

Оглавление

Глава 1. Исследование крови	8
Взятие крови	8
Общий анализ крови	10
Гемоглобин	10
Эритроциты	16
Лейкоциты	26
Лимфоциты	38
Тромбоциты	39
Гематологические анализаторы	44
Изменения картины крови при патологии	50
Исследование физико-химических свойств крови	56
Исследование коагуляции	59
Исследование фибринолиза	66
Анализаторы свертывания крови	68
Иммунологические реакции	69
Иммуногематологические анализаторы	75
Глава 2. Биохимические методы исследования в клинической лабораторной диагностике	76
Техническое оснащение биохимических методов исследования в клинико-диагностических лабораториях	76
Характеристика абсорбциометрических приборов	77
Средства подготовки проб	79
Методы исследования показателей белкового обмена	82
Методы исследования мочевины сыворотки крови	95
Методы исследования креатинина сыворотки крови	102
Методы исследования мочевой кислоты сыворотки крови	107
Методы исследования пигментного обмена	110
Методы исследования показателей липидного обмена	116
Методы исследования углеводного обмена	128
Методы исследования активности ферментов	134
Биохимические анализаторы	158

Оглавление

Глава 3. Исследование водно-солевого обмена	164
Натрий	165
Калий	166
Кальций	174
Фосфор и фосфорсодержащие вещества	180
Магний	189
Хлориды	193
Микроэлементы	197
Железо	197
Медь	205
Йод	206
Глава 4. Исследование гормонального статуса	208
Железы внутренней секреции и гормоны	208
Современные методы исследования гормонального статуса	225
Глава 5. Исследование желудочного содержимого	228
Зондовые методы исследования	229
Беззондовые методы исследования	231
Исследование кислотообразующей функции	232
Нормальные показатели секреции желудочного сока.	236
Исследование ферментообразующей функции желудка	238
Микроскопическое исследование желудочного содержимого	239
Исследование на элементы злокачественного новообразования	241
Изменения желудочного содержимого при патологии	241
Глава 6. Исследование содержимого двенадцатиперстной кишки	246
Дуоденальное зондирование	246
Комплексное гастродуоденальное зондирование с холецистографией (по В. Е. Медведеву)	251
Физические свойства желчи	252
Химическое исследование желчи	253
Микроскопическое исследование	256
Глава 7. Исследование мочи	260
Физические свойства мочи	260
Химическое исследование мочи.	267

Микроскопическое исследование осадка мочи	297
Бактериологическое и бактериоскопическое исследования мочи	326
Анализаторы мочи	331
Глава 8. Исследование кала	332
Подготовка больного к исследованию.	332
Физические свойства.	334
Макроскопическое исследование	336
Микроскопическое исследование	338
Химическое исследование кала	341
Бактериологические исследования.	347
Особенности кала детей грудного возраста	348
Исследование кала на простейшие	350
Исследование кала на гельминты.	360
Глава 9. Исследование выделений половых органов	373
Исследование эякулята	373
Исследование секрета предстательной железы	375
Исследование выделений из влагалища и шейки матки	377
Исследование с целью определения функционального состояния яичников	380
Исследование отделяемого молочных желез.	391
Глава 10. Исследование мокроты	394
Сбор и обезвреживание материала	394
Физические свойства мокроты	395
Макроскопическое исследование мокроты	397
Микроскопическое исследование	399
Бактериоскопическое исследование на микобактерии туберкулеза	405
Изучение грибковой флоры в мокроте	408
Химическое исследование	409
Глава 11. Исследование спинномозговой жидкости	412
Правила получения ликвора	412
Макроскопическое исследование	413
Микроскопическое исследование	413
Морфология клеточных элементов в спинномозговой жидкости	416

Оглавление

Бактериоскопическое исследование на микобактерии туберкулеза	417
Химическое исследование	418
Определение крови в спинномозговой жидкости	423
Биохимические методы исследования.	424
Микробиологическое исследование	427
Глава 12. Исследование экссудатов и трансудатов	434
Виды пунктатов	434
Пункция плевральной полости	442
Физико-химические свойства полостных жидкостей.	443
Микроскопическое исследование	446
Бактериоскопическое исследование	450
Дифференциальная диагностика полостных жидкостей.	450
Характеристика ферментативного экссудата при остром панкреатите.	462
Гнойные экссудаты.	462
Глава 13. Исследование костного мозга	471
Развитие, строение, кровоснабжение и иннервация костного мозга	471
Методы исследования костного мозга.	476
Морфология клеток костного мозга	484
Глава 14. Исследование лимфатических узлов	497
Развитие, строение, кровоснабжение и иннервация лимфатических узлов.	497
Методы исследования лимфатических узлов	501
Изменения лимфатических узлов при патологии	504
Глава 15. Современные методы лабораторной диагностики	515
Виды лабораторных исследований	515
Глава 16. Характеристики заболеваний, сопровождающихся нарушением в составе крови	521
Анемии.	521
Лейкозы	557
Внекостномозговые гемобластозы — гематосаркомы и лимфомы (лимфоцитомы)	569
Парапротеинемические гемобластозы	572
Лимфогранулематоз	576

Лейкемоидные реакции	580
Лучевая болезнь	588
Геморрагические диатезы и синдромы	599
Тромбофилии гематогенные	622
Синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдром)	625
Коронавирусная инфекция COVID-19	628
Оспа обезьян	633
Глава 17. Основные показатели лабораторных анализов и диагностирование заболеваний	635
Исследование крови	635
Исследование мочи	642
Исследование кала	645
Приложение	647
Полезная информация.	647
Виды и структуры лабораторий	647
Проблемы современной клинической диагностики.	648
Структура клиничко-диагностической лаборатории (КДЛ)	649
Международная система единиц (СИ)	651
Список сокращений	659
Предметный указатель	660

ГЛАВА 1

Исследование крови

ВЗЯТИЕ КРОВИ

Подготовка к сдаче анализа крови включает ряд особенностей:

- 1) оптимальное время сдачи анализа — утро;
- 2) забор крови производится натощак (через 8–12 ч после приема пищи);
- 3) рекомендуется исключить из рациона алкоголь за 1–2 дня до исследования;
- 4) необходимо не менее чем за 1 ч до сдачи крови исключить курение;
- 5) не рекомендуется перед сдачей крови проведение различных медицинских обследований, прием лекарственных препаратов;
- 6) не рекомендуется перед сдачей крови проведение диагностических (эндоскопическое и лучевое исследование, глубокая пальпация, общий массаж, биопсия, пункция), функциональных (зондирование, введение контрастных веществ) и лечебных процедур;
- 7) необходимо избегать физической нагрузки;
- 8) желательно сдавать кровь в одной лаборатории.

В лабораторной практике исследуют капиллярную кровь, которую получают путем укола в мякоть IV пальца левой руки или мочки уха, или венозную кровь из локтевой вены (при работе на автоанализаторах).

Для забора капиллярной крови используют иглы-скарификаторы, которые после употребления моют и кипятят в стерилизаторе или помещают на 2 ч в сушильный шкаф при температуре 180 °С.

Кожу на месте укола протирают ватным тампоном, смоченным сначала спиртом, затем эфиром. Укол лучше производить сбоку, где более густая капиллярная сеть, на глубину 2–3 мм. Также могут быть использованы автоматические скарификаторы, способствующие снижению травматичности и соблюдению требуемой глубины прокола, в зависимости от типа скарификатора.

Кровь из ранки должна вытекать свободно, так как при сильном надавливании на палец возможно перемешивание тканевой жидкости.

Венозная кровь считается оптимальным материалом для клинического исследования крови. Забор крови осуществляется из кубитальной вены. Наложение жгута допустимо не более чем на 1 мин, кулак следует разжать при попадании в пробирку первых капель крови. При более длительном наложении жгута могут быть получены завышенные результаты общего белка, альбуминов и пр. При длительном сжатии кулака может быть повышен уровень калия в плазме на 15–25%.

Применяемые в настоящее время гематологические анализаторы в большинстве случаев сертифицированы и стандартизированы для работы с венозной кровью. Калибровочные и контрольные материалы для калибровки гематологических анализов предназначены для венозной крови. Забор крови посредством вакуумных систем характеризуется некоторыми преимуществами, в частности, данный метод обеспечивает высокое качество пробы и способствует предотвращению контакта с кровью. Вакуумные системы представляют собой сочетание трех элементов: стерильной одноразовой пробирки с крышкой и дозированным содержанием вакуума, стерильной иглы-бабочки или одноразовой двусторонней иглы, закрытой защитными колпачками с обеих сторон, и иглодержателя. Кровь втягивается непосредственно в пробирку из вены через иглу под действием вакуума.

Из пальца забор крови производится:

- 1) при ожогах, имеющих большую площадь;
- 2) при наличии мелких или малодоступных вен;
- 3) при выраженном ожирении;
- 4) при склонности к венозному тромбозу;
- 5) у новорожденных.

ОБЩИЙ АНАЛИЗ КРОВИ

Таблица 1

Основные показатели общего анализа крови в состоянии нормы

Показатель	Женщины	Мужчины
Гемоглобин	120–140 г/л	130–160 г/л
Гематокрит	34,3–46,6%	34,3–46,6%
Тромбоциты	180–360×10 ⁹	180–360×10 ⁹
Эритроциты	3,7–4,7×10 ¹²	4–5,1×10 ¹²
Лейкоциты	4–9×10 ⁹	4–9×10 ⁹
СОЭ	2–15 мм/ч	1–10 мм/ч
Цветовой показатель	0,85–1,15	0,85–1,15
Ретикулоциты	0,2–1,2%	0,2–1,2%
Тромбокрит	0,1–0,5%	0,1–0,5%
Эозинофилы	0–5%	0–5%
Базофилы	0–1%	0–1%
Лимфоциты	18–40%	18–40%
Моноциты	2–9%	2–9%
Средний объем эритроцитов	78–94 fl	78–94 fl
Среднее содержание гемоглобина в эритроцитах	26–32 пг	26–32 пг
Палочкоядерные гранулоциты	1–6%	1–6%
Сегментоядерные гранулоциты	47–72%	47–72%

ГЕМОГЛОБИН

Строение гемоглобина

Гемоглобин — основной компонент эритроцитов, благодаря которому осуществляется перенос кислорода. Он относится к хромопротеинам и имеет в своем составе белок (глобин) и железосодержащую группу (гем).

Гем — комплексное соединение железа и протопорфирина IX, состоящего из четырех пиррольных колец, соединенных СН-мостиками. Железо, находящееся в центре протопорфирина, соеди-

нено с четырьмя атомами азота пиррольных колец двумя главными и двумя дополнительными связями. Одна из двух оставшихся связей (координационное число железа равно 6) используется для соединения с глобином, другая — с кислородом. Гем одинаков для всех видов гемоглобина животных.

Глобин — тетраметр, состоящий из двух пар полипептидных цепей, различие аминокислотного состава которых определяет гетерогенность молекулы гемоглобина человека. В целом молекула гемоглобина содержит 574 аминокислоты. Каждая полипептидная цепь глобина соединена с гемом (на 1 глобин приходится 4 гема).

Гемоглобин взрослого человека имеет 2 α - и 2 β -полипептидные цепи (табл. 2). Фетальный гемоглобин, содержащийся в крови новорожденного (HbF), имеет в своем составе 2 α - и 2 γ -полипептидные цепи.

Гематокрит представляет собой совокупность всех фракций клеток крови, в которых содержится гемоглобин. Показатель гипоксии — кислородного голодания — снижение гематокрита ниже нормы. Повышение гематокрита может указывать на наличие онкологических заболеваний крови.

Таблица 2

**Содержание гемоглобина взрослого и фетального типа
в различные возрастные периоды
(в процентах от общего гемоглобина)**

Возраст	Фетальный гемоглобин	Гемоглобин взрослого типа
1–7 дней	71	25
8–21 день	65,4	29
22–30 дней	60	34,6
1–2 месяца	56,1	43,4
3–5 месяцев	22,5	75,3
6–9 месяцев	9,1	88,2
9–12 месяцев	4,3	92,8
1–3 года	1,6	94,9
3–7 лет	0,8	94,9
7–14 лет	0,7	94,9
Взрослые	до 1,5	94,9

Глава 1. Исследование крови

Гемоглобин может находиться в эритроцитах в виде:

- 1) оксигемоглобина: при присоединении железа к гему;
- 2) карбаминооксигемоглобина: при присоединении углекислого газа к свободным аминным группам глобина;
- 3) метгемоглобина: при окислении железа гема.

Повышение содержания карбоксигемоглобина регистрируется при гемолитических анемиях, повышении в атмосферном воздухе оксида углерода, у курильщиков.

Метгемоглобин повышается при врожденном и приобретенном снижении активности метгемоглобинредуктаз, повышении содержания в пище нитратов, кишечных интоксикациях, наличии аномального гемоглобина М. Определение содержания гликированных гемоглобинов имеет диагностическое значение, особенно при сахарном диабете. Содержание гликозилированного гемоглобина находится у здоровых в пределах 3–6% от общего гемоглобина.

Определение концентрации гемоглобина

Важнейшие из методов определения концентрации гемоглобина — колориметрические, инвазивные. Они широко применяются на практике ввиду их простоты и доступности.

Гематитовый метод (метод Сали). Основан на превращении гемоглобина при прибавлении к крови хлористо-водородной кислоты в хлоргемин (хлорид гематита) коричневого цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию гемоглобина. Полученный раствор хлорида гематита разводят водой до цвета стандарта, соответствующего известной концентрации гемоглобина. Данный метод в настоящее время сравнительно редко применяется в лабораторной практике, поскольку существуют точные автоматические методы.

Определение проводят в упрощенном колориметре — геометре Сали. Этот прибор состоит из пластмассового штатива с 3 вертикальными гнездами. В боковых гнездах находятся 2 запаянные пробирки со стандартной жидкостью. В среднее гнездо геометра вставляют открытую сверху градуированную стеклянную пробирку того же диаметра, что и цветные стандарты. Градуированная пробирка имеет шкалу с делениями, показывающую количество гемоглобина в граммах на 100 мл крови, т. е. грамм-процентах (г%). При геоме-

тре имеются специальная пипетка для воды и стеклянная палочка для перемешивания.

В градуированную пробирку наливают до деления, помеченного цифрой «2 г%» (нижняя круговая метка) 0,1 г% раствора хлористо-водородной кислоты. Затем набирают кровь в капиллярную пипетку до метки «0,02 мл», всасывая ее ртом через резиновую трубку (необходимо, чтобы столбик крови кончался точно на уровне метки и не разрывался пузырьками воздуха). Обтерев кончик пипетки снаружи ватой, опускают ее в пробирку с 0,1 г% раствором хлористо-водородной кислоты и осторожно выдувают кровь. Повторными всасываниями и выдуваниями верхнего слоя жидкости пипетку ополаскивают. Пробирку несколько раз встряхивают и, заметив время, ставят в штатив. Для полного превращения гемоглобина в хлорид гематита требуется не менее 5 мин. Через 5 мин геометр поднимают до уровня глаз и сравнивают цвет испытуемой жидкости с цветом стандартов. Обычно (за исключением случаев крайне тяжелой анемии) он темнее, чем в стандартных пробирках. С помощью неградуированной пипетки к испытуемому раствору добавляют по каплям дистиллированную воду, перемешивают стеклянной палочкой и сравнивают со стандартами. Как только цвет исследуемой жидкости станет одинаков с цветом стандартов, отмечают, какому делению шкалы соответствует уровень жидкости (по нижнему мениску) в пробирке.

Промышленность выпускает геометры, содержащие грамм-процентную шкалу. За идеальную норму принимают концентрацию гемоглобина в крови, равную 16,67 г%, или 166,7 г/л.

При соблюдении всех правил работы с геометром у одного и того же больного при определении гемоглобина в разных порциях крови получают расхождение результатов в пределах $\pm 0,3$ г% (3 г/л).

Цианметгемоглобиновый метод наиболее точен, принят в большинстве стран как стандартный.

Он основан на превращении гемоглобина в цианметгемоглобин при добавлении к крови реактива. Концентрацию цианметгемоглобина измеряют фотометрически. В качестве реактива употребляют раствор Драбкина (NaHCO_3 — 1 г, KCN — 0,05 г, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ — 0,2 г, дистиллированной воды — до объема 1 л) или какой-нибудь другой с подобным действием.

Под влиянием железисто-синеродистого калия гемоглобин окисляется до метгемоглобина (гемоглобина), который затем пре-

Глава 1. Исследование крови

вращается при помощи цианида калия в цианметгемоглобин (гемоглобцианид). Наиболее употребительное разведение крови в реактиве Драркина — 1 : 250 (0,02 мл крови и 5 мл реактива). Через 20 мин, необходимых для полного превращения гемоглобина в гемоглобцианид, измеряют экстинкцию при длине волны 540 нм и толщине слоя в 1 см против воды на спектрофотометре СФ-4 или на ФЭК-М и ему подобном фотоэлектроколориметре.

В настоящее время созданы прочные цианометгемоглобиновые стандарты в ампулах, соответствующие точно определенной концентрации гемоглобина. Полученные растворы исследуют на фотоэлектроколориметре и вычерчивают калибровочную кривую, откладывая показатели оптической плотности со шкалы прибора (красные цифры барабана) на оси ординат, а концентрацию гемоглобина в граммах на литр — на оси абсцисс. На основании калибровочной кривой создают рабочую таблицу, указывающую, какая концентрация гемоглобина соответствует данному показанию ФЭК.

Существуют колориметры, специально разработанные для определения гемоглобина, — гемоглобинометры. В большинстве из них используется цианметгемоглобиновый метод. Гемоглобинометры могут работать независимо или в комплексе со счетчиками частиц. Так, гемоглобинометр «Культер» (Франция), который можно применять самостоятельно, дает прямые показания гемоглобина в граммах на 100 мл. Прибор имеет высокую точность и воспроизводимость $\pm 0,1\%$ (1 г/л).

Цветовой показатель

Определение среднего содержания гемоглобина в одном эритроците производят делением концентрации гемоглобина (Hb) на число эритроцитов в одинаковом объеме крови (1 мкл). Практически среднее содержание гемоглобина в одном эритроците представляет частное от деления Hb (г/л) на число эритроцитов в миллионах.

Величину 33 пг (пикограмм — 1×10^{-12}), составляющую норму содержания гемоглобина в одном эритроците, условно принимают за 1 и обозначают как цветовой показатель. Вычисление цветового показателя производят путем деления тройного значения Hb (г/л) на 3 первые цифры числа эритроцитов в миллионах. В норме цветовой показатель колеблется от 0,86 до 1,1. В практической работе для подсчета цветового показателя используют пересчетные таблицы, а также номограммы.

Определение гемоглобина в крови методом спектрального анализа представляет собой один из наиболее информативных методов определения гемоглобина и его составляющих. Для проведения анализа данным способом применяются спектрофотометры. Основа анализа — изучение оптической плотности пробы крови. В организме гемоглобин вступает в химическую реакцию с газами, такими как кислород, окись углерода, образуя производные. Каждое из производных гемоглобина характеризуется особыми оптическими свойствами.

Пробирка с пробой крови, разведенной дистиллированной водой в пропорции 1 : 100, размещается перед спектроскопом. Проходя через призму спектрофотометра, луч белого света разлагается на спектральную гамму. При прохождении светового луча через исследуемый материал на спектральной линии проявляются полосы поглощения. Спектрофотометры, осуществляя спектральную оценку, выделяют свет одной волны. Результаты фиксируются с помощью фотоэлемента. В частности, для оксигемоглобина характерны 2 полосы поглощения в желтой и зеленой частях спектра. Аналогичны результаты для карбоксигемоглобина, но он не восстанавливается под действием химических веществ-восстановителей. Метгемоглобин проявляется в 4 полосах поглощения, наиболее четкая из которых расположена в красной части спектра. Восстановленный гемоглобин проявляется одной широкой полосой в центральной части спектра.

Со-оксиметрия представляет собой анализ газового состава крови и относится к спектроскопическому методу. Данный анализ дает возможность количественного измерения параметров крови, таких как оксигенированный, деоксигенированный гемоглобин, карбоксигемоглобин, метгемоглобин, в процентах от общей концентрации гемоглобина в крови. Данные параметры крови измеряются спектрометром на пропускание/поглощение 380—780 нм.

Современные приборы для измерения гемоглобина

Фотоэлектрические гемоглобинометры измеряют концентрацию гемоглобина, сразу выдавая на дисплее показания в г/100 или 1000 мл. В зависимости от задействованного метода, приборы калибруются растворами гемиглобинцианида или гемихрома.

Фотометры со светофильтрами применяются для измерения оптической плотности пробы крови. В них используются свето-

Глава 1. Исследование крови

фильтры, поглощающие свет в пределах 540 нм. Концентрация гемоглобина рассчитывается по калибраторам или калибровочному графику на основе гемихромных или гемиглобинцианидных калибровочных растворов. На аналогичном принципе работают спектрофотомеры.

Изменения гемоглобина при патологии

Существуют физиологические и патологические виды гемоглобина. У здорового человека существуют три основных типа гемоглобина: примитивный — Р, фетальный — F, взрослый — А.

Гемоглинопатии (гемоглинозы) обусловлены наследственной аномалией белковой части гемоглобина, они связаны с нарушением синтеза гемоглобина.

В настоящее время установлено более 600 аномальных гемоглобинов.

Серповидно-клеточная анемия является проявлением одной из наиболее важных в клиническом отношении гемоглинопатий. На молекулярном уровне вследствие мутаций структурных генов, контролирующих синтез цепей глобина, происходит замещение аминокислоты глутамина на аминокислоту валин. При этой патологии специфическим свойством крови является приобретение эритроцитами серповидной формы при снижении парциального давления кислорода в окружающей среде. На этом основана и специальная диагностическая проба. Для обнаружения подобного явления создают венозный застой с гипоксией путем пережатия пальца на 5 мин. При добавлении к капле крови после этой процедуры восстановителя — метабисульфита натрия — также образуются серповидно-клеточные эритроциты. При электрофорезе гемоглобина выявляется дополнительная полоса.

ЭРИТРОЦИТЫ

Жизненный цикл эритроцитов

Эритроцит происходит из исходной мезенхимальной клетки, которая превращается в ретикулярную (гемоцистобласт), который переходит в гемоцистобласт, превращающийся в эритробласт, характерной особенностью которого является наличие огромного

ядра и отсутствие гемоглобина. В последующем эритробласт превращается в нормобласт первого, второго, третьего порядка. В этой стадии уменьшается ядро, клетка наполняется гемоглобином. Он превращается в молодой эритроцитретикулоцит. В этот период снижается его двигательная активность и ретикулоцит превращается в зрелый ретикулоцит. У здоровых взрослых число ретикулоцитов составляет 0,2–1,2%.

Активная часть жизненного цикла эритроцитов протекает в периферической крови, куда они поступают в стадии ретикулоцитов. Превратившись через 1–3 дня в зрелые эритроциты, они циркулируют в организме около 120 дней. Созревание ретикулоцита сопровождается существенными изменениями в обмене веществ: прекращается значительная часть синтетических процессов, почти полностью утрачивается способность к дыханию. Эритроцит приспособлен к функции транспорта кислорода от легких к тканям и углекислого газа от тканей к легким. Основным путем обмена энергии в эритроцитах – гликолиз. Энергия гликолиза используется для активного транспорта катионов через клеточную мембрану и поддержания нормального соотношения между ионами калия и натрия в эритроцитах и плазме, а также для сохранения целостности мембраны и двояковогнутой формы клетки. Образующийся НАДФ предотвращает окисление гемоглобина в метгемоглобин. Кроме того, в эритроците происходит прямое окисление небольшого количества глюкозы в глюкозо-монофосфатном шунте с образованием восстановленного НАДФ, который используется для восстановления глутатиона. Восстановленный глутатион предохраняет мембрану клетки и предотвращает необратимое окисление гемоглобина.

В физиологических условиях стареющие эритроциты удаляются из циркуляции и разрушаются преимущественно в селезенке, печени и в меньшей степени в костном мозге клетками системы фагоцитирующих мононуклеаров. Часть эритроцитов распадается в сосудистом русле, гемоглобин соединяется с гаптоглобином в необратимый комплекс, который не проникает через почечный фильтр, а ферментативно расщепляется, главным образом в печени. При значительном гемолизе избыток гемоглобина попадает в почки. Здесь часть гемоглобина экскретируется с мочой, часть реабсорбируется в проксимальном отделе канальцев, часть гемоглобинового железа откладывается в эпителии канальцев в виде ферритина и гемосидерина, постепенно выделяясь с мочой.

Глава 1. Исследование крови

Основным стимулом к повышению эритропоэтической активности служит гипоксия любого генеза. Стимулом эритропоэза обладают андрогены благодаря способности повышать биосинтез эритропоэтина. Эритропоэтин — фактор, участвующий в регуляции эритропоэза. Он влияет на процесс развития эритроидных клеток — ускоряет построение гемоглобина, способствует освобождению ретикулоцитов из костного мозга.

Определение количества эритроцитов

Метод подсчета в счетной камере. Кровь предварительно разводят с целью уменьшения числа клеток, подлежащих счету. В химические пробирки отмеривают пипеткой по 4 мл 3%-ного раствора хлорида натрия и осторожно выдувают в нее 0,02 мл капиллярной крови (кровь забирают пипеткой от геометра Сали). Полученное разведение можно практически принять равным 1 : 200. Взвесь тщательно перемешивают и затем заполняют камеру с сетками Горяева. Сетка Горяева состоит из 225 больших квадратов (15×15). Большие квадраты, расчерченные вертикально и горизонтально на 16 малых квадратов, чередуются с квадратами, разделенными только вертикальными или горизонтальными линиями, и с квадратами чистыми, без линий. Глубина камеры равна 1/10 мм, сторона малого квадрата — 1/20 мм; объем малого квадрата равен $14\,000\text{ мм}^3$.

Перед заполнением камеру и шлифованное покровное стекло моют и сушат. Покровное стекло притирают к камере так, чтобы появились радужные кольца. Каплю разведенной крови вносят пипеткой под притертое покровное стекло камеры. После заполнения камеру оставляют на 1–2 мин в покое для оседания форменных элементов, затем приступают к подсчету при малом увеличении микроскопа в затемненном поле зрения (прикрытой диафрагме и опущенном конденсоре). Эритроциты считают в 5 больших квадратах ($5 \times 16 = 80$ малым квадратам), расположенных по диагонали. Для этого отыскивают левый верхний большой разграфленный квадрат, подсчитывают количество находившихся в нем эритроцитов, затем по диагонали вниз и направо находят следующий такой квадрат и т. д. Для того чтобы дважды не сосчитать одни и те же клетки, лежащие на пограничных линиях, соблюдают правило: к данному квадрату принадлежат клетки, находящиеся большей своей частью

внутри него, разделенные пограничной линией; считают только на верхней и левой границе квадрата.

Количество эритроцитов в 1 мл крови рассчитывают путем деления произведения из числа сосчитанных эритроцитов (a), 4000 (приведение к объему 1 мкл крови) и 200 (степень разведения) — $a \times 4000 \times 200 \times 80$ (количество малых квадратов).

При взаимосокаращении получается произведение — $a \times 10\,000$, т. е. число подсчитанных эритроцитов в 5 больших квадратах на 10 000. Ошибка метода в среднем равна $\pm 2,5\%$.

Электронно-автоматический метод. Наибольшее распространение нашел импульсный принцип, основанный на разнице электропроводности частиц крови и жидкости, используемой для разбавления. На нем работают счетчики «Целлоскоп» (Швеция) и «Культер» (Франция).

Кровяные тельца, взвешенные в изотоническом растворе хлорида натрия, всасываются через микроотверстие диаметром 100 мкм, с обеих сторон которого подведено по одному платиновому электроду. Скачкообразные повышения сопротивления, возникающие при прохождении частиц крови через капилляр, вызывают электрические импульсы, амплитуда которых прямо пропорциональна объему частиц. Импульсы усиливаются, подсчитываются в электронном устройстве. Производительность аппаратов этого типа велика: весь процесс от введения образца до получения результата происходит в течение 20 с при ошибке 1–2%.

Индексы красной крови имеют значение для суждения о нормо-, гипер- и гипохромии эритроцитов. Под индексами красной крови понимают среднее содержание гемоглобина в одном эритроците и цветовой показатель.

Проблемы автоматического анализа эритроцитов

Благодаря появлению автоматических методик измерения эритроцитов появилась возможность исследовать дополнительные параметры: средний объем эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина (MCH), среднюю концентрацию гемоглобина (MCHC), анизоцитоз эритроцитов (RDW). Последний показатель представляет собой важный дополнительный критерий для диагностики пациентов с анемиями и динамического наблюдения за ходом лечения.

Глава 1. Исследование крови

При автоматическом анализе эритроцитов в канал счета попадают также лейкоциты и тромбоциты, что может приводить к ошибке счета (увеличению количества эритроцитов). Увеличение количества эритроцитов возрастает пропорционально лейкоцитозу. Если количество лейкоцитов превышает 50 г/л, показатель среднего объема эритроцитов может быть искажен.

Причины проявления ложного «эритроцитоза»:

- наличие в крови гигантских тромбоцитов, объем которых превышает 30 фл;
- наличие криоглобулинов.

Причины ложного занижения количества эритроцитов:

- агглютинация эритроцитов;
- выраженный микроцитоз эритроцитов.

В пределах нормы считается значение среднего объема эритроцита 80–100 фл, микроцит — ниже 80 фл, макроцит — выше 100 фл. Гематологические анализаторы в большинстве поддерживают анализ эритроцитов объемом 30–300 фл. Измерение MCV осуществляется одновременно с подсчетом эритроцитов, возможна выдача результатов графически, в виде гистограммы распределения эритроцитов по объему.

Оценка MCV в автоматических анализаторах в ряде случаев может быть затруднительна. В частности, при микросфероцитарной гемолитической анемии диаметр микросфероцитов меньше нормы, тогда как средний объем может находиться в пределах нормы. В подобных случаях прибегают к исследованию мазка периферической крови с измерением диаметра эритроцитов.

Нормальные значения анизоцитоза эритроцитов (RDW) — 11,5–14,5%. Данный показатель характеризует колебания объема эритроцитов. Традиционно анизоцитоз эритроцитов подсчитывается вручную, посредством кривой Прайс-Джонса. В настоящее время для тех же целей задействуются гематологические анализаторы — данный показатель представляет собой коэффициент вариации среднего объема эритроцитов.

Использование гематологических анализаторов для выявления анизоцитоза признано более эффективным, чем задействование визуальных методик. При оценке степени анизоцитоза под микроскопом возможно допущение ряда ошибок, в частности, при высыхании эритроцитов в мазке диаметр их уменьшается на 10–20%,

при использовании толстого мазка он меньше, чем в тонком. Автоматизированный подсчет осуществляется на основе кондуктометрического метода, при этом сохраняются стабильность клеток и воспроизводимость результатов.

В зависимости от применяемого прибора, значения показателя RDW может варьироваться для одной и той же пробы крови. Это объясняется различиями в конструкции датчиков прибора и особенностях обработки кривой.

Измерение диаметра эритроцитов и графическая регистрация по величине

Измерение диаметра эритроцитов и графическую регистрацию по величине (эритроцитометрическая кривая, кривая Прайс-Джонса) можно производить с помощью прямых микроскопических и электронно-автоматических методов.

Прямой микроскопический метод. Измерение производят в мазке крови, фиксированном и окрашенном каким-либо методом, с использованием окуляр-микрометра и объектив-микрометра.

Окуляр-микрометр — круглая стеклянная пластинка с нанесенной по ее диаметру шкалой, разделенной на 50 делений, величина которых зависит от разрешающих свойств микроскопа. Объектив-микрометр представляет собой предметное стекло с нанесенной на нем шкалой длиной 2 мм, разделенной на 200 частей (одно деление равно 10 мкм). Вначале определяют цену одного деления окуляр-микрометра, для чего окуляр-микрометр и объектив-микрометр устанавливают так, чтобы их шкалы совпали. Затем отсчитывают число делений окуляр-микрометра, совпадающих с тем или иным количеством делений объектив-микрометра. Например, 20 делений окуляр-микрометра совпали с 3 делениями объектив-микрометра, следовательно, цена одного деления окуляр-микрометра равна 1,5 мкм (20 делений равно 30 мкм, а 1—1,5 мкм). Затем на столик микроскопа кладут окрашенный мазок крови и, зная цену одного деления окуляр-микрометра, измеряют диаметр 200—500 различных эритроцитов. Результаты распределяют по группам в зависимости от величины диаметра и устанавливают в процентах относительную численность каждой группы. Прямой микроскопический метод измерения диаметра эритроцитов трудоемок, отнимает много времени.

Глава 1. Исследование крови

Электронно-математический метод. Подсчет частиц в зависимости от их диаметра может производиться счетчиками благодаря наличию амплитудного дискриминаторного устройства, позволяющего пропускать через капилляр и улавливать частицы определенной величины.

Эритрометрическая кривая (кривая Прайс-Джонса) в норме правильной формы с вершиной (пиком) на 7,2 мкм и довольно узким основанием в пределах 6–9 мкм. Размер эритроцитов в микрометрах откладывается по оси абсцисс, количество эритроцитов того или иного диаметра в процентах — по оси ординат.

При макро- и мегалоцитарных анемиях кривая имеет пологую форму с широким основанием (показатель наличия анизоцитоза) с двумя или несколькими вершинами и сдвинута вправо, т. е. в сторону больших диаметров.

При анемиях, протекающих с микроцитозом, микросфероцитозом, кривая также растянута, но сдвинута влево. Увеличение микроцитов регистрируется при железодефицитных анемиях, наследственном микросфероцитозе, свинцовом отравлении, талассемии.

При макроцитарной анемии увеличивается количество макроцитов, а при V_{12} -дефицитных и фолиеводефицитных анемиях их количество достигает более 50%. В этих случаях эритроцитометрическая кривая имеет неправильную форму с широким основанием и сдвигом вправо.

Исследование ретикулоцитов

В норме эритроциты в окрашенных препаратах бесструктурные. Только в молодых эритроцитах (ретикулоцитах) при суправитальной окраске выявляется зернисто-нитчатая базофильная субстанция.

Метод суправитальной окраски бриллиантовым крезильным синим. Каплю насыщенного раствора бриллиантового крезильного синего в абсолютном спирте наносят на вымытое, обезжиренное и подогретое стекло и делают тонкий мазок. На приготовленное таким образом стекло наносят каплю крови, делают мазок и тотчас помещают стекло во влажную камеру (чашку Петри, на края которой выкладывают смоченные валики марли), выдерживают в ней в течение 3–5 мин, высушивают на воздухе, после чего микроскопируют. Зернисто-нитчатая субстанция окрашивается

в фиолетово-синий цвет на зеленовато-голубом фоне эритроцитов.

Лучшая окраска ретикулоцитов достигается способом Гель-Мейера: в пробирке Видяля смешивают несколько капель крови с равным объемом 1%-ного раствора бриллиантового крезилового синего в изотоническом растворе хлорида натрия, закрывают пробкой и оставляют в пробирке на 1 ч, затем из смеси делают мазок на предметном стекле.

При любом способе окраски подсчет ретикулоцитов производится на 1000 эритроцитов (в норме содержание ретикулоцитов в крови в среднем составляет 0,7%, пределы нормальных параметров — от 0,2 до 1,2%).

Наиболее информативным является определение числа ретикулоцитов на разных стадиях развития в окрашенных препаратах. При этом кроме общего количества ретикулоцитов подсчитывается процентное содержание различных групп ретикулоцитов. Различают по степени зрелости 5 групп ретикулоцитов:

- 1) ретикулоциты содержат ядро, зернистость располагается в виде венчика вокруг ядра (нормоциты);
- 2) зернисто-сетчатая субстанция в них в виде клубка или глыбки;
- 3) ретикулоциты имеют зернистость в виде густой сетки;
- 4) зернистость представлена в виде отдельных нитей;
- 5) ретикулоциты содержат отдельные зернышки.

80% ретикулоцитов здоровых людей могут содержать зернисто-сетчатую субстанцию и отдельные зернышки.

Современные гематологические анализаторы определяют до 10 разнообразных фракций ретикулоцитов. Отношение фракций с 3-й по 10-ю незрелых ретикулоцитов ко всему количеству ретикулоцитов составляет в норме 0,155–0,338 (анализаторы фирмы Бекман).

Увеличение количества ретикулоцитов отмечается при: гемолитических синдромах, остром недостатке кислорода, на 3–5-й день после кровопотери, при V_{12} -дефицитных анемиях на 5–9-й день после лечения.

Уменьшение количества ретикулоцитов определяется при: апластической анемии, гипопластической анемии, метастазах новообразований, приеме цитотоксических препаратов, лучевой терапии, заболеваниях почек.

Изменения эритроцитов при патологии

Морфология эритроцитов определяется при исследовании мазков крови с помощью иммерсионной системы микроскопа.

При свинцовой интоксикации, сидеробластных и мегалобластных анемиях в эритроцитах обнаруживается **базофильная зернистость** — агрегатированная базофильная субстанция в виде синих гранул, обнаруживающаяся в фиксированных (в отличие от ретикулоцитов) мазках крови, окрашенных по Романовскому, но лучше метиленовым синим. Мазок после фиксации в метиленовом синем заливают краской (из Расчета 5 капель 1%-ного водного раствора метиленового синего на 20 мл водопроводной воды) на 1 ч, после чего краску сливают. Мазок высушивают и микроскопируют. Считают 10 000 эритроцитов и отмечают количество эритроцитов с гранулами фиолетово-синего цвета.

Изменение размеров эритроцитов возникает при нарушении синтеза гемоглобина.

Наличие в мазках эритроцитов с диаметром 5–6,5 мкм диагностируется при железодефицитной анемии, талассемии, сфероцитозе.

Тельца Гейнца — маленькие округлые включения в эритроцитах, образованные из денатурированного гемоглобина. Обнаруживаются при воздействии гемолитических ядов, анемиях, вызванных дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионредуктазы и др. Выявляются с помощью окраски метиленовым фиолетовым (метод Дейси): в пробирке смешивают равные количества крови и 0,5%-ного раствора метиленового фиолетового в изотоническом растворе хлорида натрия. Смесь оставляют на 10 мин, затем делают мазки. Тельца Гейнца окрашиваются в пурпурно-красный цвет.

Тельца Жолли — остатки ядра, сохранившиеся в эритроцитах из-за нарушенного обезьядривания нормобластов, имеют округлую форму, окрашиваются в тон хроматина, содержатся в клетке по одному, реже по два. Часто встречаются при мегалобластной анемии, а также при гемолитических анемиях и после спленэктомии.

Кольца Кебота — остатки ядра в виде восьмерки или овала, не содержащие хроматина, происхождение которых связывается с нарушением биосинтеза пистонов. Обнаруживаются преимущественно при мегалобластной анемии и при свинцовой интоксикации.

Железосодержащие гранулы в эритроцитах находят в норме в развивающихся нормобластах (siderобластах), в части ретикулоцитов и в единичных зрелых эритроцитах (siderолитах). Представляют собой связанное с митохондриями внутриклеточное железо, не включенное в гемоглобин. Используют окраску на берлинскую лазурь: фиксированные в метаноле мазки костного мозга и периферической крови опускают в смесь, состоящую из равных частей 1%-ного феррицианида калия и 0,1%-ного раствора хлористо-водородной кислоты. Химический стакан с указанной смесью ставят на водяную баню при температуре 50–60 °С на 15–20 мин. Затем препарат вынимают, промывают в проточной дистиллированной воде и докрашивают 0,1%-ным водным раствором сафранина. Зернистые включения в цитоплазме окрашиваются в синий цвет.

Измененные формы эритроцитов и связанные с ними заболевания

Акантоциты. Клетки оснащены шпоровидными наростами различной величины. Картина характерна для цирроза, токсического гепатита, тяжелых форм сфероцитоза, нарушений липидного обмена, гепаринотерапии.

Дакриоциты. Эритроциты каплевидной формы. Характерны для миелофиброза, мелоидной метаплазии, обнаруживаются при росте опухоли при гранулемы, лимфоме, фиброзе.

Дрепаноциты (серповидные эритроциты). Эритроциты похожи на серп. Мембрана клетки изменяется под действием повышенного количества гемоглобина-s. Характерно для гемоглобинопатии, серповидноклеточной анемии

Кодоциты (мишеневидные эритроциты). Эритроциты выглядят как плоские клетки, бледные по краям, с ярким гемоглобиновым пятном в центре. Площадь клетки увеличена из-за избыточного холестерина. Характерны для гемоглобинопатии, железодефицитной анемии, талассемии, болезни печени, отравления свинцом.

Микросфероциты. Шарообразная форма, размеры 4–6 мкм. Характерны для наследственного микросфероцитоза (болезни Минковского-Шоффара).

Стоматоциты. Эритроциты на 1/3 большего размера и объема, просветление по центру в виде полосы. При осаждении напоминают чаши. Картина характерна для наследственных стоматоцитоза

Глава 1. Исследование крови

и сфероцитоза, опухолей различной этиологии, цирроза печени, алкоголизма

Сфероциты. Эритроциты обычного размера, шаровидной формы, отсутствует светлая область в центре. Характерны для гемолитической болезни новорожденных (несовместимость крови по системе АВ0), спетицимии, аутоиммунных патологий, различных видов анемий.

Эллиптоциты (овалоциты), Эритроциты удлинённой или овальной формы по причине аномалий мембраны, отсутствует светлая область в центре. Характерны для талассемии, наследственного овалоцитоза, цирроза печени, ряда анемий (меглобластной, железодефицитной, серповидно-клеточной).

Эхиноциты. Клетки оснащены шипами одинакового размера, расположенными на равном расстоянии друг от друга. Данная форма эритроцитов характерна при раке желудка, уремии, наследственных патологиях, нехватке фосфатов, магния.

ЛЕЙКОЦИТЫ

Жизненный цикл лейкоцитов

Лейкоциты («белая кровь») — это индикаторы состояния организма. Они являются ядросодержащими клетками крови.

Лейкоциты крови выполняют в организме различные функции. Фагоцитирующие лейкоциты — **нейтральные гранулоциты** вместе с **мононуклеарными макрофагами** — составляют неотъемлемую часть защиты организма от инфекции. Нейтральные гранулоциты характеризуются наличием в цитоплазме двух типов гранул: азурофильных и специфических, содержимое которых позволяет этим клеткам выполнять свои функции.

В азурофильных гранулах содержатся миелопероксидаза, нейтральные и кислые гидролизы, катионные белки, лизоцим. Специфические гранулы имеют в своем составе лизоцим, лактоферрин, коллагеназу, аминопептидазу. 60% общего числа гранулоцитов находится в костном мозге, составляя костномозговой резерв, около 40% — в других тканях и лишь 1% — в периферической крови. Одна часть (примерно половина) гранулоцитов крови циркулирует в сосудах, другая секвестрируется в капиллярах (маргинальный гранулоцитовый пул). Длительность полупериода циркуляции ней-

трофильных гранулоцитов равняется 6,5 ч, затем они мигрируют в ткани, где осуществляют свою основную функцию. Основные места тканевой локализации гранулоцитов — легкие, печень, селезенка, желудочно-кишечный тракт, мышцы, почки. Время жизни гранулоцитов зависит от многих причин и может колебаться от нескольких минут до нескольких дней (в среднем — 4–5 дней). Тканевая фаза их жизни является завершающей.

Моноциты и мононуклеарные макрофаги в норме обнаруживаются в крови, костном мозге, лимфатических узлах, селезенке, печени, других тканях. Моноциты содержат две популяции гранул: пероксидазоположительные и пероксидазоотрицательные. В гранулах моноцитов, помимо пероксидазы, определяются лизоцим, кислые гидролизы и нейтральные протеиназы. Отношение содержания этих клеток в тканях и циркулирующей крови 400 : 1. Одна четверть всех моноцитов крови составляет циркулирующий пул, остальная часть относится к маргинальному пулу. Продолжительность полупериода циркуляции моноцитов — 8,4 ч. При переходе в ткани моноциты превращаются в макрофаги, в зависимости от места обитания они приобретают специфические свойства, позволяющие отличать их друг от друга. В норме обмен макрофагов в тканях происходит медленно, например купферовские клетки печени и альвеолярные макрофаги обмениваются через 50–60 дней. Для всех макрофагов, фиксированных и свободных, характерна ярко выраженная способность к фагоцитозу, пиноцитозу и расплыванию на стекле.

Способность к фагоцитозу определяет участие нейтрофилов и макрофагов в воспалении, причем нейтрофильные гранулоциты являются главными клетками острого воспаления, а макрофаги рассматривают как центральное клеточное звено хронического воспаления, в том числе иммунного: фагоцитоз возбудителя, иммунных комплексов, продуктов клеточного распада, выделение биологически активных веществ, взаимодействие с тканевыми факторами, образование активных пирогенов, выделение ингибиторов воспаления и т. д.

Эозинофилы после созревания в костном мозге менее одного дня находятся в циркуляции, а затем мигрируют в ткани, где продолжительность их жизни составляет 8–12 дней. Существует несколько хемотаксических факторов для эозинофилов, среди которых компоненты комплемента C3, C5 и C5,6,7, описанные

Глава 1. Исследование крови

для нейтрофилов, а также специфический хемотаксический эозинофильный фактор анафилаксии, выделение которого из тучных клеток может быть опосредовано иммуноглобулином класса E и сходно с выделением гистамина по временным, биохимическим и регуляторным параметрам. Т-лимфоциты продуцируют фактор, активирующий эозинофилы. Гранулы эозинофилов содержат лизосомальные ферменты, фосфолипазу D, арилсульфатазу B, гистаминазу, брадикинины. Эозинофилы могут фагоцитировать комплексы антиген — антитело и определенные микроорганизмы.

Эозинофилы вовлекаются в реакции гиперчувствительности немедленного типа, выполняя при этом регуляторную и проективную функции, связанные с инактивацией гистамина, а также медленно действующего вещества анафилаксии (арилсульфатазы B) и фактора, активирующего тромбоциты (фосфолипазы D), выделяемых тучными клетками. Эозинофилы играют роль в межклеточных взаимодействиях при гиперчувствительности замедленного типа.

Базофилы — самая малочисленная часть гранулоцитов в периферической крови (0,5–1% всех лейкоцитов). Функция этих клеток сходна с функцией тучных клеток. Продолжительность жизни базофилов — 8–12 дней, время циркуляции в периферической крови — несколько часов. Базофилы, как и тучные клетки, имеют на своей поверхности рецепторы для антител класса IgE, одна клетка может связать от 10 до 40 000 молекул IgE. Взаимодействие между антигеном и IgE на поверхности базофила вызывает дегрануляцию с освобождением медиаторов: гистамина, серотонина, фактора, активирующего тромбоциты, медленно действующего вещества анафилаксии, фактора, хемотаксического для эозинофилов. Эти процессы лежат в основе реакции гиперчувствительности немедленного типа. Базофилы играют роль и в реакции замедленного типа. Хемотаксическими факторами для них являются C3a, C5a, калликреин, лимфокины, освобождаемые активированными Т-лимфоцитами, а также антитела, вырабатываемые В-лимфоцитами.

Защитная роль подвижных клеток крови и тканей сформулирована **фагоцитарной теорией иммунитета**. Микрофаги и макрофаги имеют общее миелоидное происхождение от полипотентной стволовой клетки, которая является единым предшественником грануло- и моноцитопоза. Все фагоцитирующие клетки харак-

теризуются общностью основных функций, сходством структур и метаболических процессов. Наружная плазматическая мембрана отличается выраженной складчатостью и несет множество специфических рецепторов и антигенных маркеров. Фагоциты снабжены высокоразвитым лизосомным аппаратом. Активное участие лизосом в функциях фагоцитов обеспечивается способностью их мембран к слиянию с мембранами фагосом или с наружной мембраной. В последнем случае происходят дегрануляция клеток и сопутствующая секреция лизосомальных ферментов во внеклеточное пространство. Фагоцитам присущи 3 функции:

- 1) защитная — связанная с очисткой организма от инфекционных агентов, продуктов распада тканей и т. д.;
- 2) представляющая — заключающаяся в презентации антигенных эпитопов на мембране;
- 3) секреторная — связанная с секрецией лизосомальных ферментов других биологически активных веществ.

В соответствии с перечисленными функциями различают следующие стадии фагоцитоза:

- 1) **хемотаксис** — целенаправленное передвижение фагоцитов в направлении химического градиента хемоаттрактантов;
- 2) **адгезия** — опосредованная соответствующими рецепторами;
- 3) **эндоцитоз** — являющийся основной физиологической функцией фагоцитов.

Для распознавания и последующего поглощения имеет большое значение опсонизация объектов фагоцитоза. Опсонины, фиксируясь на частицах, связывают их с поверхностью фагоцитирующей клетки. Основными опсонинами являются компоненты активированного классическим или альтернативным путем компонента (С3в и С5в) и иммуноглобулины класса G и M. Это делает клетку высокочувствительной к захвату фагоцитами и приводит к последующей внутриклеточной гибели и деградациии. В результате эндоцитоза образуется фагоцитарная вакуоль — фагосома. Азурофильные и специфические гранулы нейтрофила и гранулы макрофагов мигрируют к фагосоме, сливаются с ней, выделяя в нее свое содержимое. Поглощение — активный энергозависимый процесс, сопровождающийся усилением АТФ-генерирующих механизмов — специфического гликолиза и окислительного фосфорилирования в макрофагах.

Глава 1. Исследование крови

В нейтрофилах существует несколько систем микрообидности. Кислородозависимый механизм состоит в активации гексо-зо-монофосфатного шунта и повышении потребления кислорода и глюкозы с одновременным выбросом биологически активных нестабильных продуктов восстановления кислорода: перекиси водорода, супероксиданионов кислорода, гидроксильных радикалов ОН. Кислородонезависимый механизм связан с активностью основных катионных белков (один из них фагоцитин) и лизосомальных ферментов, изливающихся в фагосому при дегрануляции, — лизоцима, лактоферрина и кислых гидролиз.

Определение количества лейкоцитов

Метод подсчета в камере. Взятие и разведение крови производят пробирочным методом. В пробирку (лучше видалевскую) вносят 0,4 мл разводящей жидкости и 0,02 мл капиллярной крови. Полученное разведение практически считается равным 1 : 20. В качестве разводящей жидкости обычно употребляют 3–5%-ный раствор уксусной кислоты, подкрашенной метиленовым синим (уксусная кислота визирует эритроциты, метиленовый синий окрашивает ядра лейкоцитов). Перед заполнением камеры Горяева пробирку с разведенной кровью тщательно встряхивают. Камеру заполняют так же, как для подсчета эритроцитов.

Лейкоцитов гораздо меньше, чем эритроцитов (1–2 на большой квадрат), поэтому для точности подсчет производят в 100 больших квадратах (неразграфленных). Расчет: в 100 больших квадратах (1600 малых) сосчитано a лейкоцитов. Помня, что объем малого квадрата равен 14 000 мм³, а кровь разведена в 20 раз, рассчитывают количество лейкоцитов в 1 мкл крови: 4000×20 и делится на $1600 = \frac{1}{2} \times a$. Практически для получения действительного содержания лейкоцитов в 1 мкл крови достаточно полученное при подсчете число разделить пополам и приписать два нуля. В среднем ошибка метода составляет $\pm 7\%$.

Более точным (ошибка 2–3%) и совершенным является подсчет лейкоцитов с помощью электронных аппаратов. Подсчет лейкоцитов в счетчиках частиц производят по тому же принципу, что и эритроцитов. Предварительно кровь разводят и смешивают с каким-либо лизирующим эритроциты реактивом. В автоанализаторе «Техникон» в качестве такового применяют раствор уксус-

ной кислоты, в аппаратах «Культер» и «Целлоскоп» — сапонин или сапоглобин, которые добавляют разведенными (1 : 500, 1 : 700) в изотоническом растворе хлорида натрия (6 капель на 20 мл разведения).

Подсчет лейкоцитарной формулы крови производят в окрашенных мазках периферической крови. Считать лучше ближе к концу мазка в самом тонком месте, не менее 200 клеток (исключение составляют выраженные лейкопении), а затем выводят процентное соотношение отдельных видов лейкоцитов. Подсчет рекомендуется производить в одном порядке: половину клеток считать в верхней, половину — в нижней части мазка, не заходя на самый край и середину, по зигзагу (3—4 поля зрения вдоль мазка, 3—4 поля под прямым углом к середине мазка, затем 3—4 поля в сторону параллельно краю, вновь под прямым углом вверх и так далее в одну сторону).

Приготовление мазков. Тщательно вымытым и обезжиренным предметным стеклом (его краем) прикасаются к капле крови на месте укола. Мазок делают шлифовальным стеклом, поставив его под углом в 45° к предметному стеклу впереди капли. Подведя стекло к этой капле, ждут, пока кровь расплывется вдоль его ребра, затем быстрым легким движением проводят шлифовальное стекло вперед, не отрывая от предметного раньше, чем иссякнет вся капля.

Правильно сделанный мазок имеет желтоватый цвет (тонкий), не достигает краев стекла и заканчивается в виде следа (усов).

Окрашивание сухих мазков производят после предварительной фиксации. Лучшая фиксация достигается в абсолютном метиленовом спирте (3—5 мин) или в смеси Никифорова из равных частей абсолютного этилового спирта и эфира (30 мин).

К основным гематологическим краскам относят метиленовый синий и его производное — аzur I (метиленовый азуровый) и аzur II (смесь равных частей азура I и метиленового синего), к кислым — водорастворимый желтый эозин.

1. Окраска по Романовскому—Гимзе. Краска Романовско-го—Гимзе (заводского приготовления) имеет следующий состав: аzur II — 3 г, водорастворимый желтый эозин — 0,8 г, метиловый спирт — 250 мл и глицерин — 250 мл. Рабочий раствор краски готовят, наливая из расчета 1,5—2 капли готовой краски на 1 мл дистиллированной воды. Краску наливают на мазок возможно более высоким слоем; длительность окраски — 30—35 мин. По истечении

Глава 1. Исследование крови

этого срока мазки промывают водой и высушивают на воздухе. При этом способе удается хорошо дифференцировать ядро, но гораздо хуже — нейтрофильную зернистость цитоплазмы, поэтому его широко используют для окраски мазка периферической крови.

2. Комбинированная окраска Мая—Грюнвальда—Романовского—Гимзе по Паппенгему. На фиксированный мазок наливают пипеткой готовый краситель — фиксатор Мая—Грюнвальда, представляющий собой раствор эозинметилового синего в метиленовом спирте, на 3 мин. Через 3 мин к покрывающей раствор краске добавляют равное количество дистиллированной воды и продолжают окрашивание еще 1 мин. После этого краску смывают и мазок высушивают на воздухе. Затем высушенный мазок докрасивают свежеприготовленным водным раствором краски Романовского в течение 8–15 мин. Этот метод считается наилучшим, особенно для окраски мазков костномозговых пунктатов (табл. 3).

Таблица 3

Нормальная лейкограмма

Показатели	Общее количество лейкоцитов	Палочкоядерные нейтрофилы	Нейтрофилы сегментоядерные	Эозинофилы	Базофилы	Моноциты	Лимфоциты
Процентное отношение	—	2–4	47–67	0,5–5	0–1	2–6	25–35
Количество ($\times 10^9/\text{л}$)	4–9	0,08–0,35	2,0–5,9	0,02–0,44	0–0,088	0,08–0,53	1,0–3,0

Увеличение числа лейкоцитов в периферической крови выше нормального уровня называют **лейкоцитозом**, уменьшение — **лейкопенией**. Лейкоцитоз (лейкопения) редко характеризуется пропорциональным увеличением (уменьшением) числа лейкоцитов всех видов, например лейкоцитоз при сгущении крови. В большинстве случаев имеется увеличение числа (уменьшение) какого-либо одного типа клеток. Увеличение или уменьшение числа отдельных видов лейкоцитов в крови может быть относительным или абсолютным в зависимости от общего содержания лейкоцитов — нормального, повышенного или пониженного. Изменение числа, со-

отношения отдельных форм и морфологии лейкоцитов зависит от вида и вирулентности возбудителя, характера, течения и распространенности патологического процесса, индивидуальной реакции организма.

Изменения лейкоцитов при патологии

Количественные изменения

Нейтрофилез (нейтрофилия) — увеличение содержания нейтрофилов выше 6×10^9 /л крови. Нейтрофильный лейкоцитоз сопровождается бактериальные инфекции, интоксикации и заболевания, протекающие с некрозом ткани. Нейтрофилез наблюдается при сепсисе, перитоните, абсцессе, остеомиелите, пневмонии и многих других воспалительных заболеваниях. Кроме этого, нейтрофилез наблюдается в результате действия гистамина, препаратов наперстянки, применения кортикостероидов, при укусах ядовитых насекомых. Иногда наблюдаются лейкомоидные реакции — изменения крови реактивного характера, напоминающие лейкозы (лейкемии) по степени увеличения числа лейкоцитов или по морфологии клеток. Лейкомоидные реакции нейтрофильного типа описаны при злокачественных опухолях, особенно с множественными метастазами в костный мозг.

Снижение содержания нейтрофилов отмечается при хронических инфекциях, облучении, вирусных заболеваниях, приеме цитостатиков, V_{12} -дефицитных анемиях, агранулоцитозе.

Эозинофилия — повышение уровня эозинофилов крови выше $0,4 \times 10^9$ /л. Эозинофилия сопутствует аллергии, внедрению чужеродных белков и других продуктов белкового происхождения. При некоторых состояниях (эндокардите Леффлера, узелковом периартериите, лимфогранулематозе) могут наблюдаться гиперэозинофильные лейкомоидные реакции, как при хроническом лейкозе (50–70% эозинофилов при количестве лейкоцитов 20–70 тыс.) с эозинофильной гиперплазией костного мозга и инфильтрацией тканей эозинофилами. Понижение числа эозинофилов может наблюдаться при воздействии кортикостероидов, адреналина, никотиновой кислоты, после приема антибиотиков, сульфаниламидных препаратов.

Базофилия — увеличение содержания базофилов в периферической крови, наиболее часто встречается при хроническом миело-

Глава 1. Исследование крови

лейкозе и эритремии, а также при хроническом язвенном колите, некоторых кожных поражениях, при аллергических состояниях, заболеваниях системы крови, воспалительных процессах в печени, при длительном облучении малыми дозами радиации, сахарном диабете, в начале месячных у женщин.

Снижение количества базофилов отмечается при применении лучевой терапии, при острых лейкозах.

Моноцитоз — увеличение числа моноцитов выше $1,0 \times 10^9$ /л крови у взрослого. Моноцитоз является признаком хронического моноцитарного лейкоза. При легочном туберкулезе моноцитоз сопутствует острой фазе заболевания. Кроме этого он может наблюдаться при протозойных и вирусных инфекциях, развитии злокачественных заболеваний, инфекционном мононуклеозе.

Лимфоцитоз — увеличение содержания лимфоцитов выше 5×10^9 /л крови. Лимфоцитоз сопровождает вирусные, некоторые хронические бактериальные инфекции, является характерной чертой хронического лимфолейкоза. Лейкемоидные реакции лимфатического типа отмечаются наиболее часто при инфекционном мононуклеозе, остром инфекционном лимфоцитозе, но возникают иногда при туберкулезе, сифилисе, бруцеллезе.

Он может возникать после тяжелого физического труда, в период затихания воспалительных процессов, во время месячных.

Лейкопения — уменьшение числа лейкоцитов в крови ниже $4,0 \times 10^9$ /л, чаще бывает обусловлена снижением содержания нейтрофилов. Лейкопения (нейтропения) при одних инфекциях (брюшном тифе, паратифах, туляремии, некоторых вирусных инфекциях) выявляется закономерно, при других (подострый бактериальный эндокардит, инфекционный мононуклеоз, милиарный туберкулез) — в некоторых случаях. Факторы (ионизирующая радиация, бензол, цитостатические препараты), обладающие миелотоксическим действием, всегда вызывают лейкопению. Лейкопения (нейтропения) отмечается при недостаточности витамина B_{12} и фолиевой кислоты.

Агранулоцитоз — резкое уменьшение числа гранулоцитов в периферической крови (менее $0,75 \times 10^9$ /л) вплоть до полного исчезновения, ведущее к снижению сопротивляемости организма и развитию бактериальных осложнений:

1) **миелотоксический агранулоцитоз**. Возникает в результате действия цитостатических факторов, зависит от их дозы и экспозиции,

развивается обычно постепенно. Число лейкоцитов может падать очень резко, с нейтрофилами уменьшается содержание других лейкоцитов, ретикулоцитов. Миелотоксическому агранулоцитозу свойственно сочетание лейкопении с тромбоцитопенией и анемией, т. е. панцитопения;

2) к **иммунным агранулоцитозам** относят гаптенный и аутоиммунный (при системной красной волчанке и некоторых других формах иммунной патологии), а также изоиммунный агранулоцитоз (у новорожденных, иногда после гемотрансфузий). Гаптенный агранулоцитоз развивается обычно остро, падение числа нейтрофилов в периферической крови может произойти за несколько часов и закончиться полным их исчезновением из циркуляции. Лейкопения носит чаще более умеренный характер, причем гранулоцитопения может быть изолированной при сохранении лимфоцитов, ретикулоцитов и тромбоцитов. В костном мозге наблюдается уменьшение клеточных элементов за счет гранулоцитарного роста, трепанат нередко оказывается достаточно клеточным.

Продолжительность агранулоцитоза разная: гаптенный в большинстве случаев заканчивается через 1–2 недели при условии соответствующей терапии. Выход из агранулоцитоза характеризуется появлением в крови плазматических клеток, молодых гранулоцитов — метамиелоцитов и миелоцитов, моноцитов.

Аутоиммунный агранулоцитоз связывают с аутоантителами, обнаруживающимися в крови больных системной красной волчанкой и некоторыми другими заболеваниями и являющимися результатом снижения активности Т-супрессоров.

Изоиммунную нейтропению связывают с отсутствием в костном мозге зрелых гранулоцитов, отмечается иногда у новорожденных, что объясняется выработкой в организме матери антител (изоагглютининов) против лейкоцитов плода, проникновением этих антител через плаценту в кровь ребенка и разрушением гранулоцитов.

Эозинопения (менее $0,05 \times 10^9/\text{л}$) отмечается при введении аденкортикотропного гормона, при синдроме Кушинга, стрессовых ситуациях, при начальных фазах инфекционно-токсического состояния.

Лимфоцитопения (менее $1 \times 10^9/\text{л}$) у подростков и детей бывает связана с гипоплазией тимуса и сочетается с врожденной α - γ -глобулинемией, у взрослых наблюдается при лимфогранулематозе, распространенном туберкулезе лимфатических узлов, нередко на-

Глава 1. Исследование крови

ряду с нейтропенией, при системной красной волчанке, остром радиационном синдроме, при стрессе.

Снижение числа моноцитов (менее $0,09 \times 10^9/\text{л}$) имеет значение главным образом при оценке лимфоцитарно-моноцитарного соотношения при легочном туберкулезе.

Морфологические и биохимические изменения

Токсическая грануляция в нейтрофилах — грубая, темно-красного цвета зернистость, содержится в нейтрофилах (сегментоядерных, палочкоядерных, метамиелоцитах) при тяжелых инфекциях или токсических состояниях. У здорового взрослого человека часть гранул нейтрофилов не окрашивается по Романовскому—Гимзе, но при изменении цитоплазматического окружения, что отмечается при патологии, они становятся окрашенными, как лизосомы.

Тельца Деле — овальные или вытянутые образования (включения) светло-голубого или серого цвета в цитоплазме нейтрофильных лейкоцитов, обнаруживаемые при скарлатине, пневмонии, кори, ожогах и представляющие собой участки цитоплазмы, свободные от специфических гранул и богатые РНК.

Гиперсегментация нейтрофильных лейкоцитов — наличие более пяти сегментов в ядрах нейтрофилов, может отмечаться у здоровых людей как наследственная конституционная особенность, но также характерна для макрополицитов при дефиците витамина B_{12} и фолиевой кислоты.

Пельгеровская семейная аномалия лейкоцитов — доминантно наследуемое нарушение созревания, характеризующееся уменьшением сегментации ядер гранулоцитов при нормальной зрелой цитоплазме. Наиболее часто зрелые нейтрофилы содержат двухсегментное или несегментированное ядро, редко — трехсегментное. Иногда форма ядра бывает округлой или вытянутой и напоминает ядра молодых нейтрофилов (палочкоядерных, мета- и миелоцитов), однако отличается от них грубым пикнотичным темноокрашенным хроматином. Обычно отмечается гетерозиготное носительство аномалии с доброкачественным течением.

Характерной чертой синдрома Чедиака—Хигаси — редкого заболевания детей и подростков с аутосомно-рецессивным типом наследования — является **наличие больших цитоплазматических включений** (аномальных гранул) во всех типах клеток крови, за исключением мегакариоцитов. Эти включения в нейтрофилах и мо-

ноцитах содержат миелопероксидазу, кислую фосфатазу, а в лимфоцитах — PAS-положительный материал и представляют собой, по-видимому, гигантские лизосомы.

При хронической гранулематозной болезни детей предрасположенность к повторным гнойным инфекциям и формированию гранулем в органах обусловлена **наследственным метаболическим дефектом гранулоцитов** (а также моноцитов и гистиоцитов), заключающимся в неспособности клеток во время фагоцитоза к респираторному взрыву (окислению глюкозы в гексозомонофосфатном шунте) и формированию перекиси водорода из-за недостаточности НАДФ-Н-оксидазы. Это ведет к нарушению внутриклеточного поглощения бактерий (стафилококков, протеев и др.), которые сами неспособны генерировать перекись водорода. Для диагностики заболевания применяют тест восстановления нитросинего тетразолия.

LE-феномен (lupus erythematosus) наблюдается в процессе инкубации периферической крови больных системной красной волчанкой (СКВ) и некоторых других заболеваний аутоиммунной природы.

Положительный LE-тест (метод ротирования крови со стеклянными бусами в модификации Е. И. Новоселовой) включает следующие морфологические образования: LE-клетки — нейтрофильный лейкоцит, содержащий фагоцитированный гомогенный ядерный материал. Ядерное тело имеет округлую форму, окрашивается в ярко-красный цвет, занимает центральную часть клетки, оттесняя собственное ядро нейтрофила к периферии, причем клетка с включением выглядит в 1,5–2 раза крупнее обычной. Истинные LE-клетки необходимо отличать от так называемых tart-клеток, обычно моноцитов с фагоцитированным ядром; свободно лежащий ядерный материал (гематоксилиновые тела) — образование ядерной природы, округлой формы и величиной с 1–2 лейкоцита, по гомогенной структуре и ярко-красной окраске сходный с телами внутри LE-клеток; «розетки» — образования из нейтрофилов, кольцом окружающие ядерное тело.

Внеклеточные ядерные (гематоксилиновые) тела и розетки рассматривают как промежуточные этапы образования LE-клеток. Формирование LE-клеток зависит от LE-фактора, содержащегося в плазме крови и других жидкостях у больных СКВ и представляющего собой антинуклеарные антитела (главным образом к нуклеопротеину, в меньшей степени к гистону и ДНК) γ -глобулиновой природы.

Глава 1. Исследование крови

Взаимодействие фактора с ядром лейкоцита ведет к деполимеризации ядерного хроматина, освобождению ядерного материала из клетки и последующему фагоцитозу его нейтрофильными лейкоцитами, причем для фагоцитоза необходимо участие комплемента.

ЛЕ-клетки находят в 80% случаев СКВ, при ревматоидном артрите, активном гепатите, склеродермии и при лекарственных волчаночноподобных синдромах.

ЛИМФОЦИТЫ

Жизненный цикл лимфоцитов

Лимфоциты являются главным клеточным элементом иммунной системы организма. В процессе лимфопоэза из общей клетки развиваются 2 класса лимфоидных клеток. Одна отделившаяся клетка мигрирует из костного мозга в тимус, где под влиянием гормоноподобного вещества — тирозина — дифференцируется в **Т-клетки**, поступающие затем в циркуляцию и в периферические лимфоидные органы (лимфоузлы, селезенку, миндалины, лимфоидную ткань кишечника); другая в костном мозге превращается в **В-клетку**, предшественники которой мигрируют в кровь и лимфатические органы. Дальнейшая дифференцировка Т-клеток в эффекторные Т-лимфоциты, в антителопродуцирующие плазматические клетки зависит от антигена. Т-лимфоциты и часть В-лимфоцитов находятся в постоянном движении по периферической крови и тканевым жидкостям. Уровень функциональной дифференцировки лимфоцитов не всегда можно определить морфологически в световом микроскопе, морфологические отличия свойственны лишь иммунобласту — бласттрансформированному под влиянием антигена лимфоциту.

Т-лимфоциты ответственны за распространение чужих антигенов, отторжение чужеродных и собственных клеток, модифицированных антигенами. Они делятся на несколько субклассов — киллеры, хелперы, эффекторы гиперчувствительности замедленного типа, супрессоры.

Система **В-лимфоцитов** также подразделяется на множество мелких функциональных подсистем, способных реагировать с разными антигенами. Подобная специализация (клональная селекция) обеспечивает продукцию около миллиона различных антител. На часть антигенов (тимуснезависимые) В-лимфоциты отвечают

самостоятельно, на большинство других (тимусзависимые АГ) гуморальный ответ возможен при условии кооперирования В-клеток с Т-клетками (и макрофагами) и получения от Т-лимфоцитов (Т-В-хелперов) дополнительного сигнала.

При первичной встрече с антигеном антителопродуцирующие потомки В-клеток синтезируют сначала (2–4 дня после иммунизации) антитела, относящиеся к IgM, затем (4–7 день), если доза антигена большая, происходит синтез антител класса IgG и в конечной стадии — IgF. Кроме того, при первичном ответе образуется клон В-лимфоцитов, обладающий памятью. При вторичной иммунной стимуляции на большинство антигенов вырабатываются антитела класса IgG. Функциональная разнородность лимфоцитов при морфологическом сходстве затрудняет изучение их кинетики. Тем не менее радиоизотопными методами установлено существование двух популяций лимфоцитов — коротко- и долгоживущих. Продолжительность жизни первых около 4 дней, вторых — в среднем около 170 дней. Короткоживущие формы составляют около 30% всех лимфоцитов периферической крови. Большинство В-клеток принадлежат к короткоживущим, а Т-клетки (кроме Т-супрессоров) — к долгоживущим лимфоцитам.

Методы идентификации разных классов и субклассов лимфоцитов основаны на выявлении клеточных рецепторов — поверхностных мембранных структур, обладающих способностью спонтанно связывать некоторые индикаторные клетки или молекулы.

Распределение Т- и В-лимфоцитов в периферической крови человека следующее: 25–30% составляют В-клетки и 60% — Т-клетки. Лимфоциты, на которых не выявляются ни Т-рецепторы, ни В-рецепторы, названы нулевыми, содержание которых в периферической крови около 10%. Предполагают, что к нулевым клеткам принадлежат предшественники Т- и В-лимфоцитов.

ТРОМБОЦИТЫ

Жизненный цикл тромбоцитов

Тромбоциты представляют собой фрагменты клеток мегакариоцитов, основная их функция — участие в процессе свертывания крови. Нормальное количество тромбоцитов: $180\text{--}320 \times 10^9/\text{л}$ — у детей старше 10 дней, $99\text{--}421 \times 10^9/\text{л}$ — у взрослых.

Глава 1. Исследование крови

Одна треть вышедших из костного мозга тромбоцитов депонируется в селезенке, остальная часть циркулирует в крови.

Тромбоциты живут максимум 10–12 дней, средняя продолжительность жизни тромбоцита составляет 7 суток. Родоначальной клеткой мегакариоцитарного ряда является **мегакариобласт** — клетка крупного размера (20 мкм) с ядром грубой структуры, содержащим нуклеолы. Цитоплазма базофильная.

Промегакариоцит имеет тенденцию к полиморфизму ядра, цитоплазма базофильная, беззернистая.

Мегакариоцит — гигантская клетка костного мозга диаметром от 60 до 120 мкм. Ядро грубое, принимает различные, иногда причудливые, формы.

Цитоплазма отличается очень большими размерами, содержит зернистость розово-фиолетового цвета. От цитоплазмы мегакариоцита отшнуровываются тромбоциты.

Тромбоциты содержатся в периферической крови у здоровых лиц в основном в виде нормальных зрелых пластинок (90–98%) размером от 1 до 3 мкм, имеющих четкие границы, сиреневый гиаломер и центрально расположенный грануломер, состоящий из 5–20 азурофильных зерен.

Другие виды пластинок: юные (с голубоватым гиаломером и скудной зернистостью), старые (с неровными очертаниями и плотным грануломером, иногда занимающим весь тромбоцит) формы раздражения (мелкие или в виде гигантских тромбоцитов); в норме составляют лишь небольшой процент и появляются в большем количестве при патологии.

Тромбоциты — кровяные пластинки — имеют 3 структурные зоны:

1) периферическую (трехслойная мембрана, содержащая рецепторы для коллагена, АДФ, серотонина, эпинефрина, тромбина, фактора Виллебранда; на внешней стороне мембраны расположен аморфный слой из кислых мукополисахаридов и адсорбированных факторов свертывания плазмы крови);

2) зоны «золь-гель» (микротубулы-каналы, часть которых имеет выход на наружной мембране; микрофиламенты, содержащие контрактильный протеин тромбостеин, участвующий в поддержании дискообразной формы пластинок; от его свойств зависит ректракция кровяного сгустка);

3) зону органелл (гликогеновые гранулы, митохондрии, α -гранулы, плотные тела, аппарат Гольджи).

Гранулы высокой плотности содержат серотонин, адреналин (адсорбируются из плазмы через каналикулярную систему), кальций, неметаболические АДФ и АТФ, 4 фактора тромбоцитов, гранулярную часть, 3 фактора тромбоцитов; α -гранулы содержат гидролитические ферменты (кислую фосфатазу, β -глюкуронидазу, катепсины), фибриноген тромбоцитов. Тромбоциты используют энергию АТФ, образуемую в процессе гликолиза, а также в процессе фосфорилирования.

Определение количества тромбоцитов

Метод подсчета в мазке крови. В мазке крови подсчитывают количество тромбоцитов по отношению к 1 тыс. эритроцитов. Зная абсолютное число эритроцитов в 1 мкл крови, вычисляют количество кровяных пластинок в 1 мкл. Для предотвращения агглютинации кровяных пластинок на место укола наносят каплю 14%-ного раствора сульфата магния. Выделившуюся каплю крови смешивают с магnezией и из смеси готовят мазки на предметных стеклах, которые окрашивают по Романовскому—Гимзе в течение 2—3 ч. Подсчет кровяных пластинок производят под иммерсионной системой микроскопа с использованием сетчатого окуляра или вкладного окошка.

Существует **метод подсчета тромбоцитов в камере**, при котором кровь разводят для предотвращения свертывания и агглютинации тромбоцитов в консервирующей жидкости, например в 5—7%-ном растворе трилона Б, заполняют камеру и подсчитывают тромбоциты и эритроциты одновременно. Сосчитав 1 тыс. эритроцитов, суммируют общее количество встретившихся тромбоцитов. Зная количество эритроцитов в единице объема крови, высчитывают количество тромбоцитов для единицы объема крови.

Метод подсчета тромбоцитов на счетчике частиц. Тромбоциты можно подсчитывать на любом счетчике частиц типа «Культер» и «Целлоскоп». Венозную кровь, смешанную с антикоагулянтом (цитратом натрия), оставляют на несколько часов для оседания эритроцитов и лейкоцитов. Тромбоциты практически не оседают и остаются равномерно распределенными в плазме крови.

Глава 1. Исследование крови

Плазму разводят изотоническим раствором хлорида натрия и пропускают через счетчик. Используется измерительная трубка с капиллярным отверстием для подсчета тромбоцитов (50 мкм). Затем производят второй подсчет, пользуясь измерительной трубкой с большим капиллярным отверстием для подсчета оставшихся в плазме и не осевших эритроцитов (60 мкм). Разность между результатами первого и второго подсчета показывает истинное количество тромбоцитов.

В настоящее время подсчет числа тромбоцитов производится на гематологическом анализаторе. Это повышает точность и скорость подсчета тромбоцитов. Принцип подсчета основан на кондуктометрическом методе. Обычно ход исследования излагается в инструкции к прибору.

Число тромбоцитов у здорового человека в среднем составляет $180-320 \times 10^9/\text{л}$.

Исследование адгезии тромбоцитов

Из способов изучения адгезии тромбоцитов наиболее информативными являются закрытые методы, при которых кровь прямо из вены пропускается через колонку со стеклянными бусами (диаметр 0,5 мм) с соблюдением времени контакта. По разнице количества тромбоцитов в крови до и после прохождения через колонку судят о количестве тромбоцитов, подвергшихся адгезии к стеклу.

Исследование агрегации тромбоцитов

Агрегацию тромбоцитов исследуют в обогащенной тромбоцитами плазме крови с помощью ФЭК или специальных фотометров (агрегометров) либо микроскопически — путем подсчета тромбоцитарных агрегатов и свободно лежащих тромбоцитов.

Агрегационную функцию тромбоцитов определяют при воздействии различных физиологических агрегирующих агентов: оптимальных и малых доз АДФ, коллагена (в эмульсии), адреналина, малых доз тромбина.

Кроме этих методов, применяют электронно-микроскопические (изучение ультраструктуры тромбоцитов), радиоизотопные (определение продолжительности жизни тромбоцитов), гистологические (исследование мегакариоцитов в срезах костного мозга),

иммунологические (определение антитромбоцитарных антител) методы исследования.

Оптическая агрегатометрия. Прибор регистрирует изменения светопропускания плазмы, обогащенной тромбоцитами. До анализа данным методом необходимо центрифугировать образец крови для получения средней концентрации тромбоцитов $200\text{--}250 \text{ г} \times 10^9/\text{л}$. Отрицательное последствие центрифугирования — возможность контактной активации тромбоцитов, а также потери части рецепторов с их поверхности. Положительная сторона — наличие одинаковой концентрации тромбоцитов, что позволяет сравнить результаты анализов у одного пациента, проведенных в разное время.

Импедансная агрегатометрия. Для анализа берут цельную кровь. Данный метод не нуждается в предварительной подготовке, получении обогащенной плазмы. В нем измеряется изменение сопротивления между двумя электродами, погруженными в цельную кровь. Данный анализ демонстрирует физиологическое состояние в крови пациента в конкретный момент забора крови. Посредством этого метода возможно выполнение значительного количества исследований за меньшее время.

Как гипоагрегация (снижение агрегационной способности тромбоцитов), так и гиперагрегация (склонность к тромбообразованию) могут быть выявлены любым из приведенных выше методов. Считается, что гипоагрегацию лучше распознает оптическая агрегатометрия, а гиперагрегацию — импедансная.

Гематологические анализаторы рисуют тромбоцитометрические кривые-гистограммы. При наличии молодых форм происходит сдвиг гистограммы вправо, старые формы располагаются слева, так как по мере старения их объем уменьшается.

Изменения тромбоцитов при патологии

Тромбоцитоз — увеличение числа тромбоцитов выше чем $400 \times 10^9/\text{л}$ — бывает первичным (результат первичной пролиферации мегакариоцитов) и вторичным (на фоне какого-либо заболевания). Вторичный тромбоцитоз (реактивный) обычно не столь выражен, как первичный, реже осложняется тромбозом или кровотечением и исчезает при устранении причины. Он встречается при ревматической лихорадке, ревматоидном артрите, туберкулезе, циррозе печени, остеомиелите, острой кровопотере, карциноме, состоянии после спленэктомии, после операций, остром гемолизе и других заболеваниях.

Глава 1. Исследование крови

Тромбоцитоз как часть миелопролиферативного синдрома (эритремии, хронического миелолейкоза, миелофиброза) может быть очень выражен (до 4–5 млн в 1 мкл крови), обычно стоек и сочетается с лейкоцитозом, а при эритремии — с эритроцитозом.

Тромбоцитопения — уменьшение числа тромбоцитов в крови — может быть значительной или умеренной, однако клинические проявления геморрагического синдрома возникают при количестве тромбоцитов $180 \times 10^9/\text{л}$.

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ АНАЛИЗАТОРЫ

В настоящее время в лабораторной диагностике широко используются гематологические анализаторы, позволяющие измерить ряд параметров крови. С полным стандартом оснащения клиничко-диагностических лабораторий различных уровней можно ознакомиться в Приказе Министерства здравоохранения Российской Федерации от 18 мая 2021 года № 464н «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований».

Благодаря появлению новых технологий, в том числе компьютерной и телевизионной техники при микроскопическом анализе, появились новые возможности исследования изменения формы, структуры объектов, а также спектральных свойств и количества вещества. Это приводит к повышению объективности исследований клеток и тканей. В медицинской практике особенно важна диагностическая морфометрия, способствующая дифференциальной диагностики патологических процессов, характеризующихся близкими морфологическими проявлениями.

Автоматические лабораторные анализаторы в большинстве своем представляют собой компьютерные анализаторы изображений. Современные лабораторные комплексы позволяют сохранять изображения объектов, проводить измерения, сравнивать полученные данные как с результатами предыдущих измерений, так и со стандартной базой данных.

Виды компьютерных анализаторов изображений:

1. Универсальные. Используются в различных областях медицины. Широко распространены в лабораторной медицине. Включают в себя расширенный набор измеряемых параметров, а также готовые методики:

- архивирование изображения и улучшение его качества;
- измерение объектов как в ручном, так и в автоматическом режиме;
- подсчет количества объектов различных классов, а также процентного соотношения между ними;
- подсчет количества объектов определенного класса;
- анализ соотношения ядер и цитоплазмы;
- иммуногистография для ядер и пр.

2. Специализированные. Применяются для автоматизации конкретных методов исследования (хромосомный анализ, автоматический анализ формулы крови и пр.).

Автоматические гематологические анализаторы далеко не универсальны. Точность анализов зависит прежде всего от квалификации специалиста. В частности, анализатор не может оценить патологические включения в эритроциты, а это необходимо при диагностике анемии. Анализатор не способен распознать атипичные клетки, такие как типичные мононуклеары, а это мешает диагностировать инфекционный мононуклеоз. Не распознаются анализатором молодые клетки, характерные для лейкозов. Ошибка возможна и при подсчете тромбоцитов, поскольку они могут быть распознаны как фрагменты эритроцитов или лейкоцитов, микросгустки. В итоге результаты анализов получаются завышенными или, в случае склеивания тромбоцитов, заниженными. Для исключения подобных ошибок необходим контроль специалиста. В частности, при подсчете тромбоцитов следует осуществлять подсчет или контроль тромбоцитов в мазке крови под микроскопом.

В лабораторной практике могут быть использованы различные виды гематологических анализаторов.

Анализаторы гематокрита ИВД, автоматические и полуавтоматические. Предназначены для определения гематокрита эритроцитов (объема массы эритроцитов) в образце цельной крови. Принцип действия анализаторов данного типа может быть основан на центрифугировании, фотометрии, электрометрии.

Анализаторы гематологические, автоматические и полуавтоматические. Осуществляют подсчет популяций клеток крови. Принцип действия основан на технологии лизиса, электропроводности, электрического сопротивления, светорассеяния. Используются для измерения и подсчета параметров эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов.

Глава 1. Исследование крови

Анализатор ретикулоцитов. Применяется для качественного и количественного определения незрелых эритроцитов (ретикулоцитов). Принцип работы основан на применении специфического источника света (в частности, лазера) для определения количества, а также степени созревания эритроцитов. Действие прибора основано на выявлении рибонуклеиновой кислоты (РНК), окрашенной для обнаружения или связанной посредством флуоресцентного маркера.

Анализатор объема циркулирующей крови. Применяется для количественного определения циркулирующей крови, плазмы или объема эритроцитов пациента. Принцип действия: пациенту вводится радиоактивная метка (в частности, изотоп йода 131), после чего через определенные временные интервалы берутся образцы крови. Степень разбавления раствора с радиоактивной меткой применяется для определения объема крови: пробы сравниваются с идеальным объемом крови, рассчитанным в зависимости от роста, массы тела, половой принадлежности пациента и пр. Часть этапов процедуры автоматизирована.

Агрегометры тромбоцитов, автоматические и полуавтоматические. Применяются для качественного и количественного определения функции тромбоцитов. Принцип действия: индуктирование агрегации тромбоцитов путем добавления тромбоцитных агрегационных агентов. Прибор может работать на основе ряда технологий, в том числе фотометрии, электрического импеданса, турбидиметрии, люминесценции совместно с обработкой и визуальным воспроизведением данных.

Система микроскопического анализа клеток. Применяется для количественного микроскопического анализа крови, а также прочих клинических образцов. Путем использования прибора осуществляется изучение, подсчет, запись, оценка морфологических характеристик клеток и прочих биологических компонентов. Обычно в состав системы входят микроскоп, камера, монитор, пакет программного обеспечения. Возможно наличие дополнительного оборудования, в частности, для электрического воздействия на клетки.

Анализаторы гемоглобина лабораторные, автоматические и полуавтоматические. Применяются для определения концентрации гемоглобина. Работа основана на технологии колориметрии, электрометрии или фотометрии.

Анализаторы скорости оседания эритроцитов, автоматические и полуавтоматические. Применяются для определения СОЭ в антикоагулированном образце цельной крови.

Гематологические анализаторы

Современные гематологические анализаторы позволяют расшифровать от 5 до 24 показателей крови.

Таблица 4

Обозначение основных показателей крови в современных гематологических анализаторах

Сокращенное написание	Расшифровка	Показатель
Общие показатели		
WBC	White blood cells — белые клетки крови, лейкоциты	Абсолютное содержание лейкоцитов
RBC	Red blood cells — красные клетки крови, эритроциты	Абсолютное содержание эритроцитов
HGB	Hb, hemoglobin, гемоглобин	Концентрация гемоглоби- на в цельной крови
HCT	Hematocrit, гематокрит	Гематокрит — отношение объема форменных элемен- тов к плазме
PLT	Platelets, тромбоциты	Абсолютное количество тромбоцитов
Эритроцитарные индексы		
MCV	Средний объем эритро- цита, мкм или фл	Определение наличие ми- кроцитоза, нормоцитоза, макроцитоза
MCH	Среднее количество гемоглобина в эритро- ците, в абсолютных единицах	Указывается цветовой показатель
MCHC	Средняя концентрация гемоглобина в одном эритроците	Степень насыщенности эритроцита гемоглобином
Тромбоцитарные индексы		
MPV	Mean platelet volume	Среднее количество тром- боцитов
PDW	Гетерогенность тромбо- цитов	Относительная ширина тромбоцитов и распределе- ние в объеме
PCT	Platelet crit	Тромбокрит — процент объема цельной крови, которую занимают тром- боциты

Глава 1. Исследование крови

Сокращенное написание	Расшифровка	Показатель
Лейкоцитарные индексы		
LYM% (LY%)	Lymphocyte	Процент концентрации лимфоцитов
LYM# (LY#)	Lymphocyte	Абсолютное число лимфоцитов
MXD%		Относительный процент смеси, состоящей из моноцитов, базофилов и эозинофилов
MXD#		Абсолютное количество смеси, состоящей из моноцитов, базофилов и эозинофилов
NEUT% (NE%)	Neutrophils	Процент нейтрофилов
NEUT# (NE#)	Neutrophils	Абсолютное количество нейтрофилов
MON% (MO%)	Monocyte	Процент моноцитов
MON# (MO#)	Monocyte	Абсолютное количество моноцитов
EO%		Относительный процент эозинофилов
EO#		Абсолютное количество эозинофилов
BA%		Относительный процент базофилов
BA#		Абсолютное количество базофилов
IMM%		Относительный процент незрелых гранулоцитов
IMM#		Абсолютное количество незрелых гранулоцитов
ATL%		Относительный процент атипичных лимфоцитов
ATL#		Абсолютное количество атипичных лимфоцитов
GR%		Относительный процент гранулоцитов
GR#		Абсолютное количество гранулоцитов

Гематологические анализаторы

Сокращенное написание	Расшифровка	Показатель
Эритроцитарные индексы		
RBC/HCT		Средний объем эритроцитов
HGB/RBC		Среднее количество гемоглобина в эритроците
HGB/HCT		Средняя насыщенность эритроцита гемоглобином
RDW	Red cell Distribution Width — ширина распределения эритроцитов	Характеризует гетерогенность эритроцитов
RDW-SD		Стандартное отклонение ширины распределения эритроцитов по объему
RDW-CV		Коэффициент вариации относительной ширины распределения эритроцитов по объему
P-LCR		Коэффициент, указывающий количество больших тромбоцитов
ESR (СОЭ)	Скорость оседания эритроцитов	Маркер патологии

Комплекс «Видео-Тест-Гем»

В качестве примера приводится один из видов автоматических анализаторов, подходящих для применения в клинической лабораторной диагностике, — это автоматизированный комплекс «Видео-Тест-Гем» российского производства. Данный комплекс дает возможность автоматизировать методы анализа крови. Применение автоматических анализаторов способствует повышению объективности данных и производительности. Забор крови может осуществляться как вручную, так и путем применения механических и автоматических устройств.

Возможности анализатора:

1. Автоматический просмотр мазка крови с возможностью выборки лейкоцитов, подсчета лейкоцитарной формулы, анализа

Глава 1. Исследование крови

эритроцитов, тромбоцитов, количественной оценки анизоцитоза и пойкилоцитоза.

2. Построение кривой Прайс-Джонса, определение характеристик эритроцитов: толщина, индекс сферичности, оптическая плотность, график распределения по форме, индекс овалоцитоза.

3. Подсчет тромбоцитов по Фонио, определение характеристик тромбоцитов: относительная концентрация, гистограмма распределения по площади.

4. Получение изображений клеток и возможность корректировки результатов специалистом.

5. Ввод изображений клеток костного мозга, подсчет миелограммы.

6. Сохранение результатов в базе данных, возможность дальнейшего вывода на печать.

Итак, компьютерный анализатор изображений позволяет оценить форму эритроцитов как количественно, так и качественно, способствует объективной оценке объектов, не зависящей от опыта и классификации врача, что упрощает диагностику отдельных патологических состояний.

ИЗМЕНЕНИЯ КАРТИНЫ КРОВИ ПРИ ПАТОЛОГИИ

Различают 5 типов изменений в клеточном составе «белой крови» при различных заболеваниях.

1. Нейтрофильно-эозинопенический. Для него характерны увеличение содержания лейкоцитов, нейтрофилов; снижение моноцитов, лимфоцитов, эозинофилов. Эти изменения регистрируются при онкологических заболеваниях, септических состояниях, пневмонии, перитоните.

2. Нейтрофильно-эозинофильный. Характеризуется лейкоцитозом, нейтрофильным сдвигом влево, эозинофилией, снижением количества лимфоцитов, моноцитов. Встречается при туберкулезе, лимфогранулематозе, скарлатине.

3. Нейтропенический. При этом выявляется увеличение количества лимфоцитов, уменьшение содержания нейтрофилов, «дегенеративный» сдвиг влево. Выявляется при многих инфекционных заболеваниях.

Изменения картины крови при патологии

4. Реакции моноцитарные и лимфатические. Встречаются при инфекционных заболеваниях, сопровождаются лейкоцитозом, моноцитозом, лимфоцитозом.

5. Протозойный. Характеризуется лейкопенией, лимфопенией. Встречается при лейшманиозе, малярии.

Малярия. Малярийный плазмодий паразитирует в организме человека как в промежуточном хозяине, так как здесь протекает бесполовая фаза его жизненного цикла. Она называется шизогонией. Вначале спорозоиты инвазируют гепатоциты. После разрушения гепатоцитов спорозоиты, которые преобразовались в мерозоиты, внедряются в эритроциты. Это так называемая эритроцитарная шизогония. После разрушения эритроцита мерозоиты выходят в русло крови, при этом часть паразитов, не подвергшихся фагоцитозу, заражает новые эритроциты, и цикл шизогонии повторяется.

Лабораторная диагностика проводится путем микроскопического исследования мазков крови больного, окрашенных по Романовскому—Гимзе, а также препаратов, приготовленных методом «толстой капли» и «тонкого мазка». При этом дифференциация видов плазмодиев основана на морфологических особенностях паразитов, а также пораженных эритроцитов. В ряде случаев используется серодиагностика (реакция иммунофлюоресценции, пассивной геммагглютинации, иммуноферментный анализ).

Крупозная пневмония. Наблюдаются лейкоцитоз с нейтрофилезом, сдвиг лейкоцитарной формулы влево до метамиелоцитов. Иногда могут встретиться миелоциты. В нейтрофилах появляется токсигенная зернистость, которая исчезает после кризиса. Относительная лимфоцитопения, эозинопения; скорость оседания эритроцитов увеличена.

Сепсис. Гнойные заболевания (флегмона, остеомиелит, абсцессы). Характерен высокий лейкоцитоз, нейтрофилез со сдвигом влево до метамиелоцитов и миелоцитов. Индекс сдвига достигает 0,3–0,4. Резко выражены токсигенная зернистость нейтрофилов, эозинофилия. В крайне тяжелых случаях лейкоцитоз сменяется лейкопенией с нейтрофилезным ядерным сдвигом влево. Возникает тромбоцитопения. В красной крови снижается количество эритроцитов и гемоглобина; наблюдается значительное увеличение скорости оседания эритроцитов.

Брюшной тиф. Характерна нейтропения, наступающая на 2-й неделе болезни. Одновременно нарастает относительное число

Глава 1. Исследование крови

лимфоцитов. Лимфоцитоз и нейтропения со сдвигом влево держатся до конца болезни. Анэозинофилия. Появление эозинофилов рассматривается как благоприятный признак. Снижается количество тромбоцитов. С течением болезни нарастает скорость оседания эритроцитов.

Скарлатина. Наблюдаются нейтрофильный лейкоцитоз со сдвигом влево и токсикогенная зернистость в нейтрофилах, моноцитоз и лимфоцитопения. Заболевание протекает с эозинофилией, достигающей иногда больших цифр. С исчезновением сыпи прекращается и эозинофилия.

Коклюш. Появляется высокий лейкоцитоз с абсолютным лимфоцитозом и моноцитозом. У маленьких детей может наступить лейкомоидная реакция с количеством лейкоцитов до 50 млн в 1 мкл крови и высоким содержанием лимфоцитов.

Грипп. Заболевание протекает с нормальным количеством лейкоцитов или лейкопенией. При этом наблюдается нейтропения с умеренным сдвигом влево. Индекс сдвига до 0,1–0,2. Умеренный относительный лимфоцитоз, снижение количества эозинофилов.

Злокачественные новообразования. Типичные изменения в крови наступают на поздних стадиях заболевания и отчасти зависят от локализации опухоли. Характерны наличие умеренного лейкоцитоза с нейтрофилезом без левого сдвига, моноцитоз, тромбоцитоз. Наблюдается снижение количества эритроцитов и гемоглобина. Скорость оседания эритроцитов резко увеличена.

Острая лучевая болезнь. В первые часы после облучения появляется нейтрофильный лейкоцитоз, в тяжелых случаях быстро сменяющийся лейкопенией с нейтрофилезом. Скорость оседания эритроцитов обычно несколько замедлена. В период разгара болезни наступает резкое угнетение функции костного мозга, что проявляется в подавлении всех источников кроветворения. В периферической крови отмечается лейкопения с нейтропенией и токсикогенной зернистостью нейтрофилов. Катастрофически падает количество эритроцитов и гемоглобина. Количество тромбоцитов снижается до единичных в препарате.

Хроническая лучевая болезнь. В раннем периоде изменения количества лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов непостоянны. Часто наблюдаются нейтрофильный лейкоцитоз, умеренная эозинофилия, моноцитоз. В разгар заболевания наступает стойкая

Изменения картины крови при патологии

лейкопения с относительным лимфоцитозом. При этом в единице объема крови количество лимфоцитов и нейтрофилов снижено. Развивается эозинопения. Падает число эритроцитов и тромбоцитов. Развивается панцитопения.

К заболеваниям кроветворного аппарата относятся апластические анемии. **Апластическая анемия** — это синдром, характеризующийся снижением количества кроветворных элементов в костном мозге и резкой панцитопенией в периферической крови, что является следствием угнетения кроветворения в костном мозге. Заболевание начинается с анемии, затем присоединяются тромбоцитопения и агранулоцитоз.

Апластические анемии могут возникнуть после приема некоторых лекарств, являющихся аллергенами (амидопирин, некоторых антибиотиков), а также длительного воздействия ряда химических веществ (бензола), оказывающих токсическое воздействие на костный мозг. Развитию апластической анемии способствуют хронические заболевания (туберкулез, сифилис) и длительное применение при них лекарственных препаратов, а также вирусная инфекция (инфекционный гепатит). Ионизирующая радиация также является фактором, вызывающим аплазию костного мозга. Апластические анемии, причины возникновения которых не выяснены, называют идиопатическими. Считается, что одной из причин апластической анемии является уменьшение количества стволовых клеток. Апластические состояния бывают и конституциональными, передающимися по наследству.

Гематологическими признаками аплазии костного мозга являются выраженная анемия (концентрация гемоглобина падает до 20–30 г/л), лейкопения (нейтропения с относительным лимфоцитозом) и тромбоцитопения, иногда до полного исчезновения тромбоцитов. Анемия чаще нормохромная и макроцитарная, число ретикулоцитов снижено. Во многих случаях наблюдается повышение уровня фетального гемоглобина (HbF составляет до 15% общего гемоглобина), и обычным является повышение уровня эритропоэтина. Основной признак — рефрактерная к лечению анемия. Пункционная биопсия костного мозга показывает малое количество ядросодержащих клеток.

Гемобласты — опухолевые заболевания кроветворной ткани — разделяются на 2 группы: формы с диффузным поражением костного мозга и формы, характеризующиеся первоначальным

Глава 1. Исследование крови

внекостномозговым опухолевым ростом. Первые обозначают как лейкозы, вторые — лимфомы (лимфосаркомы).

Лейкозы делят на острые и хронические. Морфологический субстрат острого лейкоза составляют молодые клетки (бластные формы 2—3-го класса предшественников или клетки 4-го класса), основная масса опухоли при хроническом лейкозе представлена зрелыми и созревающими клетками. Названия разным формам острого лейкоза даны соответственно нормальным гомологичным костномозговым предшественникам (лимфобластам, миелобластам и т. д.). Хронические лейкозы обозначают по названию тех зрелых и созревающих клеток, которые характеризуют опухолевую пролиферацию. Морфологические классификации внекостномозговых опухолей разделяют на 2 группы: лимфогранулематоз (болезнь Ходжкина) и неходжкинские лимфомы.

Лейкозные клетки отличаются от нормальных гомологичных клеток рядом морфологических, химических, цитогенетических особенностей.

Бластные клетки могут быть значительно увеличены в размере (в 2—3 раза) или уменьшены до размера лимфоцита; характерен анизоцитоз. Контуры ядра нередко деформированы, количество хроматина увеличено и распределено неравномерно. Отмечаются вакуолизация ядра, его сегментация, многоядерность. В костном мозге увеличено количество клеток в стадии митоза. Число нуклеол часто увеличено (до 8 и более), размер их может достигать $1/3$ — $1/2$ диаметра ядра. Отмечаются повышенная базофилия цитоплазмы, ее вакуолизация. Нередко обнаруживаются выраженная азурофильная зернистость и тельца Ауэра.

Цитохимические показатели, используемые для дифференцировки различных форм лейкозов:

1) активность миелопероксидазы определяют при дифференцировке острых миелобластных лейкозов. Миелопероксидаза выявляется в гранулоцитах, у части моноцитов. Клетки миелоидного ряда проявляют пероксидазную активность, начиная с некоторых миелобластов; лимфоциты дают строго отрицательную реакцию;

2) для лейкоэмических лимфобластов характерна отрицательная реакция на липиды, для миелобластов — положительная;

3) гликоген содержится во всех клетках в большем или меньшем количестве. Он обнаруживается преимущественно в зрелых гранулоцитах. В миелобластах гликоген или вовсе не содержится,

Изменения картины крови при патологии

или представлен в виде гомогенной массы розового цвета при окраске фуксином, входящим в состав реактива Шиффа. В лимфоцитах гликоген выявляется в виде гранул красного цвета. Его содержание повышается при хроническом лимфатическом или остром лимфобластном лейкозах;

4) активность неспецифической эстеразы в разной степени выявляется во всех лейкоцитах, максимально — в незрелых гранулоцитах и моноцитах. Моноциты и их предшественники дают самую интенсивную реакцию на α -нафтилэстеразу. Это позволяет отличать моноциты и служит критерием диагностики острого монобластного лейкоза. Хлорацетат-эстераза выявляется во всех клетках миелоидного ряда, но особенно в промиелоцитах, что позволяет дифференцировать промиелоцитарный вариант острого миелобластного лейкоза;

5) активность кислой фосфатазы повышается при остром монобластном, остром миелобластном и промиелоцитарном лейкозах;

6) высокое содержание лизоцима в крови и моче характерно для хронического моноцитарного и острого монобластного лейкозов;

7) при хроническом миелолейкозе активность щелочной фосфатазы снижается, тогда как при эритремии, лейкомоидных, миелоидных реакциях и нагноениях количество обладающих активностью фермента гранулоцитов и уровень ее в каждом из них повышаются. Увеличение активности щелочной фосфатазы в гранулоцитах при остром лейкозе является благоприятным признаком.

Для всех форм лейкозов характерно резкое изменение кровяного состава, т. е. полное или почти полное замещение нормальной ткани патологической тканью опухоли. Бластные клетки теряют способность к созреванию. В периферической крови появляются бластные формы: миелобласты, лимфобласты, эритробласты и др. Морфологически бластные клетки мало отличаются друг от друга, поэтому для их дифференцировки применяются цитохимические методы. В мазке периферической крови и костного мозга преобладают бласты (до 99%), но встречаются и единичные зрелые клетки (1–5%). Созревающих клеток, промежуточных между ними, нет. Это явление называется лейкемическим зиянием и характерно только для острых лейкозов. Острый лейкоз часто протекает с лейкоцитозом (до 100–300 тыс. в 1 мкл). Однако это заболевание может сопровождаться лейкопенией (до 200–300 в 1 мкл). Вслед-

Глава 1. Исследование крови

ствии разрастания опухолевой ткани угнетаются эритроцитарный и тромбоцитарный ростки кроветворения.

Хронические лейкозы характеризуются меньшей степенью анаплазии, чем острые. Субстрат опухоли представлен созревающими и зрелыми клетками. В отличие от острого лейкоза бластных форм в периферической крови мало. Они появляются главным образом при обострении заболевания. Общим признаком хронических лейкозов служит лейкоцитоз.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КРОВИ

Определение вязкости крови. Определение вязкости крови основано на сравнении скорости продвижения крови и дистиллированной воды в одинаковых капиллярах в вакууме при комнатной температуре. Определение проводится в приборе вискозиметре.

В правую капиллярную пипетку вискозиметра набирают дистиллированную воду до отметки «0». В левый капилляр насасывают кровь из пальца также до нулевой отметки. Проворачивают трехходовой кран таким образом, чтобы соединить обе капиллярные пипетки с резиновой трубкой, через которую втягивают воздух из обеих пипеток для образования вакуума. При этом столбики воды и крови продвигаются вперед с разной скоростью, которая зависит от вязкости. Как только столбик крови дойдет до отметки «1», втягивание воздуха прекращают. За это время вода, обладающая меньшей вязкостью, продвигается значительно дальше, чем кровь. Вязкость крови определяют по длине пути, пройденного водой, который отсчитывается по шкале градуированной пипетки. Вязкость крови в норме для мужчин равна 4,3–5,4, а для женщин — 3,9–4,9 делений шкалы.

Наблюдается зависимость вязкости крови от количества и объема эритроцитов, общего содержания белка и соотношения его фракций в плазме, а также от содержания в крови углекислоты. Повышение вязкости отмечается при сгущении крови и некоторых видах лейкозов (эритремии, миелофиброзах), понижение — при анемиях.

Определение скорости оседания эритроцитов осуществляется микрометодом в модификации Панченкова. Определение производят

Исследование физико-химических свойств крови

в специальных градуированных капиллярах, имеющих просвет 1 мм и длину 100 мм. Пипетку предварительно промывают 3,7%-ным раствором цитрата натрия, затем набирают этот раствор в пипетку до отметки «70» (30 мкл) и выливают на дно пробирки Видалья. Кровь из пальца насыщают тем же капилляром — сначала целый капилляр, затем еще до отметки «80» (120 мкл). Количество цитрата и крови может быть разное — 25 мкл цитрата и 100 мкл крови, 50 мкл цитрата и 200 мкл крови, но соотношение их должно быть обязательно 1 : 4. Кровь помещают в пробирку с цитратом и после тщательного перемешивания вновь набирают в капиллярную пипетку до метки «0». Капилляр с цитратной кровью ставят в штатив вертикально между двумя резиновыми прокладками и оставляют на 1 ч. Затем определяют величину оседания по столбику плазмы над осевшими эритроцитами. Деление капиллярной пипетки, соответствующее границе плазмы и эритроцитов, записывают как величину скорости оседания эритроцитов в миллиметрах в час (мм/ч).

В последние годы применяется международный метод определения СОЭ — метод Вестергрена с использованием капилляров длиной 200 мм. Также все более широкое применение находят автоматические и полуавтоматические анализаторы параметров крови.

Скорость оседания эритроцитов в норме меняется в зависимости от возраста и пола. У новорожденных скорость оседания эритроцитов редко выше 2 мм/ч; дети имеют более низкую скорость оседания (1–8 мм/ч), чем взрослые, а лица среднего возраста — меньше, чем старики. У мужчин скорость оседания эритроцитов более низкая (в среднем 5 мм/ч, колебания от 1 до 10 мм/ч), чем у женщин (в среднем 9 мм/ч, колебания от 2 до 15 мм/ч).

При определении по Вестенгрену СОЭ — до 20 мм/ч.

Поскольку скорость оседания эритроцитов зависит в основном от белковых сдвигов (увеличения содержания фибриногена, α_2 -глобулинов, γ -глобулинов), то увеличение скорости оседания эритроцитов наблюдается при всех состояниях, сопровождающихся воспалением, деструкцией соединительной ткани, тканевым некрозом, иммунными нарушениями.

Определение гематокрита. Гематокрит (Ht) — это соотношение между объемом форменных элементов крови и объемом плазмы. Метод основан на разделении плазмы и эритроцитов с помощью центрифугирования. Определение производят в гематокрической

Глава 1. Исследование крови

трубке, представляющей собой стеклянную пипетку, разделенную на 100 равных частей. Перед взятием крови гематокрическую трубку промывают раствором гепарина или щавелевокислых солей (0,82 г оксалата калия, 1,2 г оксалата аммония и 100 мл дистиллированной воды). Затем набирают в трубку капиллярную кровь до отметки «100», закрывают резиновым колпачком и центрифугируют в течение 1–1,5 ч при 1,5 тыс. об./мин. После этого отмечают, какую часть в градуированной трубке составляют эритроциты.

Гематокритную величину определяют с помощью отсчетной шкалы, прилагаемой к центрифуге. В норме объем массы эритроцитов меньше объема плазмы. Гематокритная величина у женщин составляет 36–42%, у мужчин — 40–48%. Увеличение гематокрита наблюдается при эритремии и обезвоживании организма, уменьшение — при анемиях. Величиной гематокрита пользуются для расчета массы эритроцитов, циркулирующих в крови, и некоторых других показателей крови, например средней процентной концентрации гемоглобина в одном эритроците и среднего объема одного эритроцита. Практически средний объем одного эритроцита определяют по формулам:

- 1) величину гематокрита в объемных процентах умножают на 10, затем делят на число миллионов эритроцитов в 1 мкл крови;
- 2) величину гематокрита, умноженную на 100, затем также делят на число миллионов эритроцитов в 1 мкл крови.

В современных гематологических счетчиках Ht является вторичным параметром, выводимым из количества эритроцитов и их объема. Гематокрит равен содержанию эритроцитов в крови, умноженному на средний объем эритроцитов.

Определение резистентности эритроцитов. Резистентность — свойство эритроцитов противостоять разрушительным воздействиям: осмотическим, механическим, тепловым и др. В клинике наибольшее значение приобрело определение осмотической резистентности. Эритроциты в гипертонических солевых растворах сморщиваются, а в гипотонических — набухают. При значительном набухании наступает гемолиз. Готовят в пробирках растворы хлорида натрия различной концентрации (от 0,7 до 0,22%), затем вносят в них один и тот же объем крови (0,02 мл) и оставляют на 1 ч при комнатной температуре. Через 1 ч пробирки центрифугируют и определяют начало гемолиза по легкому порозовению раство-

ра и полный гемолиз — по интенсивной красно-лаковой окраске раствора. В норме минимальная резистентность у взрослых людей колеблется между 0,48–0,46% NaCl, максимальная — между 0,34–0,32% NaCl.

Осмотическая резистентность лейкоцитов. Определение осмотической стойкости лейкоцитов (по Сторти и Кучере). После контакта с гипотоническим раствором хлористого натрия лейкоциты окрашивают и затем подсчитывают неразрушенные формы. Для этого используют 0,2%-ный раствор NaCl, метилрозанилин (1%-ный водный раствор) — 1,5 мл или метилвиолет той же концентрации и объема, уксусную кислоту ледяную — 1,0 мл, дистиллированную воду — 20 мл. 0,1 мл крови из пальца смешивают в пробирке с 0,9 мл хлористого натрия. Перед подсчетом в камере Горяева 0,1 мл полученной взвеси смешивают с 0,1 мл метилрозанилина или метилвиолета. После повторного взбалтывания заполняют камеру. Подсчет неразрушенных клеток производится через 30, 60, 120 и 180 мин.

У здоровых людей ненарушенными спустя 30, 60, 120 и 180 мин остаются в среднем 94, 82, 43 и 26% полинуклеаров и соответственно 86, 68, 42 и 25% мононуклеаров. При сепсисе, пневмонии стрептококковой этиологии наблюдается понижение осмотической стойкости полинуклеаров с последующей нормализацией в период ремиссии. Повышение осмотической стойкости полинуклеаров отмечено при гриппозной пневмонии и в отдельных случаях при злокачественных новообразованиях.

ИССЛЕДОВАНИЕ КОАГУЛЯЦИИ

Плазменные факторы свертывания крови

Фактор I — фибриноген — белок, находящийся в плазме в растворенном состоянии. В процессе свертывания крови он становится нерастворимым, образуя фибрин.

Фактор II — протромбин — белок плазмы, неактивный предшественник тромбина. Тромбин (IIa) способствует превращению фибриногена в фибрин, активирует тромбоциты, из которых под его влиянием освобождаются клеточные факторы свертывания.

Фактор III — тканевой тромбопластин (тканевой фактор) — липопроteid, который освобождается при повреждении тканей. По-

Глава 1. Исследование крови

ступая в плазму крови, он воздействует на протромбин, превращая его в тромбин. Аналогичным действием обладает тромбокиназа плазмы.

Фактор IV — ионизированный кальций.

Фактор V — проакцелерин, Ас-глобулин, лабильный фактор, акцелератор превращения протромбина.

Фактор VI — акцелерин — белок глобулиновой природы, ускоряющий превращение протромбина в тромбин.

Фактор VII — проконвертин, стабильный фактор, неактивная форма фермента конвертина.

Фактор VIII — антигемофильный глобулин, участвующий в образовании тромбокиназы.

Фактор IX — фактор Кристмаса, антигемофильный глобулин-В, катализирует образование тромбокиназы.

Фактор X — фактор Стюарта—Прауэра, участвует в образовании тромбокиназы и непосредственно в превращении протромбина в тромбин.

Фактор XI — фактор Розенталя, ускоряет образование тромбокиназы.

Фактор XII — фактор Хагемана, контактный фактор.

Фактор XIII — фибринстабилизирующий фактор, фибриназа, участвует в переходе растворимого фибрина в нерастворимую форму.

Кроме плазменных, в свертывании участвует ряд клеточных факторов, выделяемых форменными элементами крови. Первостепенную роль играют тромбоцитарные факторы. Обозначаются они как P1, 2, 3, 4, PII. При агрегации тромбоцитов из них выделяются вещества, которые ускоряют процесс свертывания крови. Наибольшее значение для свертывания имеет тромбоцитарный фактор 3 (фосфолипид).

Большинство из вышеперечисленных ферментов синтезируется в печени. Для синтеза факторов II, VII, IX и X необходим витамин К.

Свертывание крови условно протекает в 3 фазы.

Фаза 1 — формирование активной протромбокиназы.

Имеются 2 механизма активации свертывания крови — внешний (при поступлении в кровь тканевого тромбопластина) и внутренний (без тканевого тромбопластина).

При внешнем механизме активации фактор III (из поврежденных тканей или разрушенных форменных элементов) вступает во взаимодействие с фактором VII и в присутствии ионов кальция быстро образует активатор фактора X. Активированный фактор X (Xa) в комплексе с фактором V, фактором 3 тромбоцитов и ионами кальция трансформирует протромбин.

Во внутреннем механизме участвуют факторы XII, XI, IX, VIII наряду с факторами X, V, тромбоцитарным фосфолипидом и ионами кальция, которые являются общими для обоих механизмов. Каскад свертывания состоит в следующем: контакт крови с чужеродной поверхностью (например, стекло пробирки при запуске механизма *in vitro*) активирует фактор XII, который активирует фактор XI, тот, в свою очередь, фактор IX. Активированный фактор IX (IXa) в присутствии фосфолипида, ионов кальция и фактора VIII активирует фактор X. Активированный фактор X (Xa) в сочетании с фосфолипидом, фактором V и кальцием (протромбокиназа) участвует в превращении протромбина.

Фаза 2 — тромбинообразование — состоит в превращении протромбина в тромбин под влиянием активного комплекса протромбокиназы. В основе превращения протромбина лежит расщепление его молекулы на фракции, одна из которых с молекулярной массой 37 тыс. переводится фактором Xa в тромбин. Реакция требует наличия ионов кальция и ускоряется в присутствии фактора V и фосфолипида.

Фаза 3 — фибринообразование — состоит в превращении фибриногена в фибрин при участии тромбина. Тромбин отщепляет от фибриногена по два пептида A и B, что ведет к полимеризации оставшихся фибрин-мономеров с образованием фибрин-полимера, растворимого в мочеvine. Стабилизация молекулы фибрина происходит под влиянием активированного тромбином фактора XIIIa и состоит в формировании поперечных глютамин-лизиновых связей между единицами фибрина, в результате чего образуется прочная (не растворимая в мочеvine, монохлоруксусной кислоте и других растворителях) фибриновая сетка.

Наиболее общее представление о коагуляции дает время свертывания цельной крови. Простым и удобным является **метод Моравица**: на часовое стекло наносят каплю крови, взятой из пальца или мочки уха, диаметром 4–6 мм. Тонким запаянным стеклянным

Глава 1. Исследование крови

капилляром проводят каждые 30 с по поверхности капли. Время свертывания определяют в момент появления первых фибриновых нитей, тянущихся за капилляром.

В методе **Ли—Уайта** используют венозную кровь. Пробирку с 1 мл венозной крови устанавливают на водяной бане при 37 °С и включают секундомер. Через каждые 30 с пробирку наклоняют под углом 45°. Время от момента взятия крови до появления сгустка является временем свертывания крови. У здоровых людей время свертывания цельной крови составляет 5–8 мин.

Общую оценку конечного этапа свертывания крови дает тромбиновое время, т. е. время свертывания цитратной плазмы крови под влиянием стандартной дозы тромбина.

Метод Сирман в модификации Рутберга. В пластиковую пробирку вносят 0,1 мл исследуемой крови, добавляют 0,1 мл подогретого до 37 °С изотонического раствора хлорида натрия и инкубируют смесь в течение 60 с при 37 °С. Затем вносят 0,1 мл стандартизованного раствора тромбина (раствор тромбина такой активности, который в смеси с равным объемом донорской плазмы вызывает свертывание последней за 15 с), включают секундомер и отмечают время свертывания плазмы крови. В норме тромбиновое время равно 14–16 с.

Метод определения фибриногена по Рутбергу. К 1 мл плазмы крови добавляют 0,1 мл 5%-ного раствора хлорида кальция и 0,1 мл раствора тромбина (активность — 15 с). Образовавшийся сгусток переносят на обеззоленный бумажный фильтр и просушивают другим фильтром до сухого состояния. Взвешивают сухой фибрин на торсионных весах. В норме масса сухого фибрина — 9–12 мг. Для расчета концентрации фибриногена в плазме крови массу сгустка умножают на экспериментально установленный коэффициент 22,2. В норме концентрация фибриногена в крови равна 0,2–0,4 г в 100 мл.

Для выявления заблокированных продуктов деградации фибриногена (ПДФ) и фибрин-мономеров, что характерно для диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдром), применяют так называемые паракоагуляционные пробы (этаноловую, протамин-сульфатную, β-нафтоловую) и тесты с протеазами из некоторых змеиных ядов.

Тест на толерантность плазмы к протамин-сульфату. В 1-й пробирке проводят определение времени свертывания цитратной

плазмы крови под влиянием тромбина (тромбиновое время), во 2-й — то же определение, но после добавления равного объема (0,1 мл) 0,01%-ного раствора протамин-сульфата. Разница во времени свертывания плазмы крови в 1-й и 2-й пробирках в норме составляет 7–10 с. Увеличение этой разницы (более 7–10 с) свидетельствует об увеличении в крови гепарина (протамин-сульфат обладает способностью связывать свободный гепарин) и других антитромбинов.

Если конечный этап свертывания не нарушен (тромбиновое время нормально), то отдельно оценивают внешний и внутренний механизмы активации свертывания (формирование протромбиназы, трансформирующей протромбин в тромбин). Внешний механизм суммарно оценивают с помощью теста протромбинового времени по Квику (времени свертывания рекальцинированной цитратной плазмы при добавлении к ней тканевого тромбопластина стандартизированной активности).

Метод Квика. В пробирку вносят 0,1 мл испытуемой плазмы крови, 0,1 мл суспензии тромбопластина (активность тромбопластина тестируется на нормальной донорской плазме), ставят в водяную баню при 37 °С на 60 с. Затем приливают 0,1 мл 0,025 г хлорида кальция и включают секундомер. Отмечают время свертывания крови. Опыт повторяют 2–3 раза и определяют средний показатель.

Протромбиновое время при стандартизованном тромбопластине в норме составляет 12–15 с. Поскольку могут быть отклонения в активности отдельных серий тромбопластина, то прибегают к вычислению протромбинового индекса по формуле:

$$A/B \times 100,$$

где *A* — протромбиновое время плазмы крови донора;

B — протромбиновое время исследуемого лица.

В норме этот показатель равен 80–100%.

При нормальном тромбиновом времени нарушения внешнего механизма могут быть обусловлены дефицитом факторов VII, X, V или II, поскольку все они определяются протромбиновым временем. При нормальном тромбиновом и протромбиновом времени нарушения внутреннего механизма свертывания зависят только от факторов XII, XI, IX и VII. Для оценки внутреннего пути активации свертывания крови используют общие коагуляционные тесты: время свертывания цельной крови, парциальное (частичное) тром-

Глава 1. Исследование крови

бопластическое время (или каолин-кефалиновое время), аутокоагуляционный тест.

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). Время рекальцификации бедной тромбоцитами плазмы крови в стандартных условиях, создаваемых внесением каолина — активатора XII фактора и кефалина — аналога 3-тромбоцитарного фактора, для исключения влияния тромбоцитов на результат исследования (метод **Proctor** с соавторами). В пластиковую пробирку вносят 0,1 мл бедной тромбоцитами цитратной плазмы, 0,1 мл каолин-кефалиновой суспензии, смешивают и инкубируют при 37 °С в течение 3 мин. Добавляют 0,025 г хлорида кальция равного объема (0,1 мл), подогретого до 37 °С, и включают секундомер. Отмечают время образования сгустка. В норме активированное частичное тромбопластиновое время составляет 30–40 с.

Аутокоагуляционный тест (АКТ) (по Беркарду с соавторами). Стандартизация фосфолипидной и контактной активации начальной фазы процесса свертывания осуществляется добавлением к рекальцинированной плазме крови гемолизата эритроцитов исследуемого больного (аутотест).

По данным, полученным через 2–6–8–10–20–30–40–50–60 мин после добавления гемолизат-кальциевой смеси, строят график, восходящая часть которого отражает динамику нарастания активности тромбопластина и тромбина, нисходящая часть — скорость инактивации тромбина за счет антитромбинов и продуктов фибринолиза.

Коагулограмма: основные показания

Коагулограмма, или гемостазиограмма, представляет собой лабораторный анализ на свертываемость крови. Виды:

— простая (базовая, скрининговая, стандартная). Способствует выявлению/исключения нарушений в функционировании системы коагуляции. Включает в себя протромбин по Квику или ПТИ (протромбиновый индекс), МНО (международное нормализованное отношение), фибриноген, АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время), ТВ (тромбиновое время);

— развернутая (расширенная). Позволяет отследить не только наличие качественных изменений, но и количественные показатели параметров коагуляции. Помимо показаний базового исследования, включает антитромбин III, D-димер, ряд стандартных коагулограмм.

Таблица 5

Основные показатели коагулограммы в состоянии нормы

Параметр	Норма (взрослые)	Норма (дети)
Время кровотечения, мин	3–10	
Время свертывания крови, по Ли-Уайту, мин	5–10	4–9
Протромбиновое время по Квинку, с	11–15	новорожденные недоношенные 14–19 доношенные 13–17 старше 1 года 13–16
Протромбиновый индекс (ПТИ), %	73–122	70–100
Время рекальцификации плазмы ВРП, с	60–120	90–120
Тромбиновое время, с	14–21	
Активированное время рекальцификации (АВР), с	81–127	
Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ, ППТВ, АРТТ), с	23–35	
Международное нормализованное отношение (МНО, INR)	0,8–1,2	0,8–1,2
Фибриноген, г	2–5	2–5
Растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК), мг/ 100 мл	3,36–4,0	0,1–0,4
Фибриноген	2,75–3,65 г/л	5,9–11,7 мкмоль/л для новорожденных 1,25–3,1 г/л
D-димеры, нг/мл	250–500	
Антитромбин III, %	70–125	новорожденные 40–80 до года 45–80 до 10 лет 65–130 до 16 лет 80–120
активность фактора II и V, %	60–150	
активность фактора VII, %	65–135	
активность фактора VIII, IX и IX, %	50–200	

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИБРИНОЛИЗА

Противосвертывающие механизмы представлены двумя группами антикоагулянтов: **физиологическими**, которые образуются независимо от свертывания крови и фибринолиза, и антикоагулянтами, **образующимися в процессе свертывания крови и фибринолиза**. К первым относятся антитромбокиназы (антитромбопластины), антитромбины, гепарин и др. Все они оказывают ингибирующее влияние на различные фазы процесса свертывания крови. Антитромбокиназы тормозят начальную фазу свертывания крови и угнетают активность образовавшейся тромбокиназы. Антитромбины замедляют переход протромбина в тромбин и препятствуют воздействию тромбина на фибриноген. Гепарин нарушает образование тромбокиназ, инактивирует тромбин, связывает фибриноген, т. е. тормозит все фазы процесса свертывания. Ко второй группе антикоагулянтов относятся вещества, которые образуются в результате свертывания крови и фибринолиза и обладают антикоагулянтным действием. Ингибиторные механизмы существуют на каждой фазе свертывания крови. Известную роль в предотвращении вступления тромбоцитов и контактных факторов свертывания в процесс коагуляции играет нормальный эндотелий сосудов.

Для приготовления дефибринированной крови наиболее часто используют трикалевую (дикалевую) соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), тринатрий-цитрат и гепарин. Первые два вещества ингибируют коагуляцию путем удаления кальция из крови.

Из известных **антикоагулянтов 1-й фазы свертывания** наибольшее физиологическое значение имеют ингибитор активированного фактора XI (XIa), относящийся к α -2-глобулинам, и антитромбопластины (ингибиторы комплекса фактор III — фактор VIIa). К **ингибиторам 2-й фазы коагуляции** относится антитромбин II — α -2-глобулин крови; ингибирует не только тромбин, но и другие активированные факторы свертывания — Ха, IXa, XIa, XIIa, калликреин. На антитромбин III приходится большая часть спонтанной антикоагулянтной активности, что определяет его ведущую роль в поддержании жидкого состояния крови и предупреждении тромбозов. Доля других естественных антитромбинов — α -2-макроглобулина и α -1-антитрипсина — составляет лишь около 25% антикоагулянтной активности дефибринированной плазмы крови.

Фибринолиз осуществляется протеолитической ферментной системой крови — плазмогенами. Превращение плазминогена в активную форму происходит с помощью активаторов, которые находятся в плазме крови, моче, различных тканях, образуясь в эндотелии сосудов. Обнаруживаемый в моче активатор (урокиназа) продуцируется почкой. Способностью активировать плазминоген обладают и некоторые продукты бактериального происхождения, в частности стрептокиназа.

Под влиянием активаторов происходит ферментативное расщепление молекулы плазминогена, и образуется плазмин, обладающий выраженным протеолитическим свойством в отношении фибрин-фибриногена (кроме того, факторов VII, V, комплемента, некоторых гормонов). Лизис фибриногена происходит в несколько этапов. Вначале после отделения мелких фрагментов А, В, С формируется высокомолекулярная X-фракция. Затем она расщепляется на D- и Y-фракции. В дальнейшем Y-фракция расщепляется на вторую D- и дополнительную E-фракцию. D- и E-фракции — это конечные продукты деградации фибриногена. Деградация плазмином растворимого фибрина сходна с таковой фибриногена, за исключением того, что на первом этапе отсутствуют мелкие фрагменты. Деградация стабилизированного фибрина отличается образованием вместо D-фракции двойного по размеру фрагмента-D-димера.

Ферментативный фибринолиз поддерживают комплексные соединения гепарина с фибриногеном, адреналином, мочевиной, плазмогеном, обладающие способностью лизировать нестабилизированные сгустки фибрина (неферментативный фибринолиз). Фибрин может лизироваться протеазами, выделяемыми лейкоцитами, которые участвуют в фибринолизе также благодаря освобождению лейкоцитарных активаторов плазминогена и фагоцитозу продуктов расщепления фибрина.

Терапевтическую стимуляцию фибринолиза проводят с помощью ферментов бактериального происхождения (стрептокиназы и др.) или урокиназы.

Представление о фибринолитической активности крови дает ее определение эуглобулиновым методом. **Метод Ковальского** — осаждение в кислой среде и при низкой температуре эуглобулиновой фракции, содержащей факторы свертывания крови и фибринолиза, главным образом плазминоген. 0,1 мл оксалатной плазмы (1 : 9)

Глава 1. Исследование крови

помещают в центрифужную пробирку, добавляют 1,8 мл кислой воды (рН 5,2), пробирку ставят в холодильник при 4 °С (при этом из плазмы выпадает эуглобулиновая фракция). Через 30 мин пробирку вынимают и центрифугируют в течение 10 мин при 2000 об./мин. Надосадочную жидкость отсасывают, к осадку приливают 0,1 мл бората натрия и ставят в термостат при 37 °С на несколько минут до полного растворения осадка. Добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция (содержащийся в эуглобиновой фракции фибриноген превращается в фибрин). Засекают время образования сгустка и ставят пробирку в термостат до полного лизиса сгустка. Время от момента образования сгустка до его растворения выражает фибринолитическую активность крови, которая в норме равна 3–4 ч.

Применяют методы исследования фибринолиза, основанные на дополнительной стандартизированной активации его стрептокиназой, а также методы выявления в плазме крови продуктов фибринолиза — ПДФ (иммунологические и химические) и их соединений с фибрин-мономерами и фибриногеном (паракоагуляционные пробы), методы исследования неферментативного фибринолиза по Б. А. Кудряшову.

АНАЛИЗАТОРЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

В лабораторной практике широко применяются коагулологические анализаторы, действующие в автоматическом и полуавтоматическом режиме.

Коагулометры лабораторные, автоматические и полуавтоматические. Применяются для качественного и количественного определения одного или нескольких факторов коагуляции, задействованных в гемостазе. В частности, может быть определено тромбиновое, частичное тромбопластиновое время. Принцип работы может быть основан на нескольких методах: спектрофотометрии, турбидиметрии, нефелометрии, электрометрии, механическом средстве контроля образования сгустка.

Приборы данного типа отличаются высокой производительностью и точностью полученных результатов. Для их работы требуется минимальное количество биологического материала. При работе с полуавтоматическими и автоматическими приборами исключается человеческий фактор (вероятность ошибки).

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

Иммунологические реакции используются для выявления специфических антител, идентификации возбудителей и других антигенов, определения групп крови и подбора адекватного донора при пересадках органов и тканей. Серологические реакции — реакции между антигенами и антителами *in vitro* — применяют для выявления неизвестного антигена или антитела с помощью известного антитела или антигена соответственно. Корпускулярные антигены дают феномен агглютинации, растворимые — преципитации. В лабораторной практике используют реакции агглютинации, преципитации, связывания комплемента и др.

Антигены, по которым отдельные индивидуумы или группы особей одного вида различаются между собой, являются изоантигенами. Изоантигены, генетически связанные, объединены в группы, получившие следующие названия: система АВО, резус и др. В плазме человека всегда содержатся естественные, полные, холодовые изоантитела к агглютиногенам А и В. Агглютинин анти-А — α -агглютинин, а агглютинин анти-В — β -агглютинин (табл. 6).

Таблица 6

Групповая принадлежность людей по системе АВО

Группа крови	Агглютиноген	Агглютинины	Обозначение
I	0	α - и β -	0(I)
II	A	β -	A(II)
III	B	α -	B(III)
IV	AB	0	AB(IV)

Определение группы крови (определение агглютиногенов). Реакцией агглютинации с помощью стандартных сывороток определяют групповые агглютиногены в эритроцитах. Ампулы или флаконы со стандартными сыворотками двух различных серий каждой группы ставят в 2 штатива, имеющих по 3 гнезда, или в 1 штатив с двумя рядами гнезд. Слева направо ставят сыворотки групп 0 α - β (I), A β (II), B α (III). Отдельно ставят сыворотку АВ0(IV). Определение производят на белых пластинах или тарелках. На левой стороне делают надписи 0 α - β , в середине — A β , справа — B α . Под соответствующей надписью наносят по 0,1 мл каждой стандартной сыворотки отдельной для каждой сыворотки пипеткой. Кровь для

Глава 1. Исследование крови

исследования берут из пальца, 0,01 мл крови сухой стеклянной палочкой наносят рядом с каждой каплей стандартной сыворотки. Перемешивают капли стандартной сыворотки с исследуемой кровью. После этого пластину покачивают, затем на 1–2 мин оставляют в покое и снова периодически покачивают. Наблюдение за ходом реакции проводят не менее 5 мин, несмотря на то что агглютинация начинается в течение первых 10–30 с, так как возможна поздняя агглютинация, например эритроцитами группы A₂(II). По мере наступления агглютинации, но не ранее чем через 3 мин, в те капли, в которых наступила агглютинация, добавляют изотонический раствор хлорида натрия и продолжают наблюдение при покачивании пластинки в течение 5 мин, после чего оценивают результат. При положительной реакции в смеси появляются видимые невооруженным глазом мелкие красные зернышки (агглютинанты), состоящие из склеенных эритроцитов. При этом сыворотка полностью или частично обесцвечивается. В случае отрицательной реакции на протяжении всего времени наблюдения (5 мин) жидкость остается равномерно окрашенной в красный цвет и в ней не обнаруживаются агглютинанты. Результаты реакции в каплях с сыворотками одной группы обеих серий должны быть одинаковыми. Возможны различные комбинации реакций:

1) сыворотки всех трех групп дали отрицательную реакцию — испытуемая кровь принадлежит к группе 0(I);

2) сыворотки групп 0 α-β(I) и B α(III) дали положительную реакцию, а сыворотка группы A β(II) — отрицательную: испытуемая кровь принадлежит к группе A(II);

3) сыворотки группы 0 α-β(I) и A β(II) дали положительную реакцию, а сыворотка группы B α(III) — отрицательную: испытуемая кровь принадлежит к группе B(III);

4) сыворотки всех групп дали положительную реакцию. В этом случае для исключения неспецифической агглютинации проводят дополнительное контрольное исследование со стандартной сывороткой AB0(IV).

Отсутствие агглютинации в капле этой сыворотки при наличии ее во всех остальных позволяет отнести кровь к группе AB0(IV). Наличие агглютинации с сывороткой группы AB0(IV) говорит о неспецифической агглютинации. В этих случаях нужно исследование повторить с отмытыми эритроцитами.

Определение полной групповой формулы крови (агглютиногенов и агглютининов). Одновременное определение групповых антигенов эритроцитов и агглютиногенов сыворотки позволяет установить полную групповую формулу исследуемой крови. Для этого берут 2 различные серии стандартных сывороток групп крови 0 α - β (I), A β (II), B α (III), AB0(IV); 0,85%-ный раствор хлорида натрия; стандартные эритроциты групп 0(I), A(II), B(III). В центрифужную пробирку, содержащую 0,25–0,5 мл 3,8%-ного раствора цитрата натрия, добавляют 2–4 мл крови специально отобранных доноров, затем пробирку на 3/4 заполняют изотоническим раствором хлорида натрия. Перемешивают, центрифугируют и оставляют стоять до оседания эритроцитов. Отмытые стандартные эритроциты хранят в холодильнике. Срок годности — 2–3 дня. Ампулы со стандартными сыворотками двух различных серий каждой группы ставят в 2 штатива. Отдельно ставят сыворотку группы AB0(IV). Пробирки со стандартными эритроцитами устанавливают в отдельный штатив с тремя гнездами в следующем порядке: группа 0(I), A(II) и B(III). На пластинке делают надписи слева направо: 0 α - β , A β и B α для стандартных сывороток и 0, A и B — для стандартных эритроцитов. Под соответствующими обозначениями наносят по 1 большой капле всех стандартных сывороток и по 1 маленькой капле стандартных эритроцитов. Исследуемую кровь для отделения сыворотки центрифугируют или оставляют стоять 20–30 мин. Исследуемую сыворотку по одной большой капле капают на подготовленные стандартные эритроциты. После этого той же пипеткой набирают со дна эритроциты исследуемой крови и наносят их по 1 маленькой капле рядом с каждой каплей стандартной сыворотки. Сыворотку тщательно перемешивают с эритроцитами сухими стеклянными палочками. Через 1 мин в те капли, в которых наступила агглютинация, добавляют изотонический раствор хлорида натрия и продолжают наблюдение при покачивании пластинки до истечения 5 мин.

Возможные варианты реакций:

1) реакция со стандартными сыворотками указывает на отсутствие агглютиногенов, т. е. на принадлежность исследуемой крови к группе 0(I). При этом сыворотка исследуемой крови дает отрицательную реакцию со стандартными эритроцитами группы 0(I) и положительную — с эритроцитами групп A(II) и B(III);

Глава 1. Исследование крови

2) реакция со стандартными сыворотками указывает на наличие в исследуемой крови агглютиногена А. При этом сыворотка исследуемой крови дает отрицательную реакцию со стандартными эритроцитами групп 0(I) и А(II), но положительную — с эритроцитами группы В(III);

3) реакция со стандартными сыворотками указывает на наличие в исследуемой крови агглютиногена В. При этом сыворотка исследуемой крови дает отрицательную реакцию со стандартными эритроцитами групп 0(I) и В(III), но положительную — с эритроцитами группы А(II);

4) реакция со стандартными сыворотками указывает на наличие в исследуемой крови агглютиногенов А и В. При этом сыворотка исследуемой крови дает отрицательную реакцию со стандартными эритроцитами всех трех групп, т. е. не содержит агглютининов.

Определение резус-фактора методом конглотинации с применением желатина. Исследуемые эритроциты инкубируют со стандартной сывороткой-антирезус, содержащей неполные антителарезус, в коллоидной среде — растворе желатина. Если исследуемые эритроциты резус-положительны, происходит их склеивание — конглотинация, которая обнаруживается после добавления в инкубационную смесь изотонического раствора хлорида натрия. Резус-отрицательные эритроциты не склеиваются.

Для реакции используют стандартные сыворотки-антирезус с неполными антителами двух различных серий (группа стандартной сыворотки должна быть совместима с группой исследуемой крови), 10%-ный раствор желатина в ампулах заводского изготовления, 0,85%-ный раствор хлорида натрия, 3,8%-ный раствор цитрата натрия, стандартные эритроциты для контроля.

В одну пробирку вносят 0,05 мл исследуемых эритроцитов. В другую пробирку помещают 0,05 мл стандартных резус-положительных эритроцитов группы 0(I) или группы, одноименной с исследуемой кровью. В третью пробирку — по 0,05 мл стандартных резус-отрицательных эритроцитов той же группы, что и исследуемая кровь. Затем во все пробирки добавляют по 0,1 мл 10%-ного раствора желатина, предварительно подогретого до 48 °С. Слегка встряхивают для перемешивания. После этого в первую пробирку вводят 0,1 мл сыворотки-антирезус одной серии, во вторую — по 0,1 мл сыворотки-антирезус второй серии. Содержимое пробирок перемешивают встряхиванием и все пробирки помещают в водя-

ную баню при 48 °С на 5 мин или термостат при той же температуре на 30 мин. После прогревания приливают по 8–10 мл подогретого изотонического раствора хлорида натрия, содержимое пробирок перемешивают и затем просматривают на свет невооруженным глазом или через лупу.

Когда кровь резус-положительна, в пробирке наблюдаются легко различимые красные зерна или хлопья, состоящие из склеенных эритроцитов, на прозрачном, почти обесцвеченном фоне. Если эритроциты резус-отрицательны, в пробирке видна равномерно окрашенная в розовый цвет, слегка опалесцирующая жидкость.

Результаты следует считать истинными при совпадении их в обеих сериях стандартной сыворотки-антирезус. В контрольных образцах стандартные резус-положительные эритроциты одноименной группы или группы 0(I) с сывороткой-антирезус должны дать положительный результат, а стандартные резус-отрицательные эритроциты одноименной группы — отрицательный. Кроме того, отрицательный результат должен быть также во всех пробирках третьего ряда, т. е. без сыворотки-антирезус.

Определение неполных антител. Как к изоантителам, так и к аутоантителам могут относиться тепловые антитела (оптимум действия при 37 °С), главным образом класса IgG. Они называются неполными, унивалентными и, покрывая поверхность эритроцитов, не вызывают их агглютинации в солевом растворе, однако могут склеивать эритроциты в среде с высокой концентрацией белка (альбумина или сыворотки). Тепловые антитела класса IgG редко обладают способностью фиксировать комплемент, вызывая лизис эритроцитов, т. е. выступать в качестве гемолизинов. Обычно эритроциты, покрытые антителами IgG, секвестрируются селезенкой, где они теряют часть оболочки, что приводит к фрагментации и сфероцитозу, или агглютинируют (в среде с высокой концентрацией белка) и захватываются макрофагами. Фиксированные на эритроцитах неполные антитела выявляются **прямой пробой Кумбса (антиглобулиновой пробой)**.

Суть метода состоит в агглютинации эритроцитов, покрытых антителами класса IgG, антисывороткой кролика против γ -глобулина человека. **Непрямая проба Кумбса** определяет неполные антитела, содержащиеся в сыворотке крови и могущие быть как аутоантителами, так и изоантителами. В этой пробе эритроциты донора инкубируют с исследуемой сывороткой крови, затем отмы-

Глава 1. Исследование крови

вают и соединяют с антиглобулиновой сывороткой, т. е. проводят пробу Кумбса, с помощью которой устанавливают, имеются ли на поверхности донорских эритроцитов неполные антитела. При положительном варианте происходит агглютинация эритроцитов.

Определение ристомидин-агрегации (агглютинации) в богатой тромбоцитами исследуемой плазме отражает взаимодействие фактора Виллебранда (ФВ) с собственными тромбоцитами пациента. При исследовании *in vitro* ристомидин способствует связыванию ФВ с тромбоцитарным рецептором GPIb. Процесс агрегации, индуцируемый добавлением к богатой тромбоцитами исследуемой плазме стандартного количества ристомидина, регистрируется фотометрически по падению ее оптической плотности. Измерения проводятся в агрегометре или на модифицированном фотоэлектроколориметре, снабженном перемешивающим и записывающим устройствами. Ристомидин-агрегация тромбоцитов может снижаться как при качественных, так и при количественных дефектах ФВ.

Определение активности фактора Виллебранда (ристомидин-кофакторной активности — РКА) исследуемой плазмы основано на его способности вызывать в присутствии ристомидина агглютинацию нормальных донорских тромбоцитов. В классическом методе, предложенном **H. I. Weiss**, предлагается использование суспензии свежеприготовленных отмытых донорских тромбоцитов для измерений, проводимых в агрегометре. При этом взвесь отмытых и ресуспендированных донорских тромбоцитов должна иметь концентрацию около $250 \times 10^9/\text{л}$. В кювету агрегометра добавляют взвесь доведенной исследуемой бедной тромбоцитами плазмы и стандартное количество ристомидина. Последующий агрегационный процесс регистрируется в течение нескольких минут с помощью записи увеличения трансмиссии. Угол наклона полученной кривой пропорционален РКА исследуемого образца плазмы. РКА исследуемой плазмы определяется в процентах по калибровочной кривой зависимости максимального изменения трансмиссии за минуту от уровня РКА. Для ее построения используется серия разведений стандартной коммерческой или пулированной плазмы, в которых РКА соответствует 100, 50, 25%-ному уровню.

В модификациях данного метода предусмотрено использование не свежих, а фиксированных формалином донорских тромбоцитов. Такая обработка тромбоцитов способствует длительному хранению

Иммуногематологические анализаторы

их без потери рецепторов к ФВ. Для этого из донорской крови, взятой на ЭДТА-формалиновом растворе (соль этилендиаминтетрауксусной кислоты) в соотношении 9 : 1, готовится бедная тромбоцитарная плазма. Полученный после ее удаления тромбоцитарный осадок дважды отмывается ЭДТА-буферным раствором и разводится в буфере до концентрации тромбоцитов $200\text{--}250 \times 10^9/\text{л}$. Полученный тромбоцитарный реагент может храниться.

В настоящее время коммерчески доступны тест-наборы, основанные на регистрации агглютинации лиофилизированных фиксированных тромбоцитов как методами агрегатометрии, так и слайд-тестами. Определение РКА в слайд-тестах требует меньших затрат времени и характеризуется более высокой точностью.

ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ АНАЛИЗАТОРЫ

В настоящее время широко применяются автоматические и полуавтоматические иммуногематологические анализаторы, благодаря чему определение группы крови становится менее трудозатратным и более точным процессом.

Анализаторы групп крови/скрининг антител, автоматические и полуавтоматические. Применяются при предварительном определении группы крови накануне переливания, идентификации эритроцитарных антител, эритроцитарного фенотипирования донорских образцов для определения совместимости (перед переливанием, трансплантацией). В спектр анализов могут входить определение группы крови по системе АВ0, резус-фактора и пр. Возможно задействование серологических методов с применением микропланшетов, кассет, технологий колоночной агглютинации.

Анализаторы иммуногематологические, автоматические и полуавтоматические. Применяются для определения группы крови, скрининга и идентификации антител, фенотипирования эритроцитов, прямых антиглобулиновых анализов, перекрестной совместимости клинических образцов. Работа основана на одном или нескольких иммунологических методах, в том числе на микропланшетной агглютинации, агглютинации в колонках, нефелометрии, ферментативной, фотометрической, радиометрической системе детектирования. В состав анализатора могут входить обработка проб, программы для обработки данных.

ГЛАВА 2

Биохимические методы исследования в клинической лабораторной диагностике

ТЕХНИЧЕСКОЕ ОСНАЩЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ В КЛИНИКО- ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ

В настоящее время компьютеризация и автоматизация изменили характер работы клинико-диагностических лабораторий лечебно-профилактических учреждений.

Выполнение практически всех биохимических и других видов лабораторных исследований становится возможным на автоанализаторах. Подключение их к компьютерам значительно облегчает формирование серии исследований для одного пациента, хранение в памяти результатов, подготовку ответа клиницисту и др.

Арсенал современных анализаторов и технических средств для проведения биохимических исследований разнообразен: стекло и посуда, вакуумные системы забора крови — Вакуэт, разнообразные дозирующие устройства, обычные и программируемые фотометры, высокопроизводительные биохимические анализаторы.

Появление новых методов анализа, новых совершенных технологий (одной из основных развивающихся технологий сегодня в клинической биохимии становится «сухая химия») способствует ежегодному обновлению на рынке лабораторного оборудования, постоянному изменению условий работы на нем известных фирм, появлению новых компаний, слиянию их между собой, быстрому решению сложных научно-технических проблем, не имеющих равных себе по сложности в других областях приборостроения.

Автоматизация выполнения лабораторных исследований изменила выпуск наборов реагентов для клинической лабораторной

Характеристика абсорбиометрических приборов

диагностики. В России начат серийный выпуск наборов реагентов. Все выпускаемые в настоящее время наборы реагентов, стандартные, контрольные, калибровочные образцы стандартизованы и зарегистрированы в Минздраве РФ.

Данные наборы перед регистрацией проходят серьезные испытания в ведущих лабораториях и медицинских центрах страны. Такая стандартизация позволяет получать в разных лабораториях сопоставимые результаты исследований.

Наборы контролируются системой Государственного контроля качества, в случаях несоответствия которой они могут быть сняты с производства. Лаборатории при наличии дефектов в работе наборов могут предъявлять рекламации фирме-изготовителю и требовать замены их на качественную продукцию.

ХАРАКТЕРИСТИКА АБСОРБЦИОМЕТРИЧЕСКИХ ПРИБОРОВ

В клиничко-диагностических лабораториях при исследовании показателей обмена используются фотометрические приборы.

Приборы проводят фотометрическое детектирование результатов: энергия светового потока измеряется с помощью фотодетектора, преобразующего световую энергию в электрический сигнал.

Фотометрические методы анализа делятся на следующие:

- 1) абсорбционный (поглощение раствором световой энергии);
- 2) нефелометрический (рассеяние световой энергии дисперсной средой);
- 3) флуориметрический (излучение раствором световой энергии, вызванной световой энергией возбуждения);
- 4) рефлектометрия (измерение интенсивности энергии, отраженной от твердофазной среды);
- 5) турбидиметрический (сочетание поглощения и рассеяния световой энергии дисперсной средой);
- 6) хемиллюминесцентный (излучение раствором световой энергии в результате химической реакции).

В настоящее время в практических лабораториях можно встретить самые различные по конструкции и характеристикам колориметры, фотометры и спектрофотометры.

Глава 2. Биохимические методы исследования

Их различия связаны с формой выдачи информации (единицы светопропускания, оптической плотности, концентрации или другие значения, по которым проведена калибровка прибора); со способом построения и хранения калибровочных значений (автоматическое, ручное, длительное или краткосрочное); со способом подачи в прибор исследуемого раствора (проточная кювета, коммутированная кювета, кювета специальной конструкции и др.); с конструкцией оптической системы (одноканальные или многоканальные); с видом источника излучения световой энергии (разнообразные лампы накаливания с телом накала из вольфрама, импульсные, газоразрядные лампы, светодиоды, лазеры).

Каждый из используемых в лабораториях фотометров имеет следующие характеристики:

1) спектральный диапазон — длины волн, в которых работает прибор. В большинстве случаев фотометры работают в спектральном диапазоне 340–700 нм;

2) динамический диапазон измерения. Обычно диапазону оптических плотностей от 0 до 2 соответствует диапазон по светопропусканию от 100 до 1%;

3) максимальный и минимальный объем фотометрируемого раствора. Эти объемы определяются объемами измерительных кювет, при этом минимальный допустимый объем раствора — объем, при котором возможно получение гарантированных результатов измерений. На современных фотометрах можно работать в диапазоне 10–500 мкл;

4) метрологические характеристики фотометрических приборов;

5) градуировка прибора — процесс построения калибровочной кривой, по которому в дальнейшем проводится градуировка прибора. Приборы высокого класса имеют энергонезависимое запоминающее устройство, позволяющее сохранять градуировочные характеристики в течение длительного времени;

6) способы отображения и регистрации информации. В приборах используются стрелочные, цифровые и алфавитно-цифровые индикаторы, принтеры самых разных конструкций.

В клиничко-диагностических лабораториях в настоящее время используются самые разные виды фотометров. Это обычные фотометры типа КФК-2, КФК-3, ФЭК, программируемые фотометры типа МИНИЛАБ 501 (программируемый фотометр для биохимиче-

ских исследований по конечной точке в моно- и бихроматическом режиме). В памяти фотометра хранится до 50 программ, он имеет встроенный термостат, объем кюветы 1 мл; МИНИЛАБ 502 — кинетический программируемый фотометр для исследования активности ферментов и определения концентрации метаболитов кинетическими методами с встроенным термостатом.

Все более широкое распространение получают биохимические анализаторы типа Стат Факс 1904. Анализатор предназначен для выполнения биохимических исследований кинетическим методом и по конечной точке. Производительность: кинетическим методом — до 40 исследований в час, по конечной точке — до 200 исследований в час.

СРЕДСТВА ПОДГОТОВКИ ПРОБ

На качество проводимых в лаборатории исследований существенное влияние оказывает аккуратное и точное выполнение операций дозирования. Основными режимами дозирования являются: прямое дозирование, обратное дозирование, многократное дозирование, разведение. Лабораторные дозирующие устройства подразделяются на пипеточные, клапанные, перистальтические дозаторы. Пипеточные механические дозаторы появились в лабораториях в 1960-е гг. и значительно повысили точность, воспроизводимость дозирования, снизили риск развития профессиональных заболеваний.

Забор дозирующей жидкости проводится в съемный наконечник. Для точности дозирования имеют значение материал, из которого изготовлен наконечник, и его форма. Фирмы-изготовители пипеточных дозаторов не гарантируют высокой точности при применении наконечников, не включенных в соответствующий перечень. Многие пипеточные дозаторы имеют устройства для сброса наконечников.

Пипеточные дозаторы нашли самое широкое применение в работе клинично-диагностических лабораторий.

По способу установки дозы дозаторы делятся на дозаторы с фиксированным объемом дозы, дозаторы с регулируемым переменными объемами дозы; по количеству каналов дозирования — на одноканальные и многоканальные.

Глава 2. Биохимические методы исследования

Особые виды дозаторов — специальные устройства, встроенные в автоматические анализаторы и робототехнические разливные системы или дозирующие автоматы.

В настоящее время все большую популярность обретают электронные, или автоматические, дозаторы. Электронные дозаторы снабжены электронными дисплеями. Отличаются они конструкцией, оформлением, размерами дисплеев, разрешенными объемами пробы и пр. Существуют одно- и многоканальные дозаторы. Электронные дозаторы обладают более высокой точностью, чем механические. Это обеспечивается микропроцессорным управлением, жидкокристаллическим дисплеем, аккумуляторной батареей.

Центрифугирование

Центрифугирование проводит разделение смесей, состоящих из двух или нескольких компонентов с разной удельной плотностью. Разделение частиц с помощью центрифугирования основано на разной скорости осаждения частиц в центробежном поле.

В лабораторной практике чаще всего применяют препаративное центрифугирование, основанное на различиях в скорости седиментации частиц, отличающихся друг от друга плотностью и размерами. Разделяемый материал (в лабораториях это чаще всего кровь) по мере увеличения скорости центробежного ускорения распределяется по плотности и размерам частиц вдоль пробирки. На дно пробирки осаждаются форменные элементы крови, в надосадке — плазма или сыворотка крови. Препаративные центрифуги подразделяются на 3 группы:

- 1) центрифуги общего назначения;
- 2) скоростные центрифуги;
- 3) препаративные центрифуги.

Для разделения крови в лабораториях используют центрифуги общего назначения. Они обеспечивают центрифугирование со скоростью до 8000 об./мин, относительное центробежное ускорение до 6000 g. Отличаются друг от друга емкостью, рядом сменных роторов. Во всех центрифугах данного типа роторы жестко крепятся на валу привода, центрифужные пробирки должны быть вместе с находящимся в них биоматериалом тщательно уравновешены

и различаться по весу не более чем на 0,25 г. При неполной загрузке ротора пробирки должны быть размещены симметрично, одна против другой. Таким образом обеспечивается равномерное распределение пробирок относительно оси вращения ротора.

Например, мини-центрифуга СМ-6 со скоростью вращения ротора 1000, 1500, 2750 об./мин рассчитана на 12 пробирок в роторе, применяется для разделения растворов на фракции. Данная центрифуга используется в клинической биохимии, биологии, аналитической химии и т. д.

Мини-центрифуга СМ-70 имеет счетчик определения гематокритного числа. Ее конический ротор рассчитан на 8 капилляров, помещаемых в съемные адаптеры. Система управления обеспечивает поддержание оборотов и автоматическое отключение через заданный интервал времени.

Скоростные центрифуги обладают скоростью до 25 тыс. об./мин. Камера ротора снабжена охлаждающим устройством для предотвращения нагревания, возникающего при его вращении.

Препаративные центрифуги производят центрифугирование со скоростью до 75 тыс. об./мин.

Рефрижераторные центрифуги, центрифуги с нагревательной рубашкой являются центрифугами специального назначения.

Для изучения чистых препаратов макромолекул применяется аналитическое центрифугирование, которое обеспечивает данные о чистоте, молекулярной массе и структуре материала. Аналитические центрифуги развивают скорость до 100 тыс. об./мин.

Термостатирующие и перемешивающие устройства

Термостатирующие и перемешивающие устройства могут иметь разное конструктивное исполнение, могут в качестве блоков входить в общую структуру автоматических анализаторов.

По принципу передачи тепловой энергии термостаты разделяются на жидкостные, суховоздушные и сухие.

В жидкостных термостатах передача тепла к объекту происходит от источника тепла к объекту термостатирования через жидкую среду. В суховоздушных термостатах тепловая энергия передается при участии циркулирующего потока воздуха. В сухих термостатах передача тепловой энергии происходит через метал-

Глава 2. Биохимические методы исследования

личный блок. Выбор способа термостатирования определяется индивидуально в зависимости от емкости и формы термостатируемого объекта.

Перемешивающие устройства предназначены для перемешивания реакционной смеси с целью ускорения проведения реакции и повышения воспроизводимости результатов. Тип перемешивания и его характеристики зависят от назначения перемешивающего устройства.

В автоматических анализаторах перемешивание обеспечивается струей реагента, впрыскиваемого в кювету.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА

При обследовании больных с нарушениями белкового обмена диагностическое значение имеет определение общего белка, альбуминов и белковых фракций. В клинической практике в качестве единого метода определения общего белка принят колориметрический биуретовый метод. Достоинством метода является возможность его использования как при работе в неавтоматизированных лабораториях с отечественными реактивами и реактивами фирмы «Лахема», так и при работе на аналитических системах типа ФП-900 фирмы «Лабсистемс» (Финляндия). В ряде клиничко-диагностических лабораторий для оценки состояния белкового обмена применяют простые коллоидные реакции, позволяющие косвенно выявлять изменения в составе белков сыворотки крови. Положительный результат коллоидно-химических проб связан с изменениями соотношения между белковыми фракциями. Чаще всего из флоккуляционных проб используют тимоловую пробу.

Также разработаны флюориметрические, поляриграфические методы и атомно-абсорбционная спектрофотометрия. Они характеризуются высокой специфичностью и чувствительностью. Но данные методы в настоящее время в клинической практике широко не используются, поскольку для них требуется специальная аппаратура, высокая квалификация специалиста, и стоимость таких анализов достаточно высока. Данные методы в настоящее время применяются преимущественно в научно-исследовательской практике.

Определение общего белка сыворотки крови биуретовым методом

Принцип метода

Белки сыворотки (плазма) крови, реагируя в щелочной среде с серноокислой медью, образуют соединения, окрашенные в фиолетовый цвет. Эта специфическая биуретовая реакция, характерная для пептидов и белков, применима для фотометрического определения.

В сыворотке здоровых людей содержится 65–78 г/л общего белка, у детей до 6 лет — 5,6–8,5 г/л, у новорожденных — 5,3–8,9 г/л, в моче — 25–70 мг/сутки, в ликворе — 15–45 мг на 100 мл.

Необходимые реактивы

1. Натрия хлорид, 154 ммоль/л (изотонический раствор): 9 г хлорида натрия помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в воде и доводят до метки водой.

2. Натр едкий, 0,2 моль/л: 8 г едкого натра помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, осторожно растворяют в воде и доводят до метки водой.

3. Калия йодид, 30 ммоль/л (раствор йодида калия в 0,2 моль/л растворе едкого натра): 0,5 г йодида калия помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят 0,2 моль/л раствором едкого натра до метки и растворяют. Реактив стабилен в течение 2 недель при хранении в посуде из темного стекла.

4. Калий-натрий виннокислый 4-водный (сегнетова соль).

5. Меди сульфат 5-водный.

6. Биуретовый реактив: 4,5 г сегнетовой соли растворяют в 40 мл 0,2 моль/л растворе едкого натра, прибавляют 1,5 г сульфата меди и 0,5 г йодида калия и растворяют. Доливают до 100 мл 0,2 моль/л раствором едкого натра. Реактив стабилен при хранении в посуде из темного стекла.

7. Рабочий раствор биуретового реактива: 20 мл биуретового реактива смешивают с 80 мл 0,5%-ного раствора йодида калия. Раствор стабилен.

8. Калибровочный раствор альбумина (из человеческой сыворотки): 100 г/л раствор альбумина в 154 ммоль/л растворе хлорида натрия.

Ход определения

Опытная проба: к 0,1 мл сыворотки прибавляют 5 мл рабочего раствора биуретового реактива и смешивают, избегая образова-

Глава 2. Биохимические методы исследования

ния пены. Через 30 мин (и не позднее чем через 1 ч) измеряют на фотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 500–560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы. Холостая проба: к 5 мл рабочего биуретового реактива прибавляют 0,1 мл 154 ммоль/л раствора хлорида натрия, далее обрабатывают как опытную пробу.

Расчет ведут по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика: из калибровочного раствора готовят рабочие растворы так, как указано в таблице 7.

Таблица 7

Приготовление калибровочного раствора

Номер	Компоненты	Проба		
		опытная	холостая	калибровочная
1	10 мл мочи + + 100 мг аскорбиновой кислоты	1,5	1,5	—
2	Реактив Эрлиха	—	1,5	—
3	Насыщенный раствор ацетата натрия	—	3,0	—
4	Смесь компонентов 2 и 3 в соотношении 1 : 2	4,5	—	—
5	Рабочий калибровочный раствор	—	—	6,0

Из каждого разведения берут по 0,1 мл рабочего раствора и прибавляют по 5 мл рабочего биуретового реактива; через 30–60 мин измеряют на фотометре, как в опыте против холостой пробы. По полученным данным строят калибровочный график. Калибровочная кривая линейна до 100 г/л альбумина.

Нормальные величины: 65–85 г/л (6,5–8,5 г на 100 мл).

Оценка аналитической надежности метода

Метод специфичен, отличается хорошей воспроизводимостью. Воспроизводимость (V) составляет 1,5–3,5%. На правильность метода влияют качество калибровочного материала и корректирование результатов со значением холостой пробы на реактивы и сы-

воротку. Небольшое число веществ оказывают интерферирующее действие в данной реакции: билирубин при концентрации больше 85 мкмоль/л, триглицериды — больше 11,4 ммоль/л. Для устранения интерференции, вызванной липидемией (присутствием хиломикронов), применяют экстракцию диэтиловым эфиром. Большинство лекарств не вызывают интерференции.

Клинико-диагностическое значение

Результаты определения общего белка сыворотки крови могут быть ложно завышены при наличии липидемии, желтухи, гемолиза. Продолжительное наложение жгута повышает концентрацию всех белков в пробе.

Пробы, полученные выше места внутривенной инфузии, могут дать ошибочно заниженные результаты из-за локальной гемолиции.

Увеличение содержания белка более 90 г/л имеет место при гипериммуноглобулинемии, поликлональных или моноклональных гаммопатиях.

Снижение содержания белка ниже 60 г/л в сочетании с потерей белка наблюдается при белоктеряющих гастроэнтеропатиях, острых ожогах, нефротическом синдроме.

Понижение содержания белка, вызванное снижением синтеза белка, наблюдается при белковой недостаточности (тяжелая форма), хронических болезнях печени, синдроме мальабсорбции, нарушениях питания, α - γ -глобулинемии.

Спектрофотометрические методы определения общего белка

Данная группа методов основана на измерении светопоглощения в ультрафиолетовой области. Характерные длины волн для поглощения растворов белка — 200–225 нм (обуславливается пептидными связями) и 270–290 нм (обусловлено присутствием ароматических аминокислот, таких как тирозин, триптофан, фенилаланин в молекуле белка).

Данный метод характеризуется высокой погрешностью и недостаточно высокой эффективностью, поскольку содержание ароматических аминокислот отличается в различных белках сыворотке крови.

Определение белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза

При изучении белкового спектра крови в качестве унифицированного метода используется зональный электрофорез с поддерживающей средой-носителем.

Принцип метода

Под влиянием постоянного электрического поля белки сыворотки, имеющие отрицательный заряд, движутся по смоченной буферным раствором бумаге по направлению к положительному электроду со скоростью, зависящей от величины заряда и молекулярной массы частиц. Вследствие этого белки сыворотки крови разделяются на 5 фракций: альбумины, α_1 -, α_2 -, β -, γ -глобулины.

Альбумины обладают выраженным отрицательным зарядом и небольшой молекулярной массой, поэтому они продвигаются в электрическом поле с наибольшей скоростью и дальше других фракций отстают от линии старта. С меньшей скоростью движутся α_1 -, α_2 - и β -глобулины.

Наименьшей скоростью продвижения отличаются γ -глобулины, они практически остаются на линии старта. γ -глобулины — крупные белковые молекулы, их заряд близок к нейтральному.

Окрашенные пятна белковых фракций, полученные методом электрофореза на бумаге или других носителях, носят название электрофореграммы.

Измерения и Расчет содержания белковых фракций проводят при денситометрическом сканировании электрофореграмм. Получаемые денситограммы представляют собой графики зависимости оптической плотности и подвижности каждой фракции. Площадь пика пропорциональна количеству белков, находящихся в соответствующей фракции.

Каждая фракция имеет определенный состав белков. Процентное содержание отдельных белковых фракций меняется при многих заболеваниях, хотя общее содержание белка в сыворотке крови может оставаться в пределах нормы (диспротеинемия).

С помощью электрофореза можно провести первый этап оценки следующих патофизиологических процессов: иммунодефицит, активация гуморального звена иммунитета, воспалительный процесс, активация комплемента, снижение синтеза белка, состояние потери белка, внутрисосудистый гемолиз, генетиче-

ские варианты белков, моно- и поликлональные γ -патии (парапротеинемии).

У здоровых людей содержание альбумина составляет 56,3–68,8%, α_1 -глобулинов — 3–5,8%, α_2 -глобулинов — 6,9–10,5%, β -глобулинов — 7,3–12,5%, γ -глобулинов — 12,7–19,2%.

Унифицированный метод электрофоретического разделения на пленках из ацетата целлюлозы

Необходимые реактивы

1. 5,5-диэтилбарбитуровой кислоты натриевая соль (мединал), фарм.
2. Лимонная кислота.
3. Барбитал-цитратный (мединал-цитратный) буфер рН 8,6: 7,36 г 5,5-диэтилбарбитурата натрия (мединала), 0,3 г лимонной кислоты растворяют в 700 мл воды в мерной колбе вместимостью 1 л, проверяют рН и доводят водой до метки.
4. Бромфеноловый синий водорастворимый, индикатор.
5. Ртуть двухлористая (сулема, хлорная ртуть).
6. Уксусная кислота ледяная.
7. Пунцовый С.
8. Кислотный красный 2Ж.
9. Трихлоруксусная кислота, раствор 50 г/л.
10. Растворы для окрашивания:
 - раствор бромфенолового синего, 0,5 г/л: 10 г двухлористой ртути и 20 мл ледяной уксусной кислоты растворяют в небольшом количестве воды при нагревании на водяной бане, непрерывно помешивая до полного растворения сулемы. Отдельно растворяют 0,5 г бромфенолового синего в воде. Оба раствора помещают в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят водой до метки;
 - раствор пунцового С: 0,3 г краски растворяют в 100 мл 50 г/л раствора трихлоруксусной кислоты;
 - раствор кислого красного 2Ж: 0,3 г краски растворяют в 100 мл 50 г/л раствора трихлоруксусной кислоты.
11. Отмывающий раствор — уксусная кислота, 50 г/л раствор.
12. Просветляющие растворы:
 - вазелиновое масло;
 - смесь: ледяная уксусная кислота и ацетон (1 : 1).

Глава 2. Биохимические методы исследования

Специальное оборудование

1. Прибор для электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы.
2. Пленка из ацетата целлюлозы.
3. Денситометр.

Ход определения

Подготовка прибора: прежде чем приступить к работе, необходимо ознакомиться с инструкцией по эксплуатации прибора. В соответствии с инструкцией заполняют камеры прибора буферным раствором. Следят, чтобы уровень буфера был одинаковым в обеих камерах.

Подготовка пленок из ацетата целлюлозы: смачивают пленки буферным раствором (помещают в буферный раствор на 5 мин). Удаляют избыток влаги фильтровальной бумагой. Закрепляют пленку матовой стороной сверху (пленки должны располагаться параллельно друг другу и строго параллельно стенкам прибора, не должны провисать). Закрывают камеру крышкой и пропускают ток напряжением 150 В в течение 5 мин, после чего выключают ток.

Нанесение сыворотки: на катодный край пленки наносят 1–4 мкл сыворотки в виде узкой полоски, так чтобы полоски не доходили до края пленки.

Проведение электрофореза: включают ток и проводят электрофоретическое разделение в течение 20 мин при напряжении 150 В и силе тока 1 мА на 1 см поперечного сечения полоски.

Обработка пленок из ацетата целлюлозы: выключают ток, вынимают пленки, высушивают их вначале на воздухе в течение 5–10 мин, затем (для фиксации) в сушильном шкафу при 100 °С в течение 10 мин. Окрашивают в течение 15 мин одним из указанных красителей, после чего пленки несколько раз отмывают от избытка красителя 50 г/л раствором уксусной кислоты до исчезновения фона (3–4 раза). После отмывки пленки промокают фильтровальной бумагой и высушивают на воздухе. Затем пленки просветляют в одном из просветляющих растворов.

Расчет

Измерение проводят на денситометре. Результаты выражают в процентах.

Примечания

1. Можно использовать барбиталовый (мединал-вероналовый) буфер такого же состава, как и для электрофореза на бумаге.

2. После проведения электрофореза буфер из катодной и анодной камер смешивают, что дает возможность использовать его несколько раз.

Электрофоретическое разделение на бумаге

Необходимые реактивы

1. Буфер. Можно использовать различные виды буферов — мидинал-вероналовый, боратный, трис-буфер:

— мидинал-вероналовый буфер рН 8,6: 10,3 г мидинала и 1,84 г веронала растворяют и доводят до 1 л водой;

— трис-буфер рН 8,9: трис-(оксиметил)-аминометан — 60,5 г, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) — 6 г, борная кислота — 4,6 г, вода — до 1 л.

2. Раствор красителя. Используют различные красители — бромфеноловый синий, амидо черный, азокармин Б и др.: 1 г бромфенолового синего и 20 г двухлористой ртути (сулемы) растворяют в воде, добавляют 40 г ледяной уксусной кислоты и доводят водой до 2 л. Хранят в посуде из темного стекла.

3. Раствор для элюирования — натр едкий, 0,03 моль/л.

Специальное оборудование

1. Прибор для электрофореза на бумаге.

2. Хроматографическая фильтровальная бумага марки «Б» (качество фильтровальной бумаги имеет большое значение: она должна быть однородной и плотной).

Ход определения

Подготовка прибора: в камере необходимо поддерживать определенную влажность воздуха, чтобы предохранить фильтровальную бумагу от высыхания. Для этого прибор закрывают крышкой. Буферный раствор в разных отделах камеры должен иметь одинаковый уровень, чтобы избежать переливания жидкости через ленту.

Подготовка бумаги: полосы фильтровальной бумаги смачивают раствором свежего буфера. Избыток буфера удаляют, отжимая полосы между лентами фильтровальной бумаги, и помещают их в электрофоретическую камеру.

Бумажная лента может быть расположена горизонтально (горизонтальный электрофорез) или под углом (вертикальный электрофорез). При горизонтальном электрофорезе бумажная лента должна быть хорошо натянута.

Глава 2. Биохимические методы исследования

Нанесение сыворотки: на край ленты наносят по 5–10 мкл негемолизированной сыворотки в виде поперечной полосы, отступив на 0,5 см от краев.

Проведение электрофореза: камеру закрывают крышкой и проводят электрофорез сыворотки в течение 6–24 ч при напряжении от 3 до 8 В на 1 см пути тока. Продолжительность электрофореза устанавливают в зависимости от силы и напряжения тока, вида буферного раствора, рН, длины, ширины и толщины бумажных полос.

Обработка бумажных полос: выключают ток, вынимают ленты, помещают в сушильный шкаф на 10 мин при температуре 105 °С и красят, погружая в раствор красителя на 20 мин. Краситель сливают и ленты несколько раз промывают 20 г/л раствором уксусной кислоты до устранения фона (окрашенные участки бумаги, свободные от белка). Ленты вновь просушивают на воздухе.

Расчет

Измерение проводят на денситометре или на фотометре после элюирования. Результаты выражают в процентах.

Элюирование: кусочки ленты, содержащие отдельные фракции, вырезают и помещают в пробирки для элюирования. Для этого в каждую пробирку с глобулиновой фракцией приливают по 10 мл 0,02 моль/л раствора NaOH, к альбуминовой фракции — 20 мл и оставляют в течение 1–2 ч. Измерение проводят в кювете с толщиной слоя 1 см против 0,02 моль/л раствора NaOH при 500–560 нм (зеленый светофильтр). Величину экстинкции альбуминов умножают на 2. Определяют сумму экстинкции всех фракций, принимая ее за 100%, и вычисляют долю каждой фракции.

Клинико-диагностическое значение

Альбумин является основным онкотическим компонентом плазмы, служит в ней основным резервом азота, его роль в транспорте билирубина, желчных кислот, ионов металлов, лекарств существенно зависит от концентрации.

Абсолютной гиперальбуминемии не существует. Любое состояние, связанное с потерей воды, повышает концентрацию всех белков плазмы, включая альбумин, вызывая относительную гиперальбуминемию.

Снижение содержания альбумина встречается при многих заболеваниях: остром и хроническом воспалении, ревматических болезнях, термических ожогах, грануломатозных процессах, боль-

шинстве бактериальных инфекций, вирусных инфекциях с разрушением тканей, некрозах ткани (в частности, при злокачественных процессах), васкулитах, язвенных поражениях кишечника, серозитах, подостром бактериальном эндокардите, некоторых паразитарных поражениях.

Снижение его синтеза в печени обнаруживается при следующих процессах: острые и хронические заболевания печени, амилоидоз, нарушение питания, злокачественные новообразования, застойная сердечная недостаточность, перикардит, поражение клапанов сердца, врожденная анальбуминемия.

Увеличение потери через поверхность тела происходит при нефротическом синдроме, термических ожогах, травмах и раздавливании тканей, транссудации и экссудации из полых органов или эпителиальных поверхностей, после кровотечения и введения кровозамещающих жидкостей, желудочно-кишечных и лимфатических фистулах, повторных торакоцентезах или парацентезах, энтеропатиях, связанных с повышенной чувствительностью к пищевым продуктам (к глютену в злаках).

Повышение катаболизма отмечается при повышенной температуре тела, действии антиметаболитов, некоторых состояниях гиперметаболизма гормонального происхождения (болезнь Кушинга, тиреотоксикоз, преэклампсия).

Повышение объема крови (гиперволемиа) характерно для таких состояний, как беременность, введение экзогенных эстрогенов, моноклональные иммунопатии, застойная сердечная недостаточность.

α_1 -фракция содержит в основном α_1 -антитрипсин, кислый α_1 -гликопротеин (орозомукоид), протромбин, тиреоидсвязывающий глобулин. Из перечисленных белков α_1 -антитрипсин — белок острой фазы, повышен при многочисленных острых, подострых, хронических воспалительных и неопластических заболеваниях, а также при заболеваниях печени. Снижение содержания имеет место при наследственном дефиците α_1 -антитрипсина.

α_2 -глобулиновая зона содержит α_2 -макроглобулин, гаптоглобин, церулоплазмин, α -липопротеид, эритропоэтин. -Увеличение α_2 -фракции имеет место при нефротическом синдроме, некоторых подострых и хронических воспалительных и неопластических заболеваниях, стадиях восстановления после термических ожогов.

Глава 2. Биохимические методы исследования

Снижение содержания α_2 -фракции развивается при сахарном диабете, панкреатите, гемолизе.

β -фракция содержит трансферрин, гемопексин, β -липопротеиды. Увеличение содержания β -глобулинов развивается при первичных или вторичных гиперлипопротеинемиях (особенно II типа), моноклональных β -патиях. Снижение содержания белка имеет место при гипо- β -липопротеинемиях, дефиците IgA.

γ -фракция содержит иммуноглобулины G, A, D, M. Наличие на электрофореграммах пиков M-белков во фракциях γ -, β - или α_2 -глобулинов требует проведения иммуноэлектрофореза для уточнения характера моноклональных γ -патий.

Увеличение содержания γ -глобулинов встречается при поликлональных γ -патиях — хронических заболеваниях печени, хронических инфекциях, некоторых аутоиммунных заболеваниях; моноклональных γ -патиях — заболеваниях, протекающих с дискразией или лимфопротиперацией клеток лимфоидной ткани (миелома, макроглобулинемия, амилоидоз, лимфома, хроническая лимфоцитарная лейкемия).

Снижение содержания γ -глобулинов встречается при иммунодефицитах или иммуносупрессиях, лимфопротиперативных заболеваниях.

Унифицированный метод проведения тимоловой пробы

Тимоловая проба относится к коллоидно-осадочным, или флокуляционным, реакциям белков плазмы. Флокуляция (осаждение) белков обычно наступает при изменении их заряда, снижении количества воды в сольватной оболочке, увеличении размеров коллоидных частиц.

Принцип метода

Тимоловая проба основана на помутнении смеси при взаимодействии сыворотки с насыщенным раствором тимола в вероналовом буфере (табл. 8).

При взаимодействии тимоло-вероналового буфера с крупнодисперсными белками плазмы (β - и γ -глобулинами) помутнение образует глобулиново-тимол-липидный комплекс.

Необходимые реактивы

1. Тимол, 100 г/л спиртовой раствор: 10 г очищенного тимола растворяют в 96%-ном этиловом спирте в мерной колбе вместимостью 100 мл.

Методы исследования показателей белкового обмена

Очистка тимола: 100 г тимола растворяют в 100 мл 96%-ного этилового спирта, фильтруют. К фильтрату прибавляют 1 л холодной воды, сильно встряхивают и оставляют стоять на 20 мин.

Затем фильтруют; кристаллы, оставшиеся на фильтре, промывают 2 раза холодной водой, сушат до постоянной массы вначале на фильтровальной бумаге, затем в течение 2–3 дней в эксикаторе над безводным хлоридом кальция.

2. 5,5-диэтилбарбитуровая кислота (веронал), фарм.

3. 5,5-диэтилбарбитуровой кислоты натриевая соль (мединал), фарм.

4. Буферный раствор: 2,76 г веронала и 2,06 г мединала растворяют и доводят водой до 1 л. Хранят в холодильнике; при появлении осадка раствор не годится к употреблению.

5. Тимолово-вероналовый буфер pH 7,55–7,6: в мерной колбе вместимостью 100 мл смешивают 80 мл буферного раствора и 1 мл 100 г/л спиртового раствора тимола, встряхивают и доливают буферным раствором до метки. Проверяют pH.

6. Бария хлорид.

7. Калибровочный раствор:

— раствор хлорида бария: 1,175 г хлорида бария растворяют и доводят до 100 мл водой;

— серная кислота, 0,1 моль/л.

Суспензия сульфата бария: 3 мл раствора хлорида бария наливают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем до метки 0,1 моль/л раствором серной кислоты, при температуре 10 °С (при этой температуре размеры частиц преципитированного сульфата бария дают относительно стабильный результат). Суспензию сульфата бария готовят перед употреблением.

Ход определения

К 6 мл тимолово-вероналового буферного раствора прибавляют 0,1 мл сыворотки, оставляют стоять 30 мин и затем измеряют оптическую плотность при длине волны 630–690 нм (красный светофильтр) против тимолово-вероналового буфера в кюветах с толщиной слоя в 1 см. Реакцию проводят при комнатной температуре.

Расчет ведут по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика: из калибровочного раствора сульфата бария (суспензии) готовят разведения, соответствующие единицам помутнения по Шенк—Хогланд. Калибро-

Глава 2. Биохимические методы исследования

вочные растворы хорошо встряхивают и тотчас при длине волны 630–690 нм в кюветах с толщиной слоя в 1 см против воды измеряют.

Таблица 8

Тимоловая проба

Суспензия сульфата бария, мл	0,1 моль/л раствор серной кислоты, мл	Единицы помутнения
1,35	4,65	5
2,7	3,3	10
5,4	0,6	20

Примечание

Можно использовать готовый набор реактивов Био-Ла-Тест «Тимоловая проба» («Лахема»), в состав которого входят трис-буфер и малеиновая кислота.

Подобно всем флокуляционным тестам, тимоловая проба является неспецифической реакцией.

Однако она достаточно информативна для оценки функционального состояния печени. Проба положительна в 90–100% случаев при вирусном гепатите уже в преджелтушной стадии, при безжелтушной форме заболевания, а также при токсическом гепатите, постнекротическом циррозе печени, коллагенозах, малярии, вирусных инфекциях. При механической желтухе проба отрицательна.

Норма — 0,4 единицы.

Определение компонентов остаточного азота

Азотистый обмен включает реакции синтеза и распада белков, нуклеиновых кислот, аминокислот, нуклеотидов, а также ряда других азотсодержащих соединений. Для оценки состояния азотистого обмена определяют фракции остаточного азота в сыворотке или в цельной крови. Остаточный азот — это небелковый азот или азот, который остается в центрифугате (фильтрате) сыворотки крови или другой биожидкости после осаждения белков трихлоруксусной, фосфорно-молибденовой или фосфорно-вольфрамовой кислотой. Содержание остаточного азота и его компонентов в сыворотке крови в норме:

Методы исследования мочевины сыворотки крови

- 1) остаточный азот — 14,3–28,6 ммоль/л;
- 2) мочевина — 2,50–8,33 ммоль/л;
- 3) аминокислотный азот (азот аминокислот) — 0,02–0,05 г/л;
- 4) мочевая кислота М — 0,24–0,50 ммоль/л, Ж — 0,16–0,44 ммоль/л;
- 5) креатин — 102–408 мкмоль/л;
- 6) креатинин М — 71–115 мкмоль/л, Ж — 53–97 мкмоль/л;
- 7) индикан — 0,87–3,13 мкмоль/л;
- 8) аммиак (цельная кровь) — 17–34 мкмоль/л;
- 9) ксантопротеиновая реакция — 20 условных единиц.

Увеличение концентрации остаточного азота выше 0,4–0,5 г/л обозначается термином «азотемия». Абсолютная азотемия связана либо с задержкой азотистых шлаков при нарушении функции почек (почечная или ретенционная азотемия) либо с их усиленным образованием (внепочечная или продукционная азотемия). Относительная азотемия наблюдается при дегидратации организма.

Считается, что резкое повышение фракций остаточного азота является плохим прогностическим признаком. Однако следует иметь в виду, что при острых заболеваниях азотемия может носить временный характер.

Основным компонентом фракций остаточного азота является азот мочевины, на долю которого приходится более половины всего остаточного азота.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЧЕВИНЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Из всего разнообразия методов исследования мочевины в качестве унифицированных в лабораториях утверждены следующие:

- 1) экспресс-метод определения содержания мочевины с использованием реактивной бумаги «Уратест»;
- 2) диацетилмонооксимный метод, который может быть применен при работе как с отечественными реактивами, так и с наборами реактивов фирмы «Лаксма»;
- 3) ферментативный метод с применением кристаллического препарата уреазы.

Диацетилмонооксимный метод определения мочевины

Принцип метода

Мочевина образует с диацетилмонооксимом в сильнокислой среде в присутствии тиосемикарбазида и ионов трехвалентного железа красный комплекс.

Необходимые реактивы

1. Трихлоруксусная кислота, 100 г/л.
2. Диацетилмонооксим, 25 г/л водный раствор. Реактив стабилен.

3. Тиосемикарбазид, 2,5 г/л водный раствор. Для приготовления реактива можно пользоваться также тиосемикарбазида гидроклоридом; последний применяется в виде 3,2 г/л водного раствора.

Оба реактива стабильны при хранении в темной посуде при комнатной температуре.

4. Серная кислота концентрированная.

5. Ортофосфорная кислота 85%-ная.

6. Хлорное железо. Основной раствор хлорного железа: 5 г хлорного железа доводят до 100 мл водой и подкисляют добавлением 1 мл концентрированной серной кислоты. Из основного раствора готовят рабочий раствор хлорного железа: 1 мл основного раствора хлорного железа доводят до 100 мл водой, затем добавляют 8 мл концентрированной серной кислоты и 1 мл 85%-ной ортофосфорной кислоты. Хранят в темной посуде. Годен в течение 2 недель.

7. Бензойная кислота, 2 г/л. 0,2 г кристаллической бензойной кислоты растворяют в 100 мл воды при интенсивном перемешивании на водяной бане.

8. Мочевина для приготовления калибровочного раствора. Готовят 7 ммоль/л раствор мочевины: 42 мг мочевины растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл. В качестве растворителя можно использовать 2 г/л раствор бензойной кислоты. Калибровочный раствор, приготовленный на растворе бензойной кислоты, стабильнее, чем водный; 1 мл калибровочного раствора содержит 0,007 ммоль мочевины.

9. Цветной реактив: к 30 мл рабочего раствора хлорного железа добавляют 20 мл воды, 1 мл 25 г/л раствора диацетилмонооксима и 0,25 мл 2,5 г/л раствора тиосемикарбазида. Цветной реактив готовят каждый раз перед употреблением.

Ход определения мочевины в сыворотке крови

Опытная проба: в центрифужную пробирку наливают 0,8 мл воды, 0,2 мл сыворотки и 1 мл 100 г/л раствора трихлоруксусной кислоты, смешивают. Через 15–20 мин центрифугируют. В чистую пробирку вносят 0,5 мл надосадочной жидкости и 5 мл цветного реактива. Пробирку выдерживают на кипящей водяной бане в течение 20 мин, затем охлаждают в течение 2–3 мин под проточной водой. Измерение проводят на фотометре при длине волны 530–560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы в кювете с толщиной слоя в 1 см. Холостую пробу ставят так же, как опытную, но вместо надосадочной жидкости берут 0,5 мл воды.

Расчет проводят по формуле путем сравнения с калибровочной пробой. Калибровочную пробу ставят аналогично опытной, но вместо сыворотки берут 0,2 мл калибровочного раствора.

Концентрация мочевины, ммоль/л:

$$E_{on} / E_k \times C_k,$$

где E_{on} — экстинкция опытной пробы;

E_k — экстинкция калибровочной пробы;

C_k — концентрация мочевины в калибровочном растворе, ммоль/л.

Определение мочевины в моче проводят аналогично определению мочевины в сыворотке крови, но вместо сыворотки берут 0,2 мл разведенной мочи. Параллельно обрабатывают калибровочную пробу, как описано для определения мочевины в сыворотке крови.

Расчет мочевины на суточное количество мочи производят по следующей формуле:

$$M_{сут} = C_k \times E_{on} \times a \times K / E_k \times b,$$

где $M_{сут}$ — количество мочевины в суточной моче, ммоль;

E_{on} — экстинкция опытной пробы;

E_k — экстинкция калибровочной пробы;

C_k — содержание мочевины в калибровочном растворе, ммоль;

a — суточное количество мочи, мл;

b — количество мочи, взятое на анализ, мл;

K — коэффициент разведения мочи.

Глава 2. Биохимические методы исследования

Примечания

1. Измерение проводят не позже чем через 15 мин после охлаждения проб ввиду неустойчивости окраски.

2. Из-за неустойчивости окрашенного комплекса мочевины с диацетилмонооксимом и зависимости окраски от условий нагревания калибровочную пробу определяют параллельно каждой серии опыта.

3. При содержании мочевины в сыворотке крови выше 17 ммоль/л сыворотку разводят изотоническим раствором хлорида натрия, а результаты умножают на коэффициент разведения.

4. Для пересчета на азот мочевины результаты следует разделить на 2,14.

Ферментативный (уреазный) метод определения мочевины

Принцип метода

Мочевина под действием уреазы разлагается на углекислый газ и аммиак, который в щелочной среде с гипохлоритом натрия и фенолом образует индофенол синего цвета (метод Бергло). Светопоглощение образовавшегося продукта пропорционально содержанию мочевины в образце.

Необходимые реактивы

1. Уреаза. Для определения пригодна уреазы с активностью > 5 МЕ/мг.

2. Этилендиамин-N, N, N', N'-тетрауксусной кислоты динатриевая соль (трилон Б).

3. ЭДТА-буфер, 0,0269 моль/л, рН 6,5 : 0,50 г трилона Б растворяют в 30–40 мл воды, доводят рН до 6,5 1 моль/л раствором едкого натра и доливают водой в мерной колбе до 50 мл.

4. Основной раствор уреазы в буфере, 10 МЕ/мл: 20 мг уреазы (активность 5 МЕ/мг) растворяют в 10 мл буфера. Навеску уреазы берут в зависимости от активности фермента. Раствор стабилен в течение месяца при хранении в холодильнике.

5. Рабочий раствор уреазы. Перед началом определения берут необходимое количество основного раствора уреазы и разводят бидистиллированной водой в отношении 1 : 4.

6. Фенол.

7. Натрия нитропруссид 2-водный.

Методы исследования мочевины сыворотки крови

8. Цветной реактив: фенол — 0,11 моль/л, нитропруссид натрия — 0,18 моль/л; 0,0263 г нитропруссид натрия помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, приливают примерно 300 мл воды, растворяют при перемешивании. Затем добавляют 5,18 г фенола и доливают водой до метки. Реактив стабилен в течение месяца при хранении в холодильнике в посуде из темного стекла.

9. Натр едкий, 1 моль/л; 0,26 моль/л.

10. Гипохлорит натрия. Приготовление основного раствора гипохлорита: 100 г хлорной извести размешивают в течение 15 мин с 170 мл воды, после чего прибавляют при непрерывном помешивании раствор, состоящий из 170 мл воды и 70 г карбоната натрия. Масса сначала густеет, затем разжижается. Оставляют стоять до следующего дня. Надосадочную жидкость (гипохлорит натрия) сливают и фильтруют через промытый водой фильтр. Хранят в холодильнике в посуде из темного стекла. Определение активности хлора: 1 мл основного раствора гипохлорита натрия смешивают с 100 мл воды. К 50 мл этого раствора добавляют 5 мл свежеприготовленного 50 г/л раствора йодида калия и 10 мл 6 моль/л раствора HCl. Титруют 0,1 н раствором тиосульфата натрия (готовят из фиксанала). Как только раствор приобретает слабо-желтую окраску, добавляют 10 капель 1%-ного раствора крахмала и титруют до обесцвечивания. Концентрацию гипохлорита натрия рассчитывают по хлору:

$$K = a \times 0,709,$$

где K — концентрация активного хлора, г/100 мл гипохлорита натрия;

a — количество тиосульфата, пошедшего на титрование, мл;

$0,709$ — коэффициент пересчета 1 мл тиосульфата натрия в концентрацию хлора, г/100 мл.

11. Рабочий раствор гипохлорита натрия. После установления концентрации активного хлора основной раствор гипохлорита натрия разводят водой так, чтобы концентрация хлора составляла 0,78 г/л. Раствор гипохлорита с содержанием хлора 0,78 г/л смешивают с равным объемом 0,26 моль/л раствором едкого натра (100 мл + 100 мл). Активность хлора проверяют не реже одного раза в 2 недели. Рабочий раствор содержит 0,011 моль/л гипохлорита

Глава 2. Биохимические методы исследования

и 0,13 моль/л едкого натра. Раствор хранят в холодильнике в посуде из темного стекла.

12. Мочевина.

13. Бензойная кислота, 2 г/л (кислоту растворяют при нагревании).

14. Калибровочный раствор мочевины, 0,5 ммоль/л: 15 мг мочевины растворяют в мерной колбе вместимостью 500 мл в 2 г/л растворе бензойной кислоты. Раствор стабилен при хранении в холодильнике.

15. Натрия хлорид, 0,154 моль/л.

Специальное оборудование

1. Спектрофотометр или колориметр с кюветой для микроизмерений.

2. Полуавтоматические микропипетки.

Ход определения

Перед определением сыворотку разводят 0,154 моль/л раствором хлорида натрия в отношении 1 : 9.

Опытная проба: 100 мкл рабочего раствора уреазы вносят в пробирку, добавляют 20 мкл разведенной сыворотки. Закрывают пробкой, перемешивают и инкубируют в течение 15 мин при температуре 37 °С. После инкубации добавляют 300 мкл цветного реактива и 300 мкл рабочего раствора гипохлорита натрия. Перемешивают и инкубируют в течение 20–30 мин при температуре 37 °С. Измеряют экстинкцию в кювете с толщиной слоя в 1 см при длине волны 500–560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы. Окраска стабильна в течение нескольких часов.

Холостую пробу обрабатывают так же, как опытную, но вместо сыворотки берут 0,154 моль/л раствор NaCl.

Калибровочную пробу обрабатывают так же, как опытную, но вместо сыворотки берут калибровочный раствор мочевины. Измеряют при тех же условиях против холостой пробы.

Расчет количества мочевины в ммоль/л ведут по формуле:

$$E_{on} / E_k \times 0,5 \times 10,$$

где E_{on} — экстинкция опытной пробы;

E_k — экстинкция калибровочной пробы;

0,5 — концентрация мочевины в калибровочном растворе, ммоль/л;

10 — коэффициент разведения.

Методы исследования мочевины сыворотки крови

Линейная зависимость между оптической плотностью и концентрацией мочевины сохраняется до 33 ммоль/л.

Примечание

Объемы сыворотки и реактивов можно пропорционально увеличивать.

Содержание мочевины сыворотки крови — 2,5–8,3 ммоль/л; мочевина суточной мочи — 333–583 ммоль/л.

Верхняя граница содержания мочевины в сыворотке крови зависит от приема белков с пищей. При приеме белков свыше 2,5 г/кг живой массы в сутки верхняя граница референтных величин содержания мочевины в сыворотке может быть повышена даже до 10 ммоль/л.

Клинико-диагностическое значение

При трактовке результатов анализа следует исходить из того, что диета с низким содержанием белка может уменьшить концентрацию мочевины, а избыточное питание азотистыми продуктами повышает уровень мочевины. Диета, бедная ионами хлора, также нередко приводит к повышению концентрации мочевины. Поэтому в большинстве случаев повышение концентрации мочевины до 12 ммоль/л считается физиологически допустимым. Однако существует мнение, что всякое повышение мочевины в крови выше 10 ммоль/л нужно рассматривать выходящим за пределы нормы, так как едва ли какой-либо пищевой режим способен поднять содержание мочевины крови выше этого уровня при отсутствии выделительных расстройств.

Из других физиологических состояний следует отметить беременность, при которой концентрация мочевины в крови часто падает ниже 4,5 ммоль/л.

Повышение уровня мочевины в сыворотке крови наблюдается не только при почечной недостаточности, но и при ряде других патологических состояний: рефлкторной анурии, камнях и злокачественных новообразованиях в мочевыводящих путях, болезни предстательной железы, отравлении сулемой, болезни Аддисона, усиленном распаде белков (острой желтой атрофии печени, тяжелых инфекционных заболеваниях: брюшном тифе, холере и др.), при непроходимости кишечника (илеусе), перитоните, шоке, ожогах, обеднении организма ионами хлора (хлорипривная азотемия, уремия), а также при дизентерии, обезвоживании (в последнем случае уремия носит не абсолютный, а относительный харак-