



Морфологическое исследование мазков крови

Техника приготовления мазка на предметном стекле

- Используются чистые предметные обезжиренные стекла желательной толщиной 1 мм (фирма «Гем»).
- Капля крови помещается в середине стекла в 1-2 см от одного из концов.
- Шлифованное стекло, которым будет сделан мазок, ставят на предметное стекло под углом 30-45 градусов на 1-2 мм перед каплей и двигают его немного назад, чтобы стекло соприкоснулось с каплей крови и капля растеклась по углу между двумя стеклами.
- Далее быстро проводят движение вперед по предметному шлифованному стеклу, которое должно быть уже предметного или специальным пластиковым шпателем (фирма "Гем", «А/О ЮНИМЕД»), позволяющим получить монослойный мазок практически на всем его протяжении.
- Мазок должен иметь длину 3-4 см. Не следует сильно нажимать на стекло, так как при этом травмируются форменные элементы крови.
- Мазки высушивают на воздухе и маркируют.

Техника приготовления мазка на предметном стекле

Правильно выполненный высохший мазок должен быть тонким, желтоватого цвета, располагаться на 1-1,5 см от краев и оканчиваться «метелочкой».

- В толстых (густо-розового цвета) мазках морфология клеток плохо различима. После окрашивания эритроциты при микроскопии должны располагаться отдельно друг от друга в виде монослоя.
- Существует 2 типа автоматических приборов для производства равномерных мазков крови, в основе которых используется механическое распределение клеток или центрифугирование (Cytospin фирмы Shandon). Цитоцентрифуга концентрирует клетки на небольшой площади и такие мазки используют для изучения клеток в низких концентрациях, например, в спинномозговой жидкости. В современных гематологических анализаторах имеется устройство для автоматического приготовления мазков с последующей их фиксацией и окрашиванием, что еще больше сокращает время приготовления препаратов и обеспечивает постоянство характеристик окраски. Данные приборы требуют стандартных стекол размером 26x76x1 (фирма «Гем»)

Гистологический препарат любой формы должен отвечать следующим требованиям:

- сохранять прижизненное состояние структур;
- быть достаточно тонким и прозрачным для изучения его под микроскопом в проходящем свете;
- быть контрастным, то есть изучаемые структуры должны под микроскопом четко определяться;
- препараты для световой микроскопии должны долго сохраняться и использоваться для повторного изучения.

Приготовление мазков крови

- Мазки готовить из свежей, нативной крови.
- Из цитратной и оксалатной крови мазки можно приготовить до 6 ч после ее взятия, из гепаринизированной — до 24 ч.
- Мазки крови готовят на предметных стеклах, которые нужно соответствующим образом подготовить.

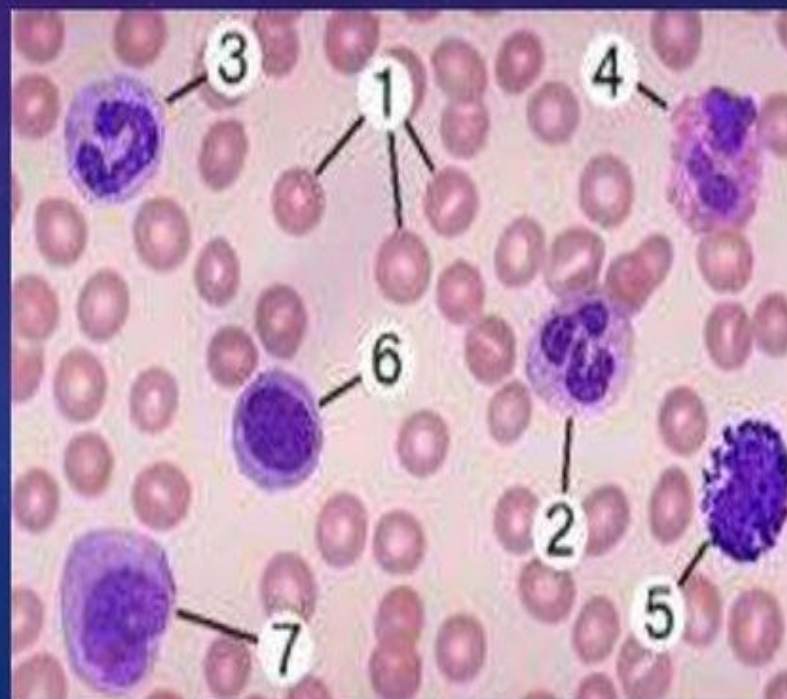
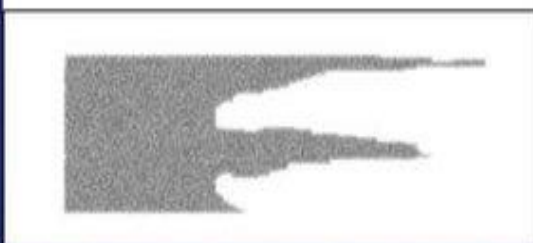
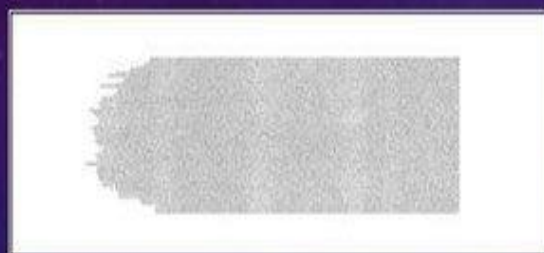
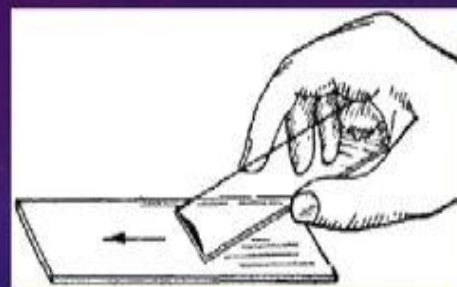
Техника приготовления мазков

Предметное стекло берут между большим и указательным пальцами левой руки. Отступя на 1 см от края стекла, лежащего ближе к указательному пальцу, наносят небольшую (диаметром 2 — 3 мм) каплю крови - путем прикосновения поверхностью предметного стекла к капле крови на месте ее появления после прокола кожи.

Техника приготовления мазков

- при изготовлении мазков из крови, взятой в пробирки, каплю ее наносят с помощью глазной или пастеровской пипетки или краем пробки.
- правой рукой устанавливают вблизи от капли крови шлифованное стекло под углом $30 - 45^\circ$ и осторожно продвигают его до соприкосновения края стекла с каплей крови. После этого, плавно и не очень быстро, продвигая, справа, налево шлифованное стекло по предметному, готовят мазок.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАЗКОВ ОКРАСКА ПО РОМАНОВСКОМУ



Мазок

- должен начинаться на 1 — 1,5 см от края предметного стекла и заканчиваться в 1 — 3 см от другого его края, составляя примерно $2/3$ — $3/4$ длины стекла.
- мазок должен быть уже предметного стекла, с боков на стекле должны оставаться свободные поля шириной около 1 см.
- хороший мазок не имеет перерывов, пустот, на всем протяжении одинаковый по толщине.
- на высушенном мазке в начальной его части карандашом пишут порядковый номер записи исследуемых пациентов и дату взятия крови.

Фиксация мазков

- Мазки крови необходимо в течение 2 дней после изготовления или зафиксировать, или окрасить. Нефиксированные мазки через месяц теряют способность правильно окрашиваться.
- Для фиксации мазки погружают в метиловый спирт (5 мин), этиловый спирт (30 мин), этиловый спирт и этиловый эфир поровну (30 мин) или денатурированный спирт (30 мин). Мазки помещают в кюветы с фиксатором и закрывают крышкой. Мазки не должны соприкасаться. После фиксации мазки высушивают на воздухе.

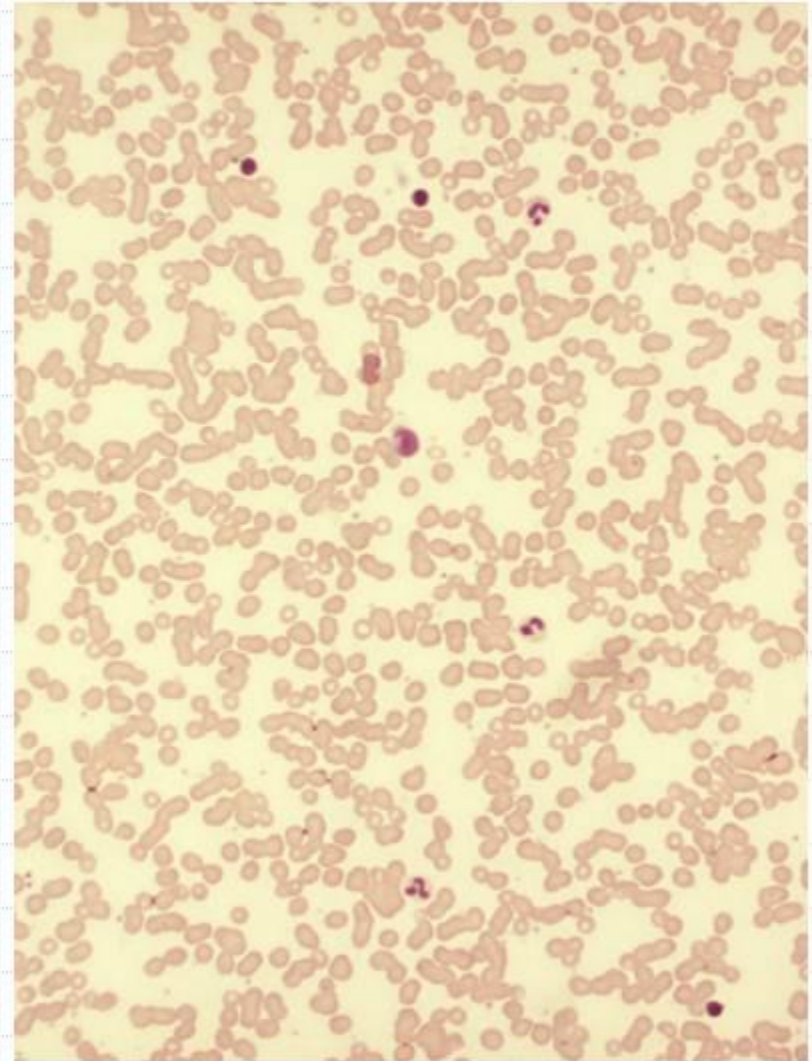
КЛАССИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ МАЗКОВ КРОВИ

- Мазки крови, высушенные на воздухе, окрашиваются специальными красителями с целью идентификации цитоморфологически важных структур в клетках крови.
- *Кислые* вещества клетки (выглядят базофильными) связывают основные красители.
- *Основные* клеточные субстанции (ацидофильные) окрашиваются кислыми красками.
- *Нейтральные* компоненты клетки визуализируются при помощи нейтральных растворов красителей.

Мазок крови

- ◆ Окраска по Романовскому-Гимзе
- ◆ Окраска по Маю-Грюнвальду
- ◆ Окраска по Паппенгейму
- ◆ Окраска по Райту

Метиленовый синий
(или азур) + эозин



Окраска мазков крови

- Наиболее часто применяют окраску
- по Романовском
 - по Нохту
 - по Паппенгейму-Крюкову

Существуют автоматические устройства для приготовления и окраски мазков, которые позволяют стандартизировать условия и повысить качество препаратов.

- В настоящее время предлагается широкий спектр высококачественных красителей (фирма "Гем", НПФ "Абрис+"), удобные в применении и дающие хорошие результаты при окраске мазков. Можно использовать наборы для быстрого окрашивания мазков крови в течение 20-30 секунд (фирма "Гем").
- Автоматическая фиксация и окраска мазков может быть осуществлена с помощью специальных устройств: "Гема-Тек" (США), "ПОМК-1" (Россия), в которые загружают нефиксированные мазки. Последующее автоматическое дозирование фиксатора-красителя и буферных растворов обеспечивает стандартную и равномерную окраску мазков.

Окраска по Романовскому-Гимзе

- Краситель: щелочная часть (азур II - ярко-синий цвет),
кислая часть (эозин - розово-красный цвет).
- В настоящее время используется готовый краситель Романовского-Гимзе, из которого перед началом работы готовят рабочий раствор из расчета 1 капля краски на 1 мл дистиллированной воды.
- Высохший фиксированный мазок помещается в кювету с рабочим раствором краски на 20-30 минут (конкретное время устанавливается опытным путем для каждой партии красителя). Продолжительность окраски зависит от окружающей температуры (чем холоднее, тем продолжительнее окраска) и качества красителя.

Окраска по Романовскому-Гимзе

- Ядра клеток - красно-фиолетовые;
- Эозинофильные гранулы - красновато-коричневые;
- Базофильные гранулы - синие;
- Нейтрофильные гранулы - фиолетовые;
- Цитоплазма лимфоцитов - голубая;
- Эритроциты - бледно-красные;
- Тромбоциты - наружная часть синяя (более светлая); внутренняя - фиолетовая (более темная).

Окраска по Май-Грюнвальду

- Данный метод очень удобен для визуализации гранулоцитов.
- Для окрашивания применяется готовый раствор эозин-метиленового синего по Маю-Грюнвальду. Мазок без предварительной фиксации заливают красителем, через 5 минут промывают и высушивают.
- Лимфоциты - ядра: сине-фиолетовые; цитоплазма: голубая;
- Моноциты - ядра: сине-фиолетовые; цитоплазма: серо-голубая;
- Гранулоциты - ядра: сине-фиолетовые; гранулы: красные, фиолетовые, темно-синие (зависит от типа);
- Тромбоциты - наружная часть голубая; внутренняя - фиолетовая;
- Эритроциты - розовые.

Окраска по Паппенгейму

- комбинация двух предыдущих методов.
- сухие нефиксированные мазки помещаются в кювету с раствором Мая-Грюнвальда на 3-5 минут.
- контейнер с мазками ополаскивается дистиллированной водой
- мазки помещаются в кювету с разведенным раствором Романовского-Гимзы на 20-30 минут.
- мазки промываются проточной водой и высушиваются.

Окраска по Паппенгейму

- Ядра клеток - красно-фиолетовые;
- Цитоплазма лимфоидных клеток - светло-синяя;
- Лимфоидная азурная грануляция - ярко-синяя;
- Миелоидная азурная грануляция - фиолетовая;
- Нейтрофильные гранулы - светло-фиолетовые;
- Эозинофильные гранулы - красные, красно-коричневые;
- Базофильные гранулы - темно-фиолетовые, черные;
- Эритроциты - розовые (полихроматофильные эритроциты - синеватые);
- Тельца Жолли - красновато-фиолетовые;
- Тельца Ауэра - ярко-красные.

После этих последовательно
проведенных процедур препарат может
изучаться под световым микроскопом.

Микроскопирование

- **Основной метод исследования биологических объектов, используемым в гистологии, т. е. изучение гистологических препаратов под микроскопом.**

Виды микроскопии:

- ***световая микроскопия*** (разрешающая способность 0,2 мкм) наиболее распространенный вид микроскопии;
- ***ультрафиолетовая микроскопия*** (разрешающая способность 0,1 мкм);
- ***люминесцентная (флюоресцентная)*** микроскопия для определения химических веществ в рассматриваемых структурах;
- ***фазово-контрастная микроскопия*** для изучения структур в неокрашенных гистологических препаратах;

Виды микроскопии:

- ***поляризационная микроскопия*** для изучения, волокнистых структур;
- ***микроскопия в темном поле*** для изучения живых объектов;
- ***микроскопия в падающем свете*** для изучения толстых объектов;
- ***электронная микроскопия*** (разрешающая способность до 0,1–0,7 нм), две ее разновидности просвечивающая (трансмиссионная) электронная микроскопия и сканирующая или растровая микроскопии дает отображение поверхности ультраструктур.

Основное отличие световой и электронной микроскопии

- препарат для световой микроскопии может длительно храниться и множественно использоваться.
- Срезы для электронной микроскопии используются однократно. При этом вначале интересующие объекты препарата фотографируются, а изучение структур производится уже на электронограммах.

Выведение лейкограммы (лейкоцитарной формулы).

- Окрашенные мазки крови исследуют под микроскопом с иммерсией - используют объектив x 90 и иммерсионное масло, которое после исследования удаляют с препарата.
- В окрашенных мазках крови определяют величину, форму, характер окраски и структуру ядра, цитоплазмы и включений в нее, соотношение между различными формами отдельных видов клеток крови.

Исследование мазка крови.

- Окрашенный препарат крови должен сначала быть просмотрен с помощью иммерсионного объектива (90x) и окуляра 7x или 10x. Использование ЮОх увеличения позволяет оценить соответствующее клеточное распределение, ориентировочное количество лейкоцитов в мазке. При исследовании эритроцитов важно выявить отклонения в их размере, форме, степени насыщения и распределении гемоглобина, а также наличие включений. Затем оценивается число и морфология тромбоцитов, а также морфология и дифференциальный подсчет лейкоцитов.

Методы дифференциального подсчета лейкоцитов

Лейкограмму выводят по окрашенным мазкам крови путём дифференциального подсчёта под иммерсионной системой микроскопа 100 лейкоцитов.

Лейкограмма (лейкоцитарная формула)

- это процентное соотношение различных видов лейкоцитов:

нейтрофилы

лимфоциты

эозинофилы

моноциты

базофилы

Дифференциальный подсчет лейкоцитов

- Подсчет лейкоцитарной формулы заключается в регистрации всех встречающихся в поле зрения лейкоцитов отдельно по их принадлежности к тем или иным росткам.
- В мазке крови распределение форменных элементов происходит неравномерно, так как лейкоциты различаются по своим физическим свойствам (размеры, удельная масса, упругость и т.д.). По краям препарата чаще встречаются нейтрофилы, моноциты, эозинофилы, в середине - лимфоциты. Поэтому передвигать стекло надо в определенном порядке. Считают несколько полей зрения вдоль края, затем возвращаются к центру и так далее по зубчатой траектории.
- При подсчете лейкоцитарной формулы используют лабораторные клавишные счетчики. Подсчитывают 100 клеток с последующим выведением процентного, а при необходимости абсолютного количества клеток, исходя из общего количества лейкоцитов. В случае патологии анализируют не менее 200 клеток, при этом особое внимание обращают на качественные изменения в эритроцитах, тромбоцитах и морфологию лейкоцитов.

Четырехпольный метод.

- с каждой стороны мазка в начале и конце его (т. е. на 4 исследуемых участках) определяют по 25 лейкоцитов (всего 100 клеток).
- от края мазка углубляются на 3 — 4 поля зрения, затем продвигаются на 2 — 3 поля вдоль мазка и возвращаются к его краю.
- количество каждого вида лейкоцитов, обнаруженных при исследовании, регистрируют на 11-клавишном счетчике.

Трехпольный метод.

- лейкоциты подсчитывают в 3 участках, расположенных поперек мазка (от одного края до другого).
- в начале мазка подсчитывают 35 клеток, в середине — 30 и в конце — 35 клеток.

Однопольный метод.

Лейкоцитарную формулу определяют в средней части мазка, где, проходя поперек его от одного края до другого и обратно, подсчитывают 100 лейкоцитов.

Методика вычисления абсолютного количества отдельных видов лейкоцитов в 1 мкл крови

- подсчитать количество лейкоцитов и вывести лейкограмму.
- число лейкоцитов умножают последовательно на процент каждого вида клеток лейкограммы и делят на 100, получая абсолютное число отдельных форм белых кровяных телец в 1 мкл крови.

При визуальном дифференциальном подсчете имеются 3 главных источника ошибок:

- неравномерное распределение клеток в препарате,
- нераспознавание клеток
- статистика.

В обычном мазке лейкоциты в большем количестве располагаются в области "щеточки" и по краям препарата, а не в центре. Кроме того, там же располагаются и самые крупные клетки. Плохо приготовленный или плохо фиксированный и окрашенный мазок - основная причина ошибок, связанных с распознаванием клеток.

Наибольшие ошибки, однако, встречаются в связи с тем, что подсчитывается малое количество клеток в образце.

Современный метод определения:
проточная цитометрия с лазерной детекцией
(автоматический гематологический
анализатор)



выдает результаты в виде процентного содержания нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов.

Исследование лейкоцитарной формулы

- имеет большое значение:
 - в диагностике гематологических, инфекционных, воспалительных заболеваний,
 - оценке тяжести состояния и эффективности проводимой терапии.
- изменения лейкоцитарной формулы не являются специфичными:
 - могут иметь сходный характер при разных заболеваниях или
 - могут встречаться непохожие изменения при одной и той же патологии у разных больных

Лейкоцитарная формула

имеет возрастные особенности



ее сдвиги должны оцениваться с позиции
возрастной нормы
(особенно важно при обследовании
детей).

отклонения от нормы



просмотр мазка крови под микроскопом
врачом с дополнительным уточнением
лейкоцитарной формулы и описанием
морфологии клеток:

- дополнительно оценивается содержание палочкоядерных нейтрофилов;
 - при выявлении других, реже встречающихся, типов лейкоцитарных клеток, их общее процентное содержание выдается под названием "другие" с описанием выявленных клеточных типов в комментарии к результату

Дегенеративные изменения лейкоцитов

- Токсогенная зернистость нейтрофилов – признак интоксикации, неблагоприятный прогностический признак. Иногда появляется раньше сдвига.
- Вакуолизация цитоплазмы – признак интоксикации, встречается реже токсогенной зернистости.
- Тельца Деле – проявление интоксикации.
- Гиперсегментация ядер нейтрофилов – 5 и более сегментов. Наиболее часто – при дефиците В12 и фолиевой кислоты. М.б. врожденная.
- Пельгеровская аномалия – уменьшение сегментации ядер. Наследуемое нарушение.
- Псевдопельгеровская аномалия – то же, но вследствие миелопролиферативных, воспалительных процессов и т.д.
- Клетки лейколиза (тени Боткина-Гумпрехта) – при ХЛЛ.