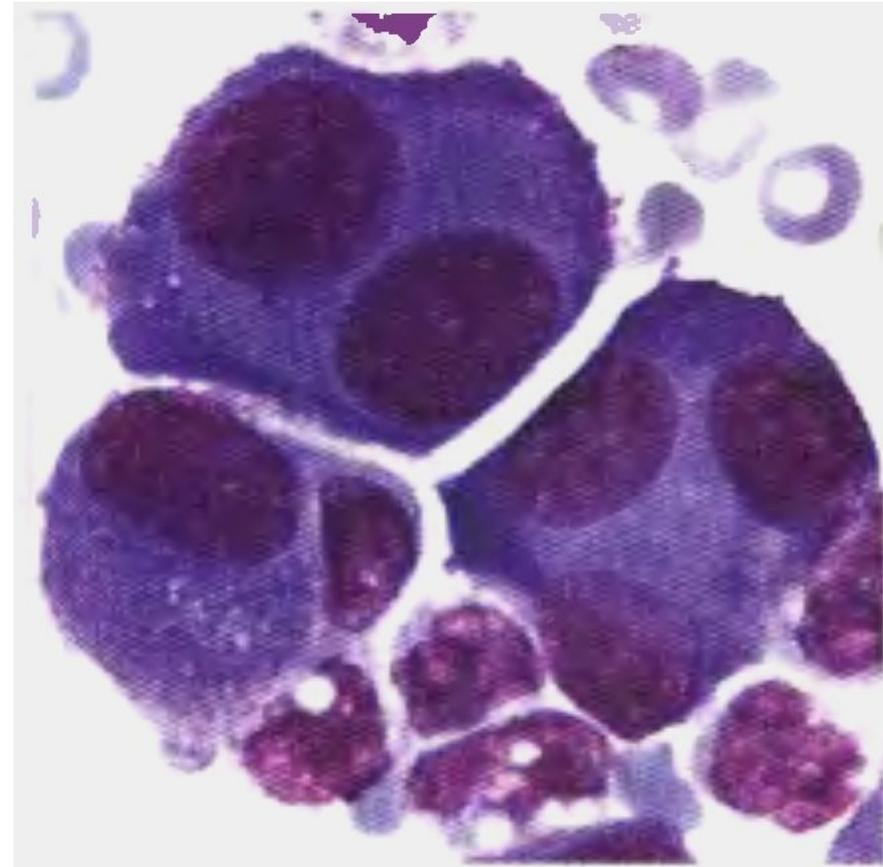
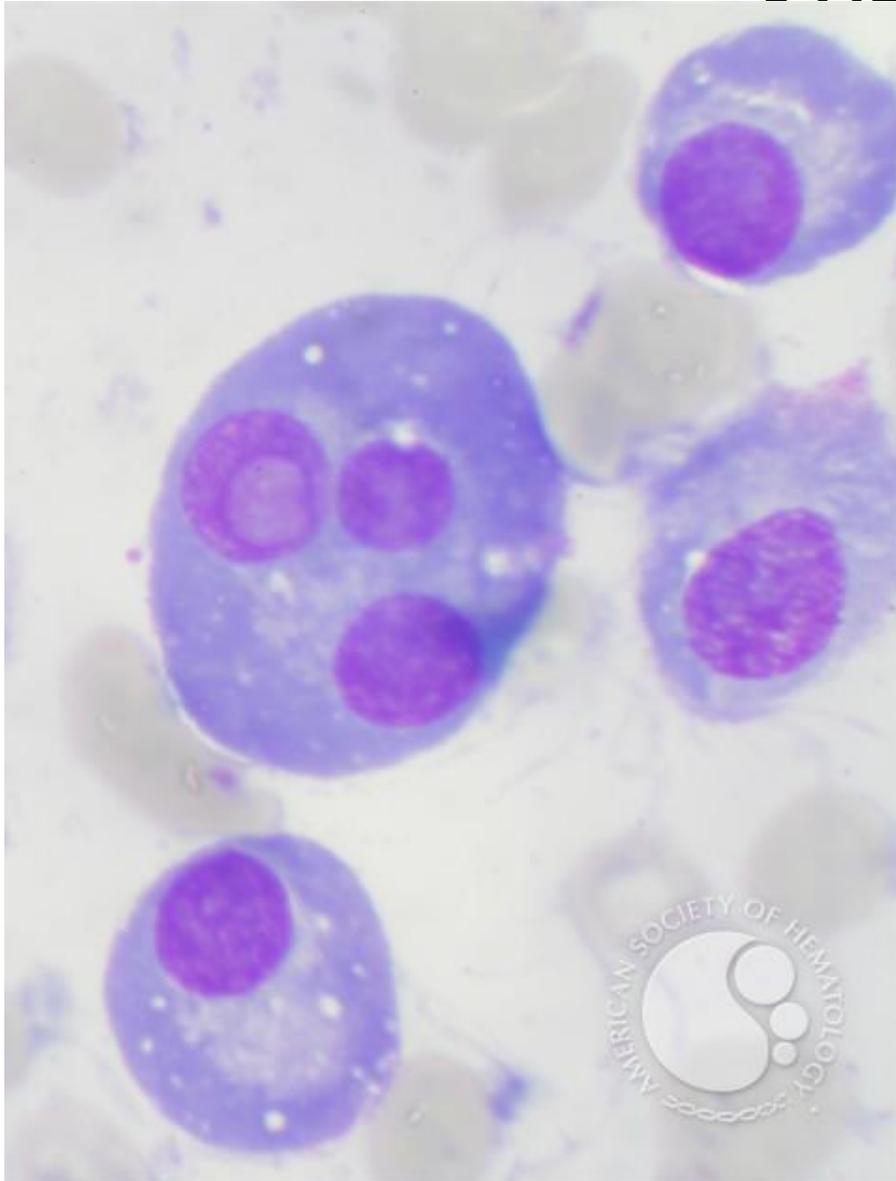
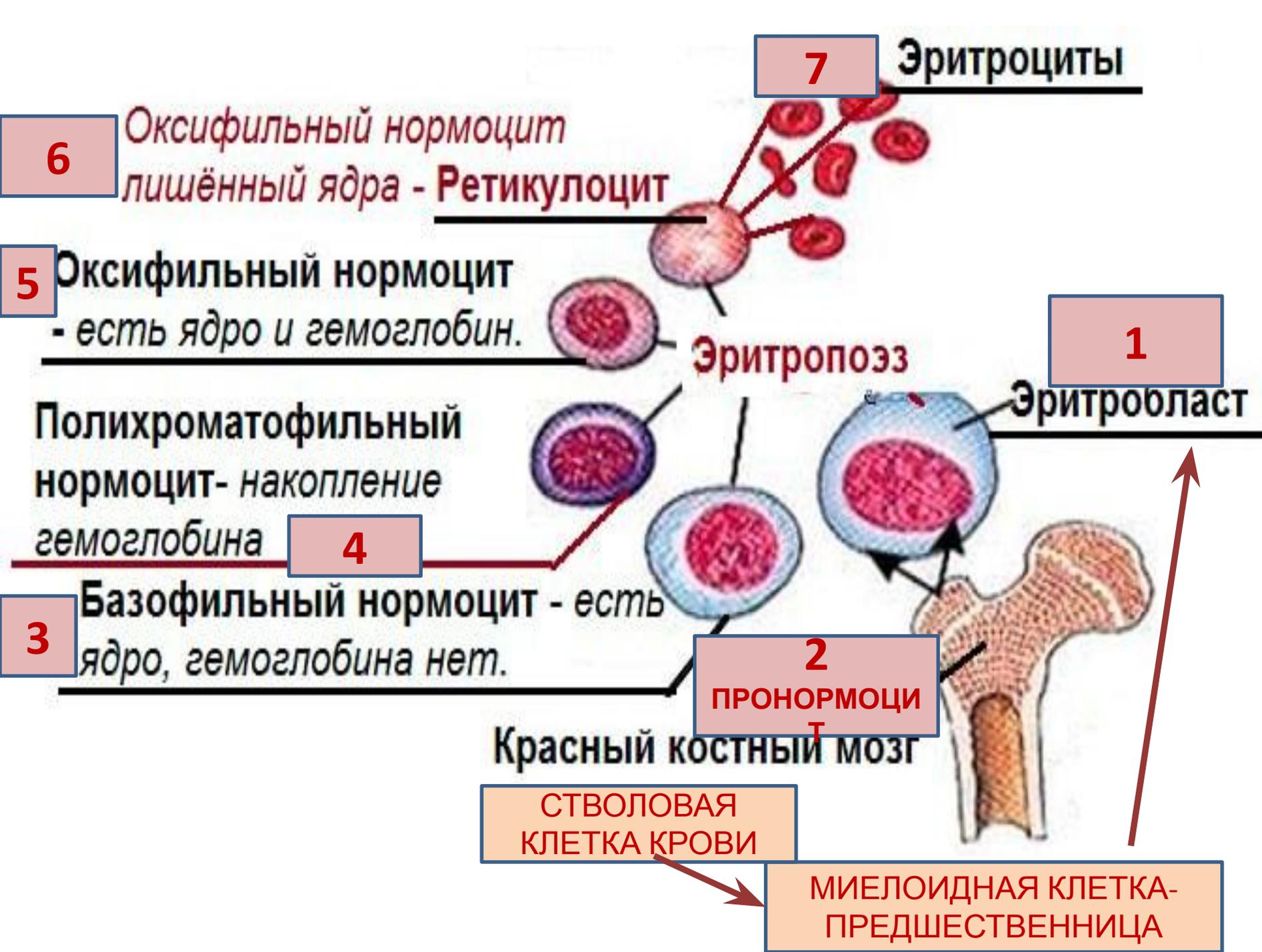


Рис. 14. Многоядерные плазматические клетки. $\times 1000$

2.4 ЭРИТРОПОЭЗ

- Эритробласт
- Пронормоцит
- Нормоцит базофильный
- Нормоцит полихроматофильный
- Нормоцит оксифильный
- Ретикулоцит
- эритроцит



Морфология нормоцитов

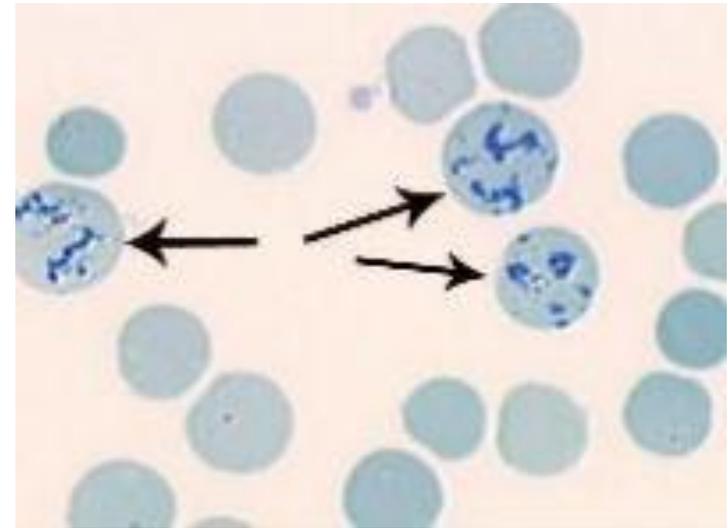
- Базофильный нормоцит – базофильная цитоплазма (синяя), большое ядро грубой структуры, сравнивают с вишневой косточкой
- Полихроматофильный нормоцит – цитоплазма серовато-розового цвета, ядро несколько меньше, но той же грубой структуры
- Оксифильный нормоцит – цитоплазма розового цвета, маленькое ядро грубой

ОСНОВНАЯ ФУНКЦИЯ – НАКОПЛЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА

ПОЯВЛЯЮТСЯ В КРОВИ ПРИ УСИЛЕННОМ КРОВЕОБРАЗОВАНИИ ПРИ ЛЕЙКОЗАХ И ВЫРАЖЕННЫХ АНЕМИЯХ

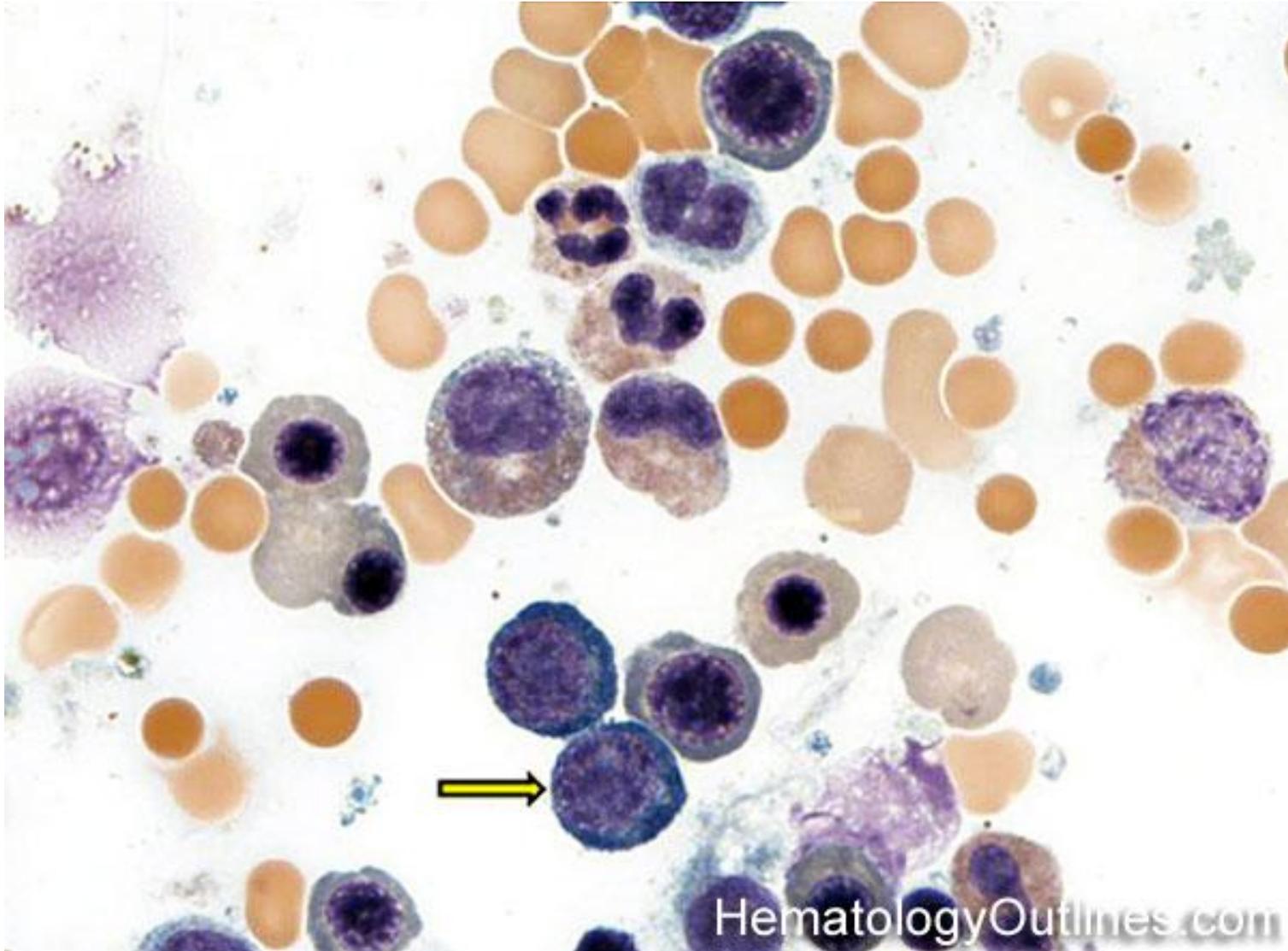
Ретикулоциты

- Это безъядерные клетки розоватого цвета с синеватым отливом (прижизненная окраска бриллиант-крезиловым).
- При микроскопическом исследовании в них видны внутриклеточные структуры, которых нет у эритроцитов, так называемая сетчатая субстанция.
- Активность этих клеток показывает, с какой скоростью в костном мозге идет образование эритроцитов.

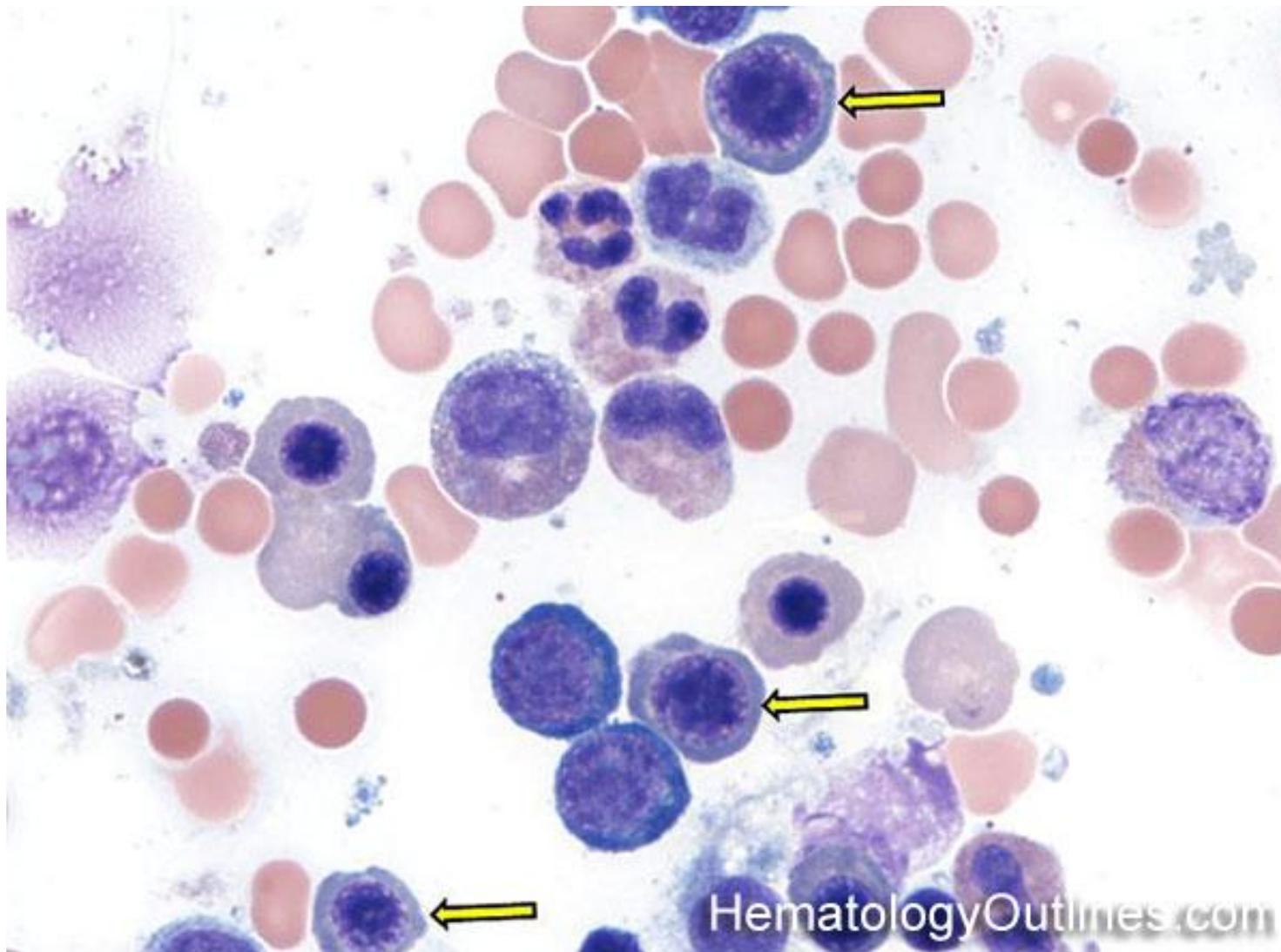


Ретикулоциты выполняют те же функции, что и эритроциты, то есть переносят кислород, но менее эффективно.

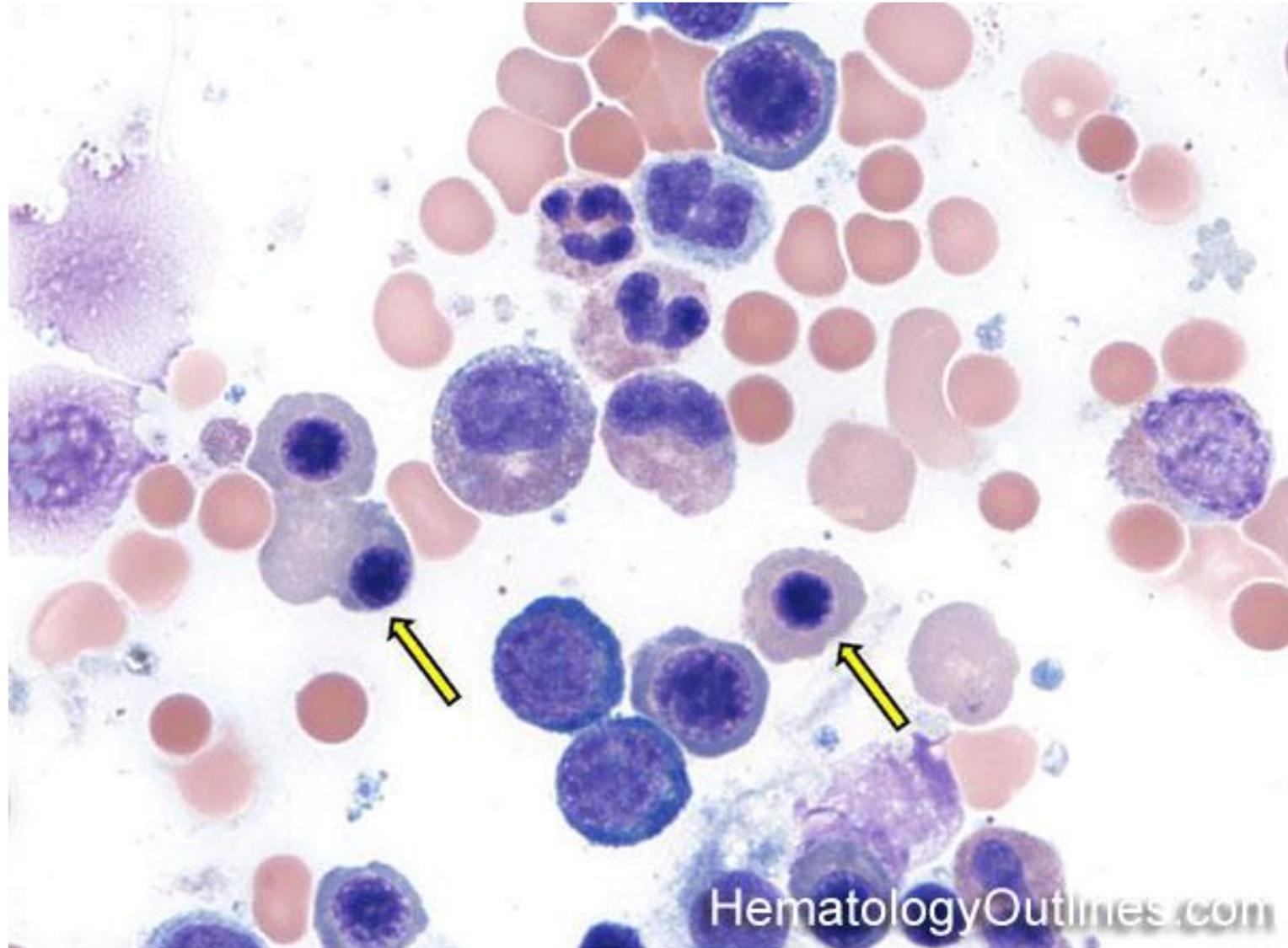
Базофильный нормоцит



Полихроматофильный нормоцит

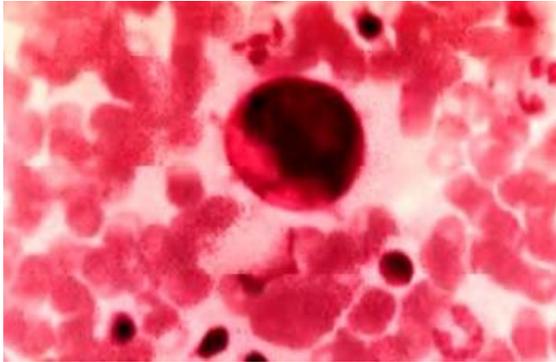


Оксифильный нормоцит

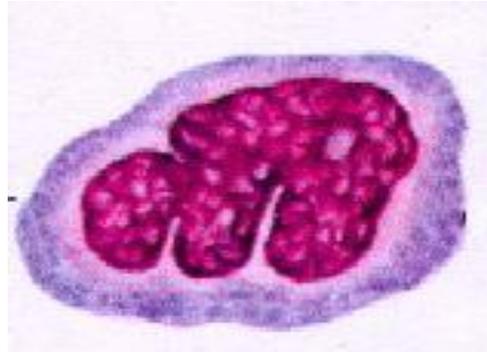


2.5 Тромбоцитопоэз

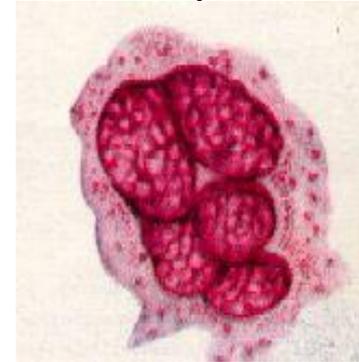
Мегакариобла



Промегакариоци



Мегакариоци



Тромбоцит



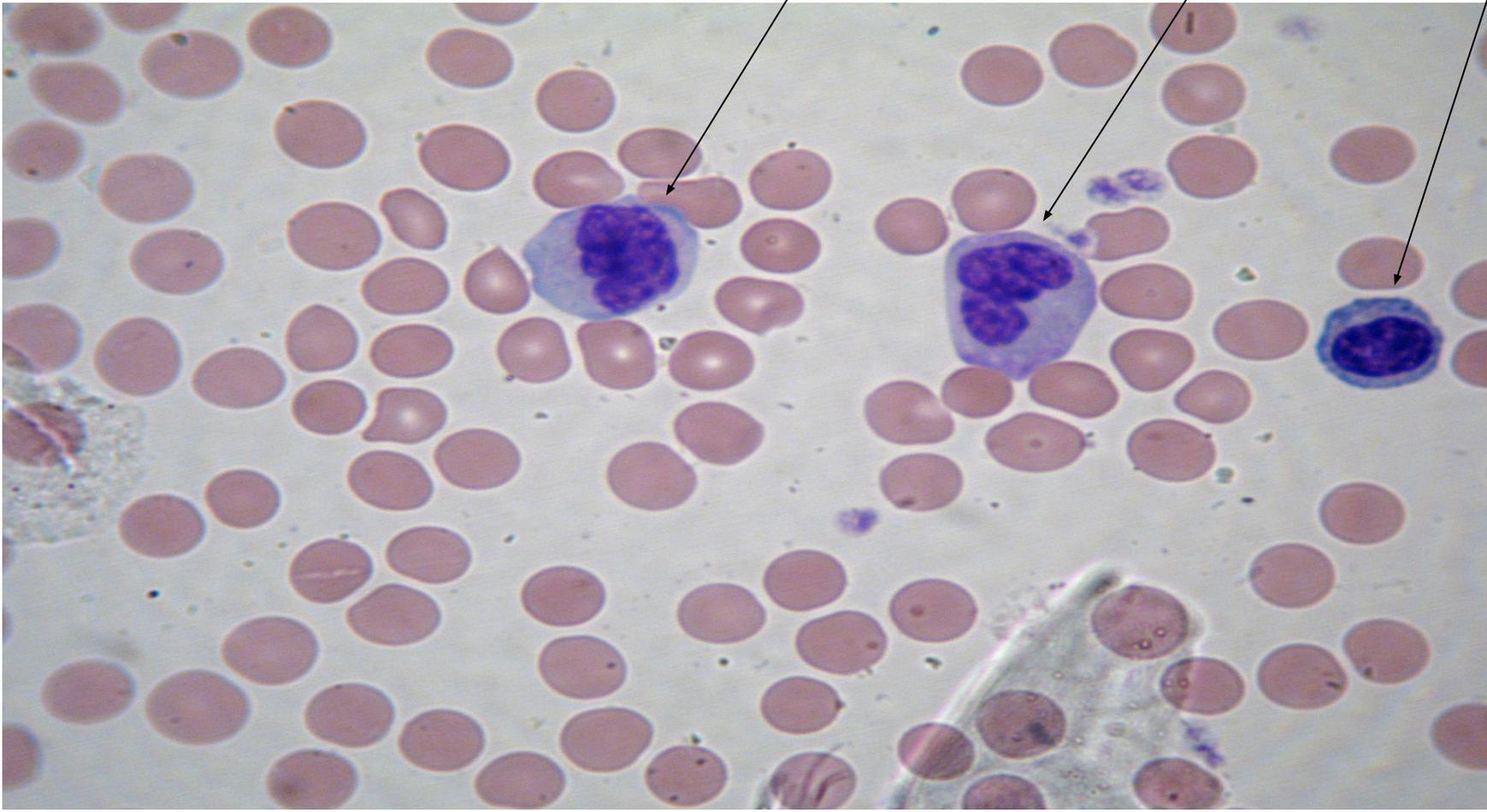
ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ ЗАКРЕПЛЕНИЕ ПРОЙДЕННОГО МАТЕРИАЛА

- НАЗОВИТЕ КЛЕТКИ

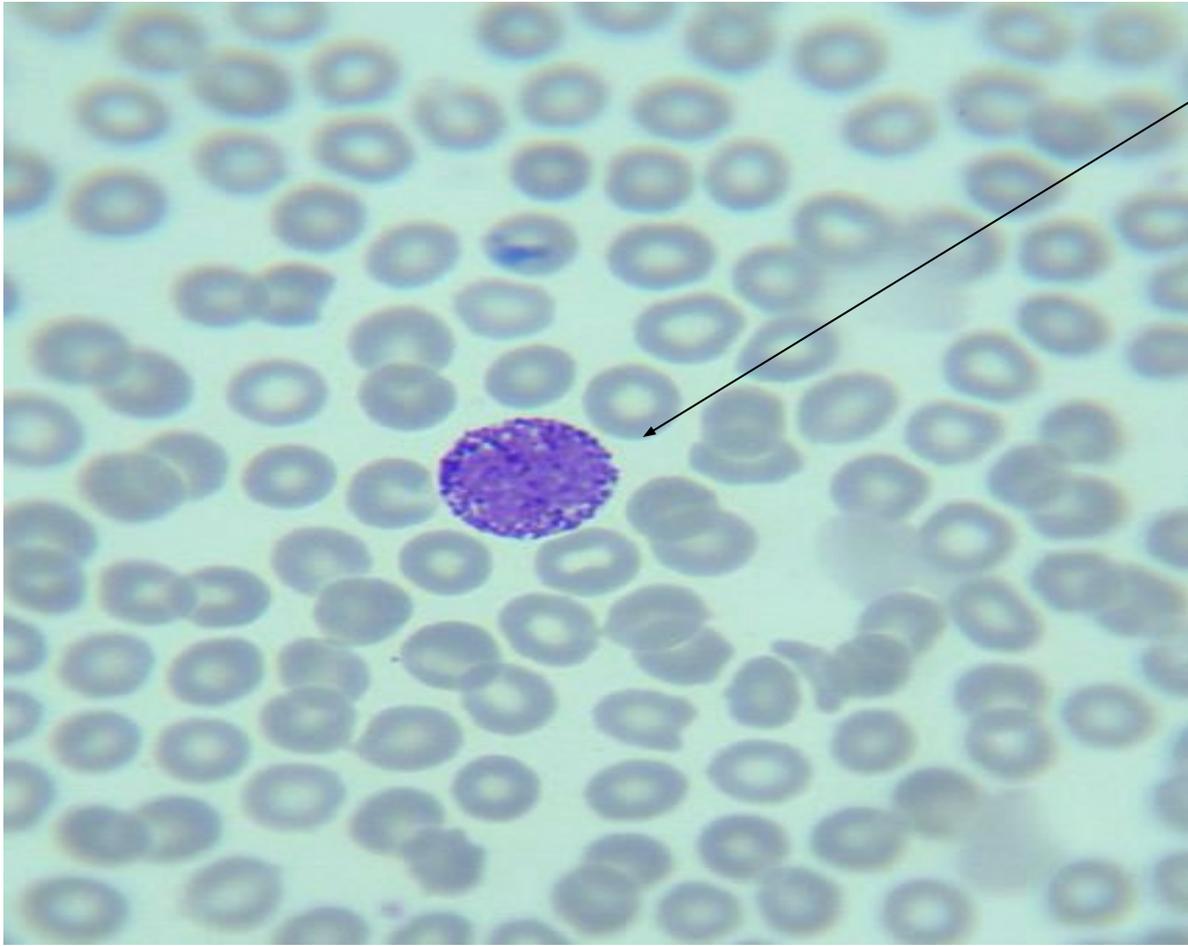
1

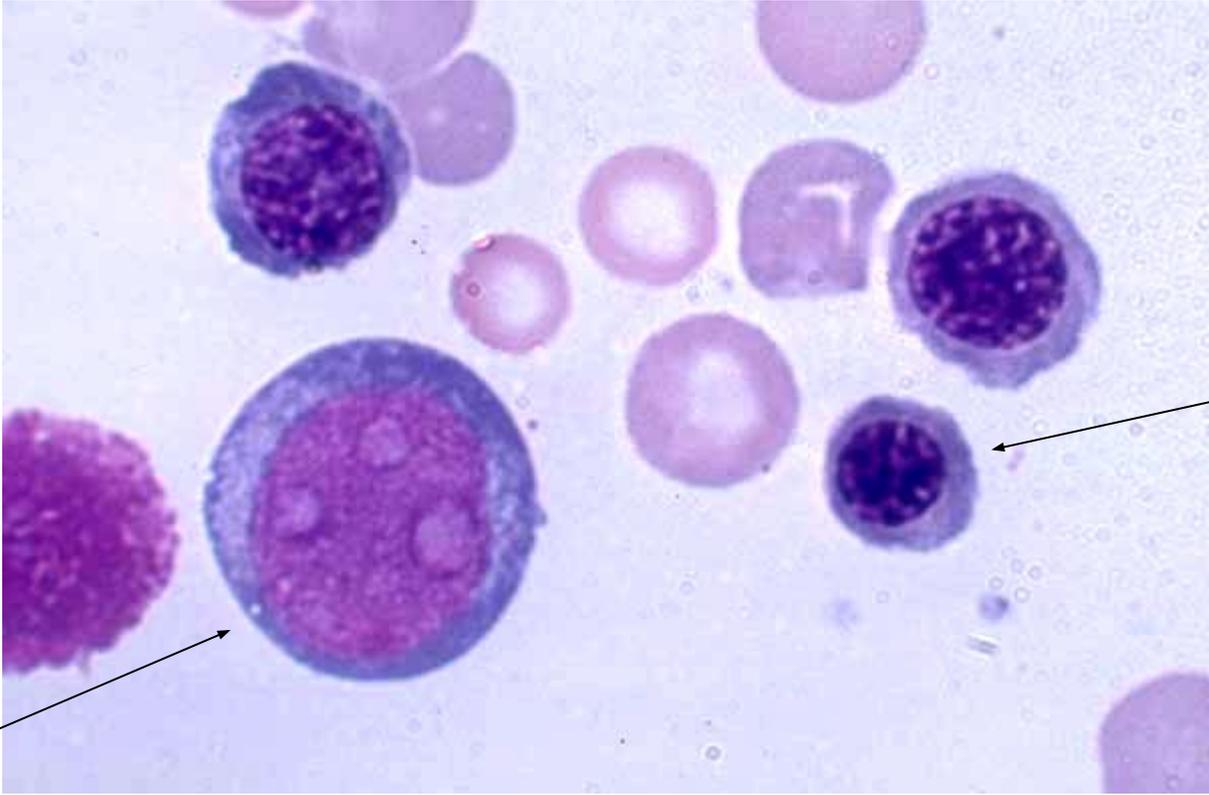
2

3



4





5

6

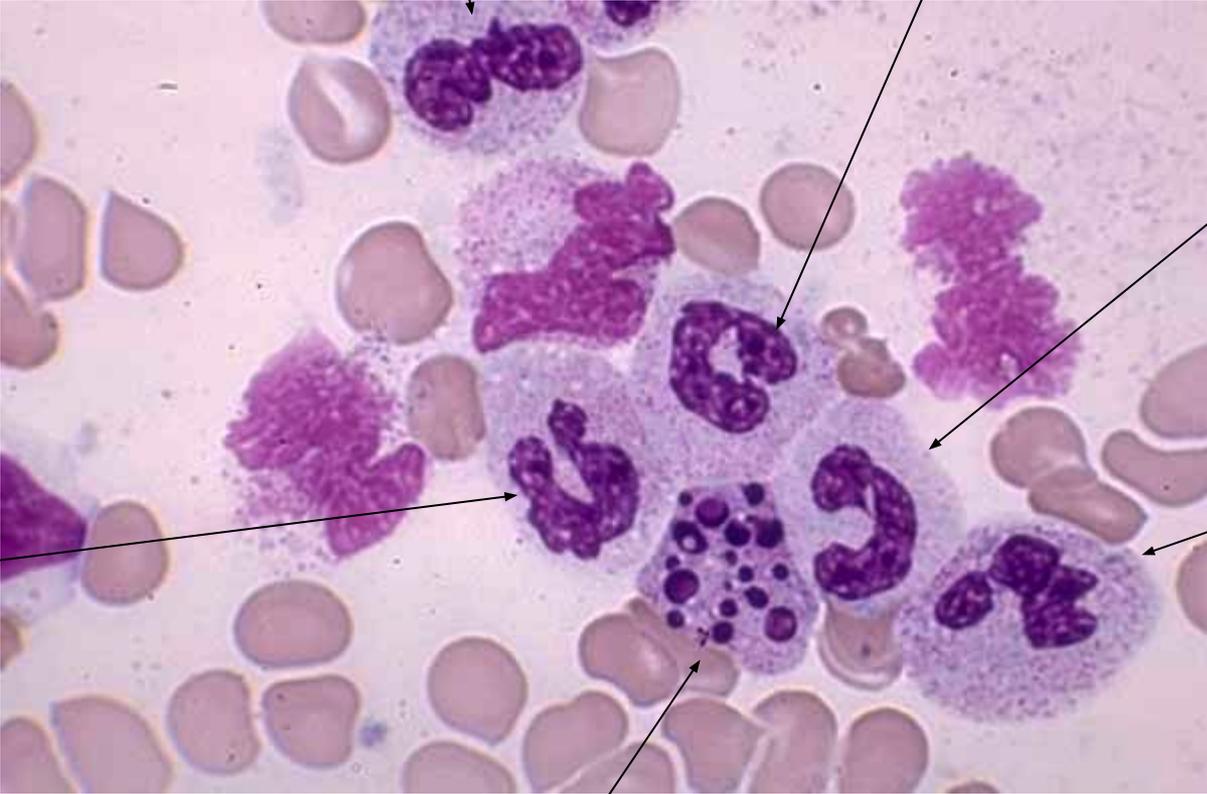
7

8

9

10

12



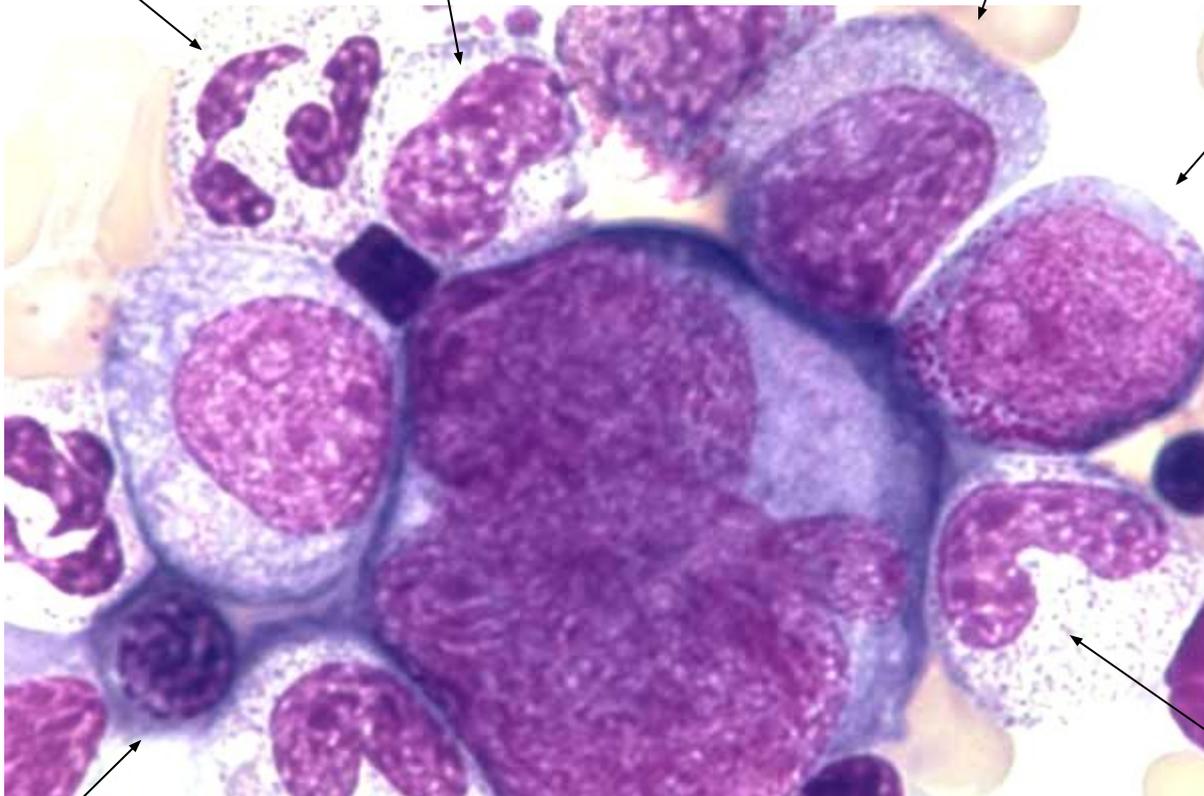
11

15

16

17

18



21

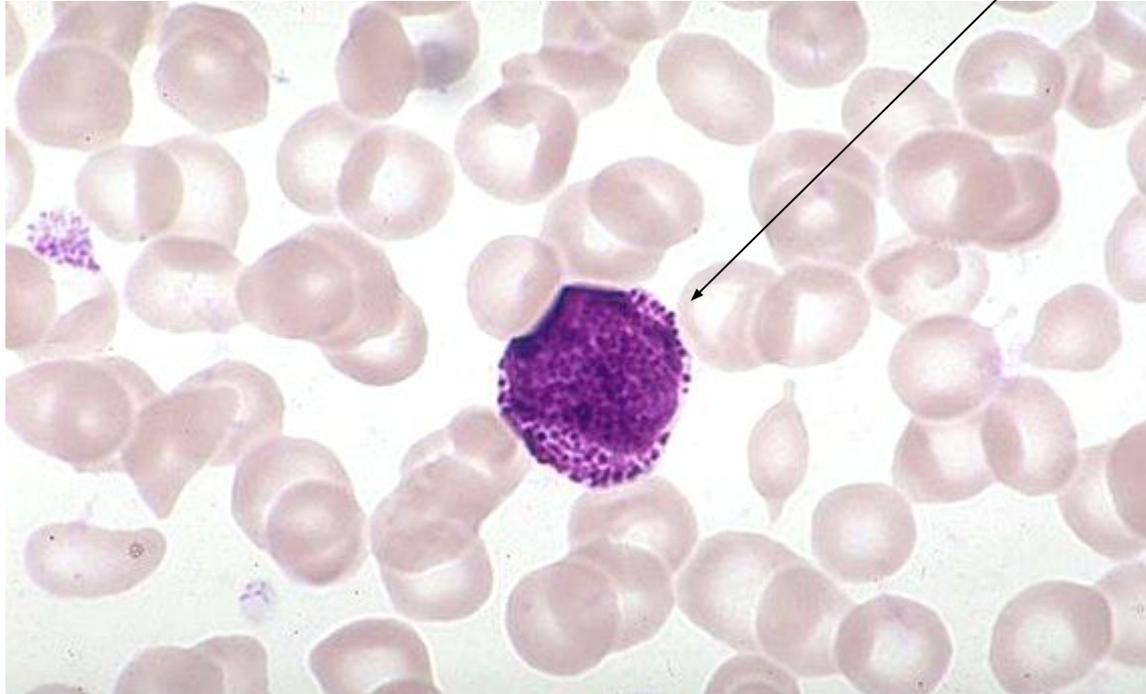
20

19

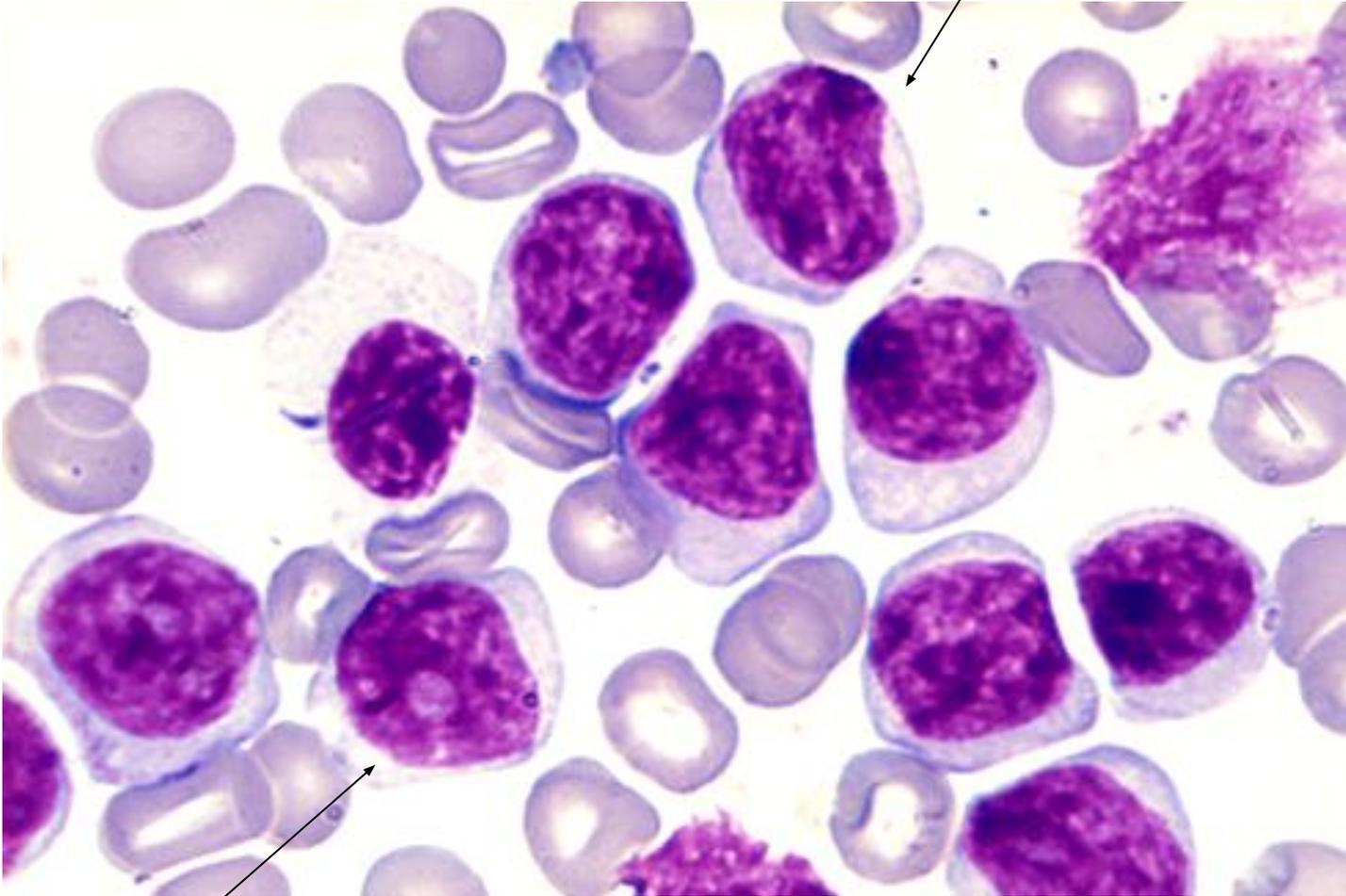


25

26

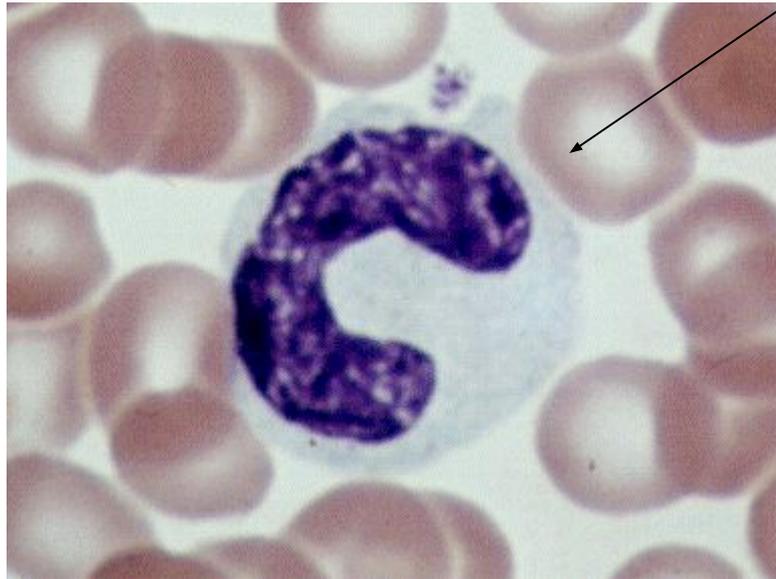


27



28

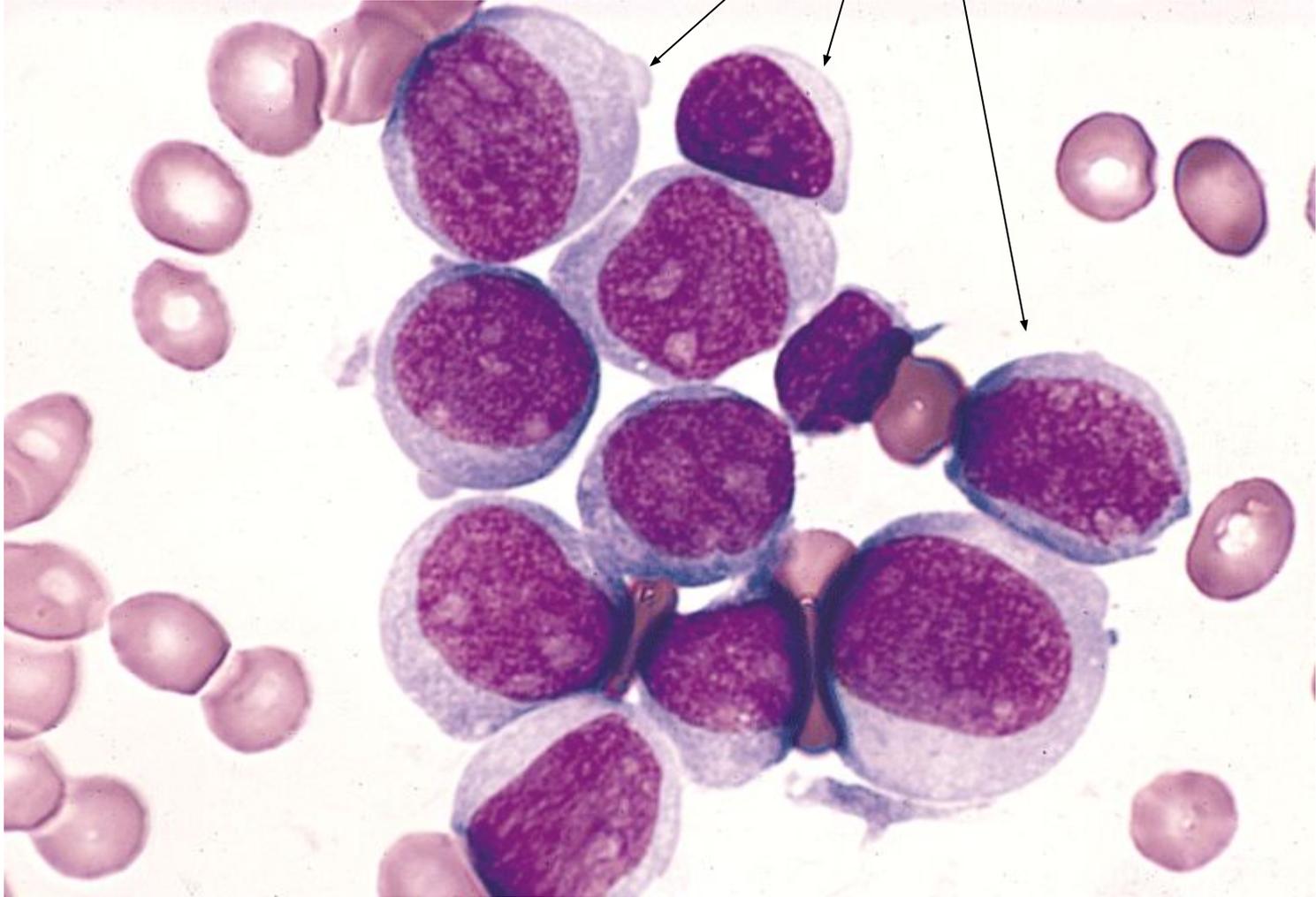
29

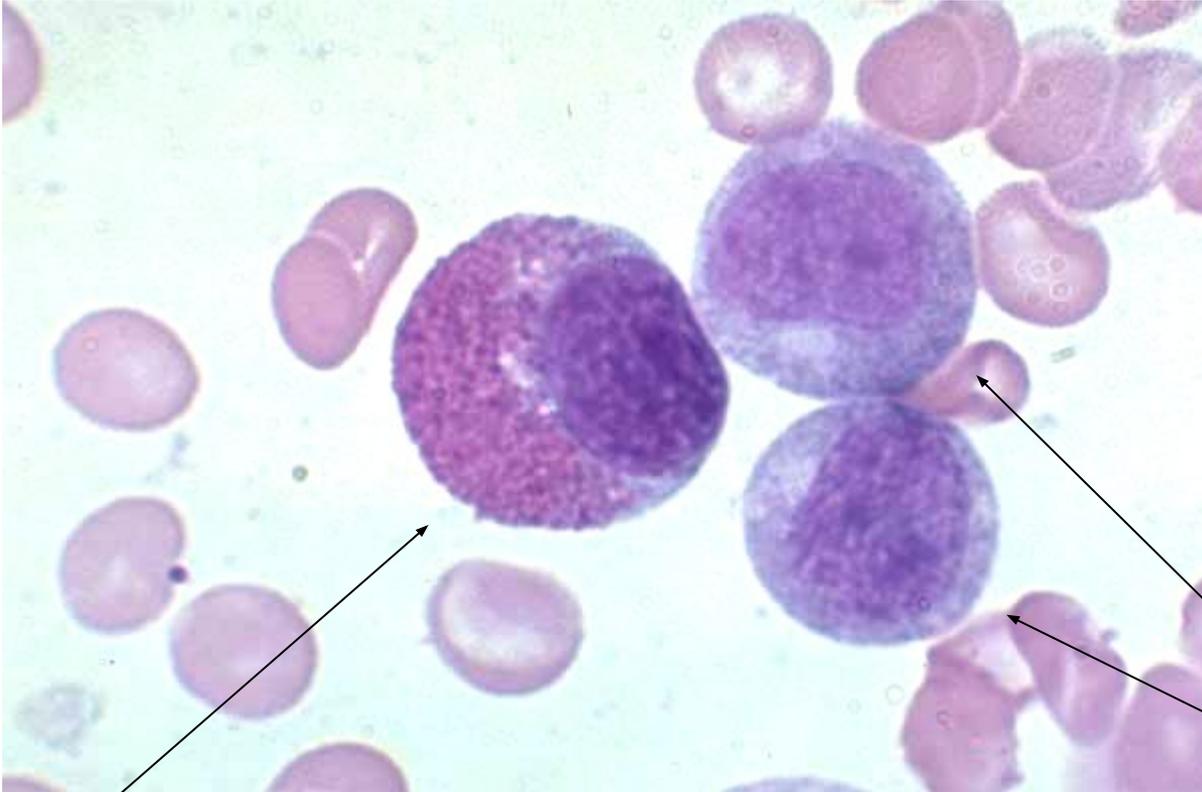


30



31

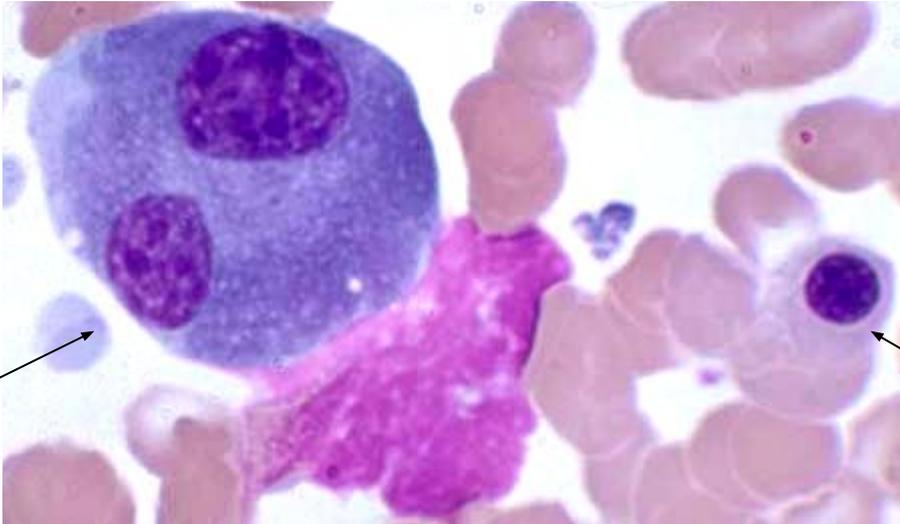




35

36

39

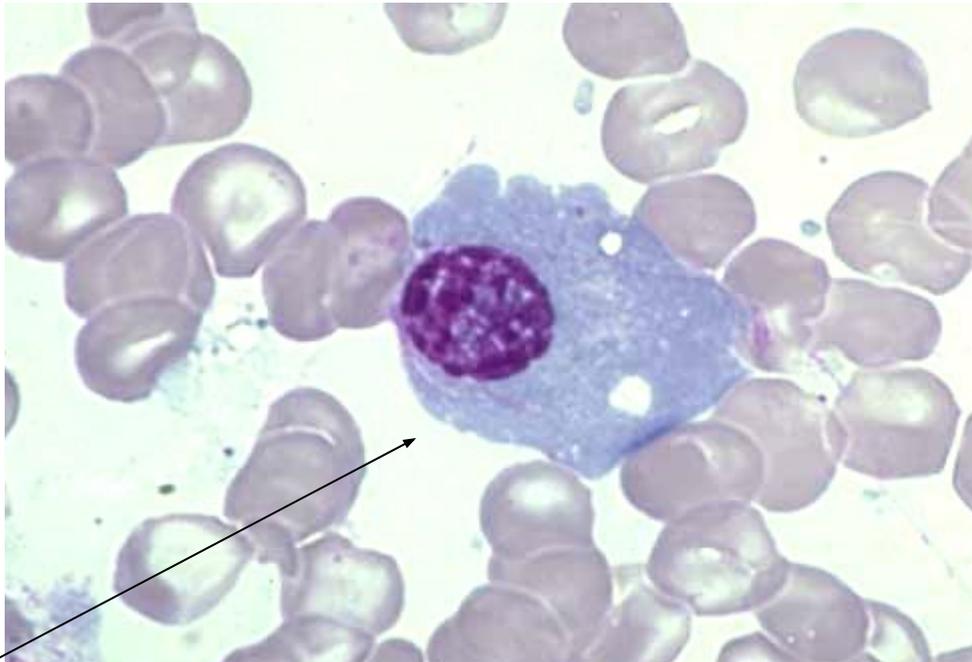


40

44

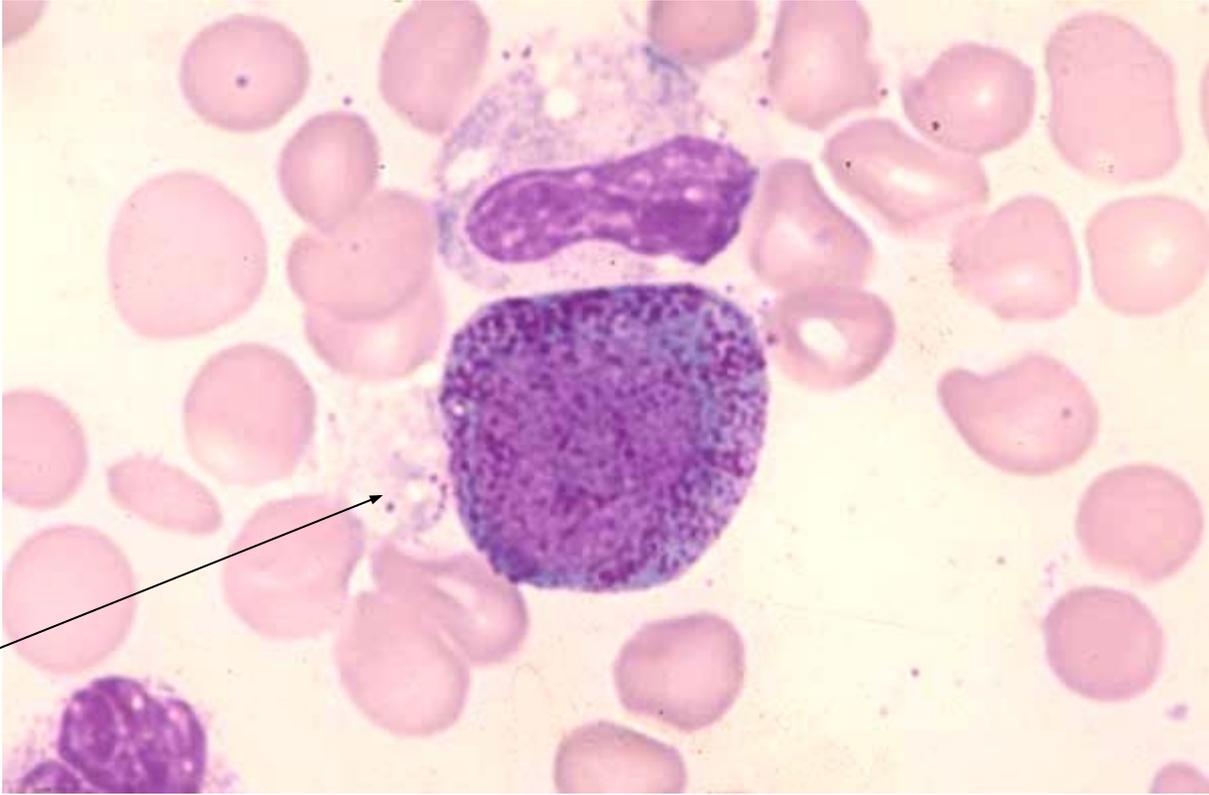


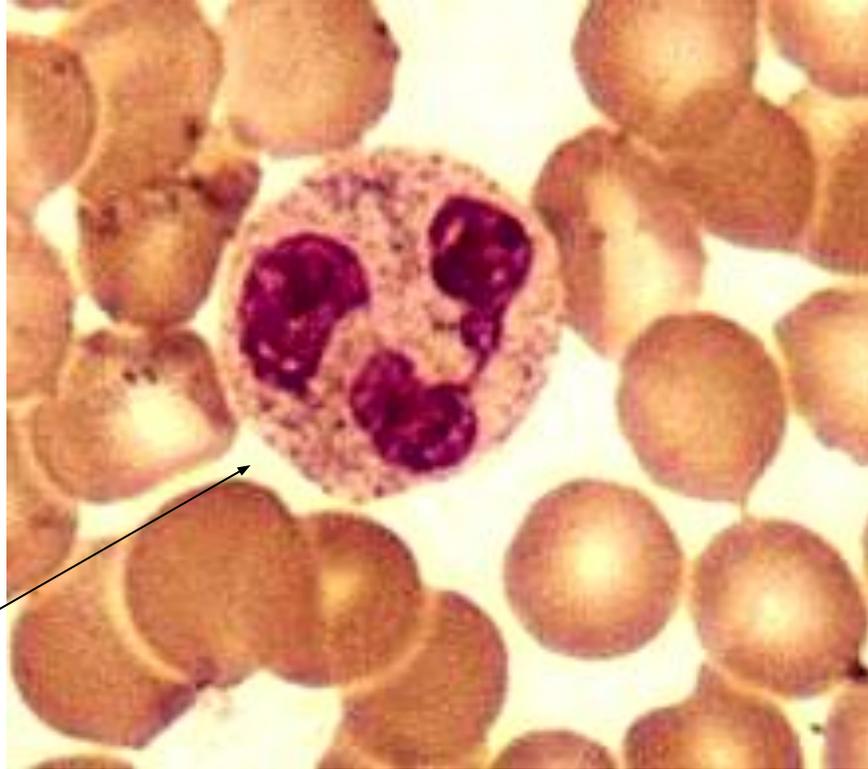
43



45

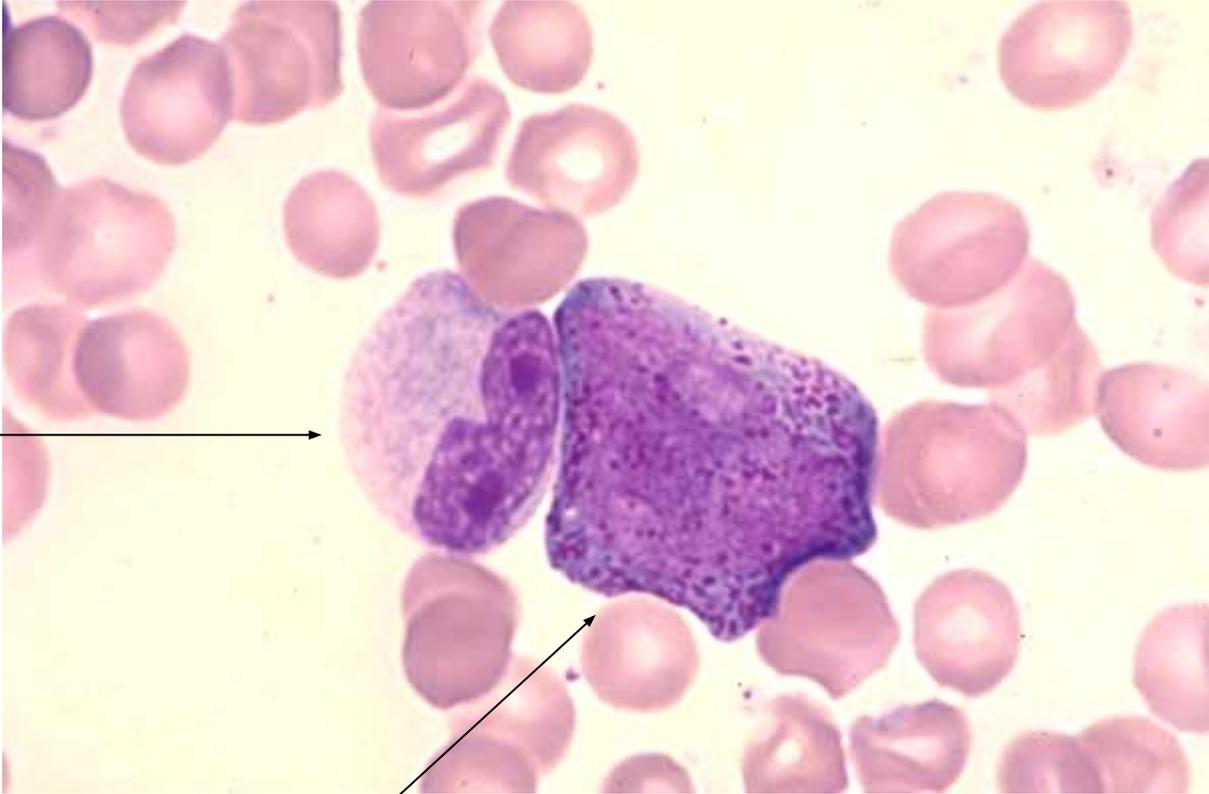
46





71

78



79

3. ГЕМОСТАЗ

Значение системы гемостаза

- **1. Сохранение крови в жидком состоянии (адекватное соотношение активности свертывающей и противосвертывающей систем)**
- **2. Предупреждение и остановка кровотечения (поддержание постоянного объема циркулирующей крови)**

ГЕМОСТАЗ ОБЕСПЕЧИВАЕТСЯ СИСТЕМАМИ:

- СОСУДИСТОЙ
- СВЕРТЫВАЮЩЕЙ
- ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩЕЙ (ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ И АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ)

ТРИ ЗВЕНА ГЕМОСТАЗА

1. КЛЕТКИ И КОМПОНЕНТЫ СТЕНКИ СОСУДА (ЭНДОТЕЛИЯ , ГЛАДКОМЫШЕЧНЫЕ , ТУЧНЫЕ, ФИБРОБЛАСТЫ, адгезивные молекулы, рецепторы и др.)
2. КЛЕТКИ КРОВИ (ТРОМБОЦИТЫ, МОНОЦИТЫ И ДР, агонисты и рецепторы)
3. БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ (13 ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ, АКТИВАТОРЫ И ИНГИБИТОРЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И ФИБРИНОЛИЗА, БЕЛКИ СИСТЕМЫ ПРОТЕИНА С)

Терминология

- Адгезия – прилипание тромбоцитов к участку повреждения сосудистой стенки
- Агрегация – склеивание тромбоцитов друг с другом

Механизмы гемостаза. Основные события.

<u>ПЕРВИЧНЫЙ ГЕМОСТАЗ</u>	<u>ВТОРИЧНЫЙ ГЕМОСТАЗ</u>	<u>ФИБРИНОЛИЗ</u>
Спазм сосудов	Активация факторов свертывания	Активация фибринолиза
(Немедленно)	(Секунды)	(Минуты)
Адгезия тромбоцитов	Образование сгустка фибрина	Лизис сгустка фибрина
(Секунды)	(Минуты)	(часы)
Агрегация тромбоцитов		
(Минуты)		

Сосудисто – тромбоцитарный (первичный) гемостаз

- Ведущая роль в предупреждении и остановке кровотечений из наиболее ранимых сосудов малого калибра (до 100 мкм)

Эндотелий сосудов

- Секреция мощного активатора адгезии тромбоцитов к субэндотелию (коллагену) – **фактора Виллебранда**;
- - продукция стимулятора агрегации тромбоцитов – циклического простагландина - тромбоксана A_2
- - продукция и высвобождение тканевого тромбопластина или тканевого фактора – главного активатора основного механизма свертывания крови
- - продукция ингибитора тканевого активатора плазминогена – **РАІ-1 и РАІ-2**

ТРОМБОЦИТЫ

- В крови количество тромбоцитов в норме – 180 (150) – 400 x $10^9/\text{л}$
- Уменьшение создает угрозу кровотечений (20 - 30 x $10^9/\text{л}$), однако критическим является лишь снижение числа тромбоцитов в крови ниже 10 x $10^9/\text{л}$.
- Гипертромбоцитозы в пределах от 600 – 1200 x $10^9/\text{л}$ (при мегакариоцитарных миелолейкозах, эритремии) создается высокий риск развития тромбозов сосудов и инфарктов органов.

Оценка тромбоцитопоза

PLT (platelet) кол-во тромбоцитов 180 (150) -400 x 10⁹/л

MPV (mean platelet volume) средний объем тромбоцитов 8,1 ±1,9fl

PDW (platelet distribution width) показатель анизоцитоза тромбоцитов 16,3 ± 1,0

Увеличение MPV (высок риск тромбоза)

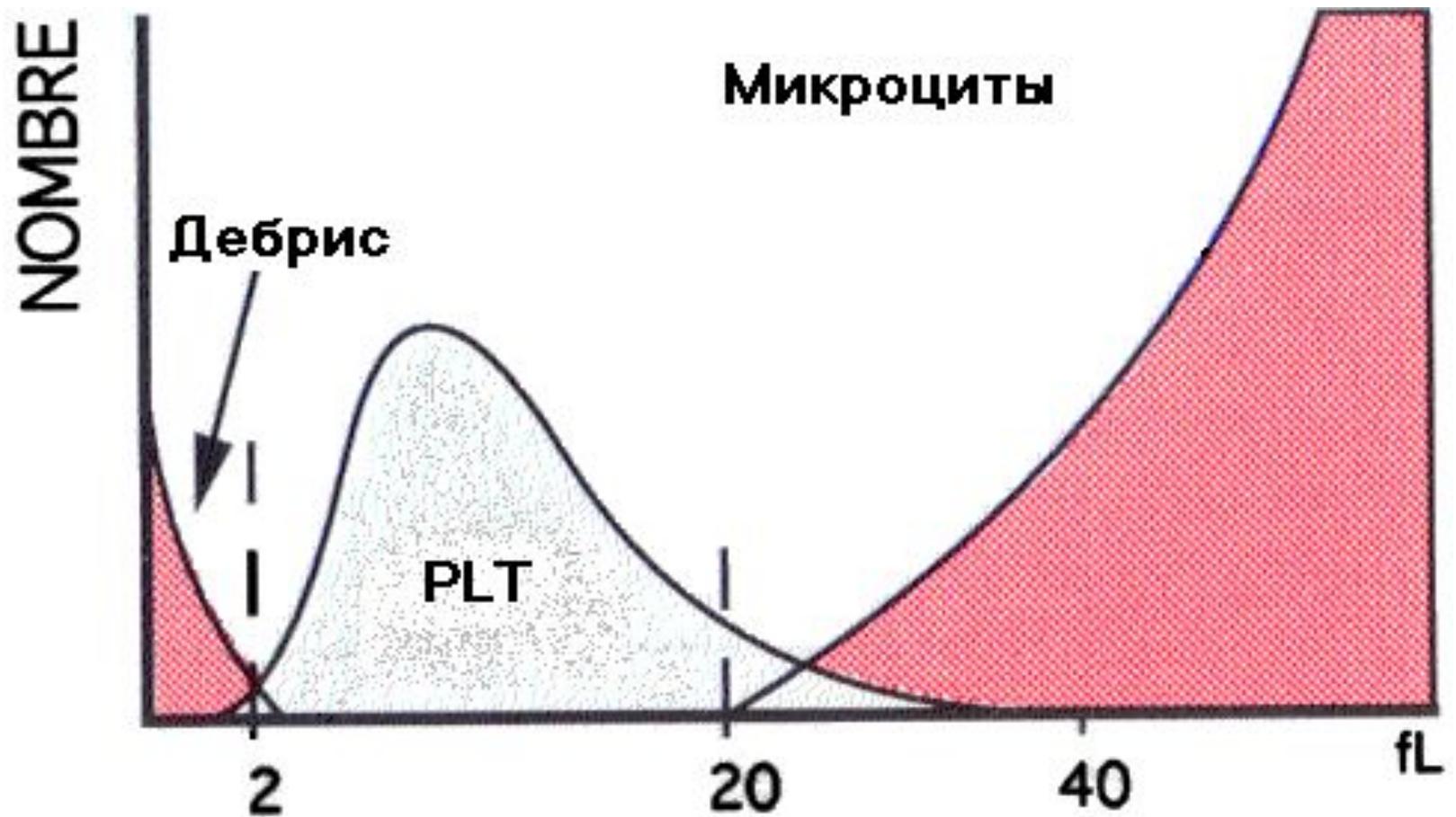
- при атеросклерозе,
- сахарном диабете,
- у курильщиков
- лиц, страдающих алкоголизмом.

- Крупные тромбоциты с аномальной морфологией появляются при миелопролиферативных заболеваниях.

Уменьшение MPV

- после спленэктомии

Тромбоцитограмма

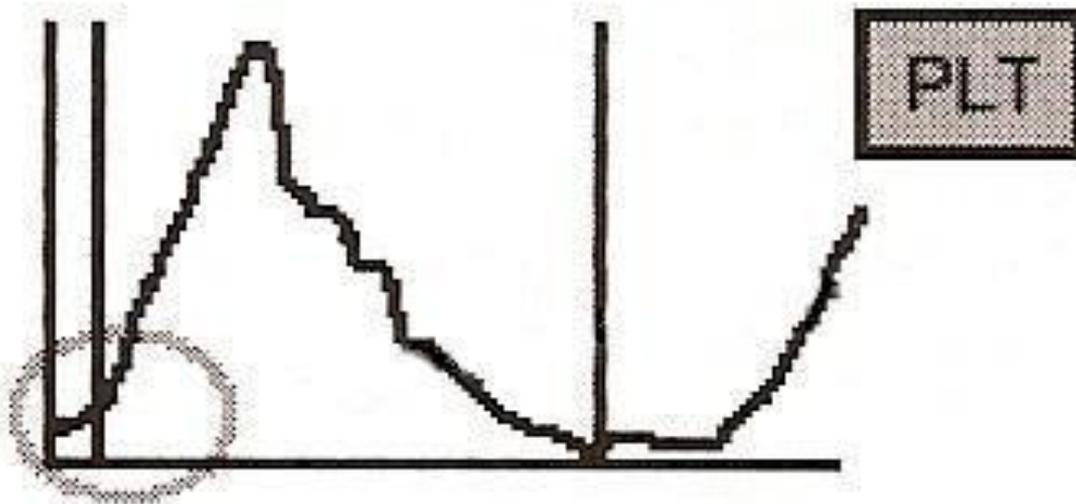


Изменения тромбоцитарных гистограмм

Тромбоцитарная гистограмма не начинается на базисной линии.

Возможные причины:

- Высокое фоновое значение (загрязнение реагентов)
- Фрагменты клеток (эритроцитов, лейкоцитов)
- Высокое количество бактерий в крови

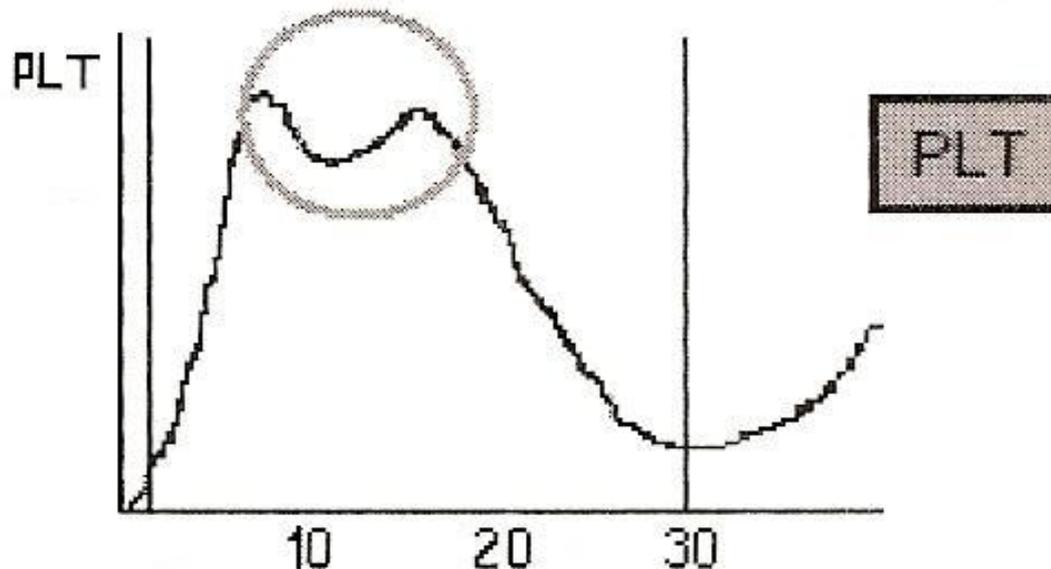


Изменения тромбоцитарных гистограмм

Тромбоцитарная гистограмма имеет несколько пиков.

Возможные причины:

- Анизоцитоз тромбоцитов
- Восстановление тромбоцитарного звена после химиотерапии
- Агрегация тромбоцитов



Лабораторное исследование системы первичного гемостаза

1. Определение количества тромбоцитов

2. Изучение мазка периферической крови дает дополнительную информацию о причине аномального количества тромбоцитов.

3. Время кровотечения (ВСК, ДК) (позволяет определить состояние сосудов после взаимодействия между тромбоцитами и сосудистой стенкой.)

4. Исследование агрегации тромбоцитов – позволяют дифференцировать качественные нарушения тромбоцитов с помощью специального устройства – агрегометра, с использованием различных индукторов (АДФ, ристомицин, адреналин, коллаген)

ПАТОЛОГИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

ТРОМБОЦИТОПЕНИЯ

- **Патологическое состояние которое характеризуется понижением содержания тромбоцитов в крови (меньше $150 \cdot 10^9$ /л)**

Аутоиммунная тромбоцитопения

БОЛЕЗНЬ ВЕРЛЬГОФА

(аутоиммунная хроническая тромбоцитопеническая пурпура)

Синтезируются антитела (иммуноглобулины) против собственных тромбоцитов и тромбоциты разрушаются

- * Основным местом синтеза Ig G является селезенка
- * Принцип лечения:
 - спленэктомия
 - кортикостероиды
 - иммунодепрессанты
- * Полного излечения не бывает

Наследственная тромбоцитопатия

- С НАРУШЕНИЕМ АДГЕЗИИ И АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ
 - Синдром Виллебранда-Юргенса (AP)
- Причина – дефицит фактора Виллебранда
- Патогенез – нарушена адгезия тромбоцитов вследствие дефицита **фактора 8**

Наследственная тромбоцитопатия

- Тромбоцитопатии в сочетании с другими наследственными аномалиями
 - Синдром Вискотта-Олдриджа
- Причина – в тромбоцитах мало плотных гранул (АДФ, серотонин, адреналин, Ca^{2+}), альфа-гранул (бета-тромбоглобулин, фибриноген, фибронектин, ростовой фактор)
- Патогенез – сниженная адгезия и агрегация тромбоцитов, нарушено освобождение гранул
- Признаки: геморрагический синдром появляется рано, могут быть смертельные кровотечения