

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ
ДИАГНОСТИКА**

Часть 1

Учебно-методическое пособие

Волгоград, 2015

УДК
ББК
К

Рецензенты:

зав. кафедрой патологической анатомии ГБОУ ВПО ВолгГМУ,
д. м. н., профессор А.В. Смирнов;
профессор кафедры биологии ГБОУ ВПО ВолгГМУ,
д. м. н., доцент Г.Л. Снигур

Авторы:

доцент, к. м. н. *Е. А. Загороднева*
ассистент, к.м.н. *К. П. Вахания*
ассистент *У. Б. Матохина*
ассистент, к.м.н. *Л. Ю. Мешкова*
ассистент, к.м.н. *Н. Г. Краюшкина*
ассистент *Е. С. Рожкова*

Под редакцией д. м. н., профессора А. Т. Яковлева

Клиническая лабораторная диагностика: Учебно-методическое пособие. Часть 1 /
Е. А. Загороднева, К. П. Вахания и др. / под ред. д. м. н., проф. А. Т. Яковлева. – Волгоград:
Изд-во ВолгГМУ, 2015. – 183 с.

В учебно-методическом пособии рассмотрены принципы организации лабораторной службы; даны современные сведения о структуре и функции жизненно важных органов, о клинико-лабораторных тестах, отражающих особенности их состояния, методах лабораторно-диагностического исследования, об особенностях изменения биохимического и морфологического состава крови, мочи, желудочного содержимого, цереброспинальной жидкости, мокроты, отделяемого половых органов и иного биологического материала при широко встречающихся заболеваниях, а также о выполнении контроля качества лабораторных исследований, интерпретации полученных результатов.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов, обучающихся по специальности «Медико-профилактическое дело» лечебного факультета и «Медицинская биохимия» медико-биологического факультета ВолГМУ.

© Волгоградский государственный
медицинский университет, 2015

© Авторы, указанные на обороте
титального листа, по темам, 2015

Содержание

| № | Разделы: | Стр. |
|-----|--|------|
| 1. | Техника безопасности в клинической лаборатории. Вопросы этики и деонтологии в профессиональной деятельности врача КЛД..... | 4 |
| 2. | Организация лабораторной службы. Организационные основы КДЛ. | 16 |
| 3. | Контроль качества лабораторных анализов..... | 28 |
| 4. | Получение и подготовка биологического материала для исследований..... | 43 |
| 5. | Методы гематологических исследований..... | 59 |
| 6. | Диагностика патологии белого ростка системы крови..... | 84 |
| 7. | Диагностика патологии красного ростка системы крови..... | 92 |
| 8. | Биохимические методы исследования..... | 107 |
| 9. | Клинический и биохимический анализ мочи в диагностике заболеваний почек..... | 122 |
| 10. | Диагностика заболеваний печени..... | 136 |
| 11. | Цитологические исследования в лабораторной диагностике..... | 145 |
| 12. | Иммунологические серологические методы в лабораторной диагностике..... | 165 |
| 13. | Иммуноферментные методы в лабораторной диагностике..... | 172 |
| | <i>Рекомендуемая литература.....</i> | 177 |
| | <i>Тестовые задания для самоконтроля.....</i> | 178 |
| | <i>Ответы на тестовые задания.....</i> | 183 |

1. Тема занятия: Техника безопасности в клинической лаборатории. Вопросы этики и деонтологии в профессиональной деятельности врача КДЛ.

Цель занятия: Знакомство с техникой безопасности, санитарно-противоэпидемическим режимом и этическими аспектами работы КДЛ.

Перечень знаний и практических навыков:

- Знать правила техники безопасности при работе в лаборатории.
- Освоить правовые аспекты лабораторной службы.
- Уметь соблюдать санитарно-противоэпидемический режим при работе с биологическим материалом.
- Охарактеризовать вопросы этики и деонтологии в работе КДЛ.

Все мероприятия, направленные на предупреждение биологической опасности в условиях лаборатории, можно подразделить на 3 группы:

- организационные меры;
- применение индивидуальных и коллективных защитных средств;
- соблюдение дезинфекционного режима.

Организационные мероприятия

В каждой лаборатории выделяется ответственный за технику безопасности, который обязан проводить соответствующий инструктаж среднего и младшего медицинского персонала при приеме на работу, а в последующем – не реже одного раза в квартал. О прохождении инструктажа делается отметка в специальном журнале. Для облегчения обучения младшего персонала в лабораториях с учетом местных условий составляются памятки по мерам безопасности, которые используются при периодическом инструктаже, а также размещаются непосредственно на рабочих местах.

Помещения КДЛ можно использовать только по их прямому назначению, проведение в них каких-либо других работ не разрешается.

Клинико-диагностическая лаборатория должна быть обеспечена водопроводом, горячим водоснабжением, канализацией, центральным отоплением.

Помещения лаборатории должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией с механическим побуждением. Вентиляция во всех помещениях должна включаться до начала работы.

Независимо от наличия приточно-вытяжной вентиляции в лабораториях должны быть легко открывающиеся форточки, кроме специальных боксов бактериологической лаборатории.

В помещениях для проведения исследований мочи и кала, биохимических, серологических и гормональных исследований следует устанавливать вытяжные шкафы.

При размещении оборудования особое внимание уделяют аппаратам – потенциальным источникам биологического аэрозоля. По этой причине рекомендуется размещать центрифуги в отдельных помещениях, в которых не предусматривается постоянное пребывание персонала.

Ядовитые средства должны храниться в отдельной комнате в сейфах под замком. Ключи должны храниться у лица, ответственного за их хранение, – у заведующего КДЛ.

Индивидуальные и коллективные защитные средства

Минимальный набор средств индивидуальной защиты при работе с биологическим материалом включает медицинский халат, шапочку и резиновые перчатки. При угрозе разбрызгивания биологического материала дополнительно используют маски, очки, клеенчатый фартук. Набор спецодежды, используемый при работе с материалом, подозрительным на инфицированность возбудителями I-II групп патогенности, регламентирован санитарными правилами «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности», СП 1.2.011-94. Работа в лабораториях диагностики СПИДа осуществляется в соответствии с режимом работы с возбудителями III группы патогенности.

Смена спецодежды в обычных КДЛ осуществляется не реже 2 раз в неделю, а при возникновении аварийных ситуаций – немедленно. В случае попадания на одежду биологического материала, перед тем как снять ее,

загрязненное место обрабатывают дезинфицирующим раствором. Стирка одежды на дому категорически запрещена.

Резиновые перчатки обязательны для использования при работе не только с кровью, но и с любым биологическим материалом. Необходимо избегать уколов и порезов. Все повреждения кожи на руках должны быть закрыты лейкопластырем.

В случае загрязнения кожных покровов кровью или другими биологическими жидкостями следует немедленно обработать их в течение 2 минут тампоном, обильно смоченным 70%-ным спиртом, вымыть под проточной водой с мылом и вытереть индивидуальным тампоном.

При загрязнении перчаток кровью их протирают тампоном, смоченным 3%-ным раствором хлорамина или 6%-ным раствором перекиси водорода.

При подозрении на попадание крови на слизистые оболочки их немедленно обрабатывают струей воды, 1%-ным раствором борной кислоты или вводят несколько капель нитрата серебра; нос обрабатывают 1 %-ным раствором протаргола; рот и горло прополаскивают 70%-ным спиртом или 1%-ным раствором перманганата калия.

Запрещается пипетирование крови ртом; следует использовать автоматические пипетки, а при их отсутствии – резиновые груши.

Важный этап в предупреждении внутрилабораторного заражения – грамотная транспортировка биологического материала в лабораторию. Материал должен быть помещен в надежно закрывающуюся посуду, сопроводительная документация должна прикладываться в отдельном целлофановом пакете. Для доставки материала в центральную диагностическую лабораторию из отделений больницы используют специальные металлические или пластмассовые маркированные закрывающиеся ящики. После разгрузки они обязательно обрабатываются дезинфицирующими растворами.

Распаковка материала, доставленного в лабораторию, проводится в специально отведенном для этого месте. Персонал работает в перчатках, а емкости с материалом помещают на эмалированные или металлические подносы.

Соблюдение дезинфекционного режима

Лабораторные инструменты, иглы, капилляры, предметные стекла, пробирки, меланжеры, счетные камеры, кюветы фотоэлектрокалориметра, пипетки, наконечники, резиновые груши и другая посуда после каждого использования должны подвергаться дезинфекции.

Использованные изделия промывают в емкости с водой. Промывные воды обеззараживают кипячением в течение 30 мин или засыпают сухой хлорной известью в соотношении 200 г на 1 л, перемешивают и обеззараживают в течение 60 мин. Промытые изделия кипятят в закрытой емкости в воде 30 мин или в 2%-ном растворе соды в течение 15 мин. (в случае кипячения изделий в 2%-ном растворе соды дальнейшая предстерилизационная очистка не проводится).

Лабораторные инструменты могут быть обеззаражены погружением в дезинфицирующий раствор на 60 мин. В качестве дезинфицирующих используются следующие растворы: 3%-ный раствор хлорамина; 6%-ный раствор перекиси водорода 6%-ный раствор перекиси водорода с 0,5%-м моющим средством; 4%-ный раствор формалина; 0,5%-ный раствор нейтрального гипохлорита кальция; 0,5%-ный сульфохлорантин.

Изделия должны быть полностью погружены в раствор. При дезинфекции изделий, имеющих внутренние каналы, раствор дезинфектанта сначала прокачивают через них с помощью груши для удаления остатков биологического материала, а затем погружают в новую емкость, заполненную дезраствором.

Емкости для дезрастворов должны быть четко промаркированы и иметь крышки. В маркировке емкости указывают: название дезраствора, его концентрацию, назначение и дату приготовления. Растворы дезинфектантов используются однократно. Каждая партия сухих хлорсодержащих дезинфектантов перед использованием должна подвергаться контролю на содержание активного хлора.

Растворы перекиси водорода готовят ежедневно, хлорамина – на две недели, хлорной извести, нейтрального гипохлорита кальция – на шесть дней. Замена дезраствора в рабочих емкостях проводится ежедневно.

Кварцевые, стеклянные, пластмассовые кюветы измерительной аппаратуры, пластиковые пробирки аппаратуры обеззараживают погружением в 6%-ный раствор перекиси водорода и промывают проточной водой.

С предметных стекол с фиксированным и окрашенным мазком крови после проведения микроскопии удаляют остатки иммерсионного масла, стекла кипятят в мыльном растворе не менее 15 мин до полного отхождения краски, затем промывают проточной водой, подсушивают на воздухе и протирают.

Остатки крови, мочи, спинномозговой жидкости и т. д., пробы, содержащие разведенную сыворотку без добавления кислот, щелочей, сливают в специальную тару и обеззараживают сухой хлорной известью в соотношении 1:5 в течение 1 ч. Посуду из-под мочи, кала обрабатывают дезраствором, но не стерилизуют.

Для обеззараживания поверхностей рабочих столов, емкостей для транспортировки материала и т. п. проводят их двукратное обтирание ветошью, смоченной 6%-ным раствором нейтрального гипохлорита кальция, 0,5%-ным раствором сульфохлорантина. Использованную ветошь сбрасывают в специально выделенную емкость с дезинфицирующим раствором, маркированную «Для дезинфекции использованной ветоши».

Перчатки после окончания работы обеззараживают погружением в 3%-ный раствор хлорамина или 6%-ный раствор перекиси водорода на 1 ч.

Одноразовый инструментарий и посуду утилизируют в паровом стерилизаторе (режим: температура 132°C; давление – 2 кгс/см², время – 30 мин), после чего выбрасывают. Эффективность обеззараживания при этом контролируют по расплавлению химического теста.

Работа в бактериологических лабораториях с микроорганизмами III-V групп патогенности

При работе в бактериологических лабораториях с микроорганизмами III-IV групп патогенности в дополнение к вышеизложенному соблюдается ряд правил, обусловленных присутствием заведомо инфицированного материала и чистых культур микроорганизмов.

Работа с патогенными микроорганизмами возможна только после получения соответствующей лицензии в органах Госсанэпиднадзора России в соответствии с постановлением Правительства РФ от 3.04.1996 г. № 390. В помещениях, предназначенных для работы с инфицированным материалом, запрещается прикасаться к исследуемому материалу руками, все манипуляции с ним, а также с культурами микроорганизмов проводятся только с помощью инструментов. Посевы следует выполнять вблизи зажженной горелки, обжигая в процессе работы края пробирок, петли и шпатели. Запрещается переливать инфицированные жидкости из сосуда в сосуд через край, оставлять на столах нефиксированные мазки.

Весь инструментарий должен быть дезинфицирован обжиганием или погружен в банки с дезинфицирующим раствором непосредственно после использования.

После завершения работ персонал бактериологических лабораторий обязан провести дезинфекцию рабочего стола и рук, бокса, помещения. Полы моют с применением дезинфицирующего раствора, мебель и оборудование протирают смоченной дезрастворами ветошью. Помещение бокса не реже 1 раза в неделю моют горячей водой с моющими и дезинфицирующими средствами. По окончании уборки помещения облучают бактерицидными лампами в течение 30 – 60 мин. Лампы устанавливают из расчета мощности $2,5 \text{ Вт/м}^3$.

Уборка

Влажная уборка помещений лаборатории проводится ежедневно с применением моющих и дезинфицирующих средств. Один раз в месяц в помещениях, где проводится работа с кровью, сывороткой, делают генеральную уборку с использованием 3%-ного раствора хлорамина, хлорной извести и т. д. Во время генеральной уборки тщательно моют стены, оборудование, мебель, проводят очистку полов от наслоений, пятен и т. д. Генеральные уборки проводят по утвержденному графику.

Предстерилизационная очистка и стерилизация

После дезинфекции лабораторный инструментарий, соприкасающийся с раневой поверхностью или слизистыми оболочками обследуемого, подлежит

обязательной предстерилизационной очистке и стерилизации в соответствии с ОСТ 42-21-2-85 «Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения». Предстерилизационную очистку проводят с применением моющих растворов. Для приготовления 1 л моющего раствора отмеривают 5 г стирального порошка без биодобавок, 16 мл 33%-ного раствора перекиси водорода и 979 мл воды. Моющий раствор можно использовать в течение суток, если цвет раствора не изменился.

При проведении очистки изделия замачивают при полном погружении в моющем растворе, подогретом до +50°C, на 15 мин. Каждое изделие моют в растворе при помощи ерша и ватномарлевого тампона не менее 0,5 мин, затем ополаскивают проточной водой в течение 10 мин, а затем – дистиллированной водой.

Качество предстерилизационной очистки изделий оценивают на наличие крови путем постановки амидопириновой или азопирамовой пробы, на наличие остаточных количеств щелочных компонентов моющего вещества – путем фенолфталеиновой пробы.

Самоконтроль в КДЛ проводят ежедневно, контролю подвергают не менее 1 % обработанных изделий одного наименования, но не менее 3 – 5 единиц. При положительной пробе на кровь или моющее средство всю группу контролируемых изделий подвергают повторной обработке до получения отрицательных результатов.

После предстерилизационной очистки проводят стерилизацию инструментария и посуды. Стерилизация – это полное уничтожение микроорганизмов и их спор. Методы, средства и режимы стерилизации изделий медицинского назначения определены стандартом ОСТ 42-21-2-85.

Используемые в лабораторной практике методы стерилизации можно подразделить на несколько групп:

- Физические методы: стерилизация паром; стерилизация воздушная; стерилизация излучением.
- Химические методы: стерилизация газами; стерилизация растворами.

Стерилизация паром

Стерилизация паром под давлением является наиболее универсальным методом. Она реализуется с помощью специального устройства – парового стерилизатора (автоклава). Выбор режима стерилизации определяется видом материала.

К работе на паровых стерилизаторах допускаются только лица, прошедшие специальное обучение и имеющие удостоверение на право работы установленного образца. Не реже чем раз в 3 года знания такого лица подлежат повторной проверке с соответствующей отметкой в удостоверении.

Воздушный метод стерилизации

Воздушный метод стерилизации используется в случае, если обработке подвергаются изделия или материалы, которые нельзя стерилизовать паром, например масла, порошки, а также изделия, выполненные из корродирующих металлов, стекла и термостойких пластиков (силиконовой резины).

Для проведения обработки используют воздушные стерилизаторы-ГИСС.

В ОСТ 42-21-2-85 приводятся режимы стерилизации изделий медицинского назначения с использованием сухого горячего воздуха:

- 180°C при времени экспозиции 60 мин;
- 160°C при времени экспозиции 150 мин.

Весь цикл работы стерилизатора включает время на разогрев стерилизатора, время на стерилизацию аппарата и обычно составляет 2 – 4 ч в зависимости от объема стерилизационной камеры и количества стерилизуемых изделий.

В воздушные стерилизаторы разрешается укладывать только чистые и сухие изделия, причем последние либо помещаются в металлические контейнеры, либо упаковываются в пакеты из крафт-бумаги.

Швы на бумажных пакетах заклеивают клеем, состоящим из 10%-ного поливинилового спирта или 5%-ного крахмала. В упаковке из бумаги время хранения стерильных изделий составляет не более 3-х суток. Изделия, простерилизованные без упаковки, должны быть использованы непосредственно после стерилизации.

Контроль за проведением стерилизации

Контроль за проведением стерилизации предусматривает проведение контроля режимов стерилизации и контроль стерильности изделия.

Сотрудники ЛПУ осуществляют самоконтроль режима стерилизации с помощью химических тестов, например термохимических индикаторов, выпускаемых НПФ «Винар», которые меняют свой цвет в зависимости от способа и режима стерилизации.

Наиболее достоверно оценить эффективность работы стерилизатора позволяет бактериологический метод. В нашей стране в соответствии с «Методическими указаниями по контролю работы паровых и воздушных стерилизаторов» (МУ №16/6-5 28.2.91) в качестве биотестов используют высушенные споры *Bacillus Stearotherophilus* (штамм G) – для контроля воздушных стерилизаторов.

Химические методы стерилизации

Химические методы стерилизации в лабораторной практике используются крайне редко, т. к. стерилизация растворами в условиях лаборатории не технологична. Простерилизованное изделие необходимо отмывать от стерилизанта большими объемами стерильной воды в асептических условиях, а сроки хранения стерильных изделий, перенесенных после обработки в заранее простерилизованные емкости, не велики (не более 3 суток).

Меры безопасности при аварийных ситуациях КДЛ

Персонал лаборатории должен быть обучен действиям при аварийных ситуациях, а в лаборатории всегда должно иметься все необходимое для ликвидации их последствий. При проливе или разбрызгивании биоматериалов о происшествии необходимо поставить в известность заведующего КДЛ, который определяет вид и объем дезинфекционных мероприятий. Все случаи аварий в КДЛ любого профиля подлежат обязательной регистрации во внутрилабораторном журнале по технике безопасности.

В случае разрушения сосудов с материалом во время центрифугирования аварийные мероприятия начинают проводить не ранее чем через 30 – 40 мин,

после осаждения биологического аэрозоля. В гнездо ротора заливают на 60 мин один из дезинфицирующих растворов, после чего переносят содержимое гнезда в сосуд с дезраствором. Затем ротор, стенки и крышки центрифуги протирают ветошью, смоченной в дезрастворе.

Непосредственно на рабочих местах должны находиться аптечки, содержащие стерильные ватные и марлевые тампоны, 70%-ный спирт, 1%-ный раствор нитрата серебра, 1%-ный раствор протаргола, 0,05%-ный раствор перманганата калия, 1%-ный спиртовой раствор йода, лейкопластырь.

При повреждении кожи из раны выдавливают кровь, после чего обрабатывают поврежденное место сначала 70%-ным спиртом, а затем йодом.

Вопросы этики и деонтологии в лабораторной практике

В настоящее время проблемы этики и деонтологии, включая вопросы общения, становятся особенно актуальными и социально значимыми, что обуславливает необходимость поиска путей повышения действенности и эффективности воспитания медицинских работников.

Деонтологию в работе клинической лаборатории определяют как науку о моральном, эстетическом и интеллектуальном облике человека, посвятившего себя благородному делу – заботе о здоровье человека. Эта наука о взаимоотношениях между медиками, больными и их родственниками, а также между коллегами в медицинском коллективе и социальными учреждениями, участвующими в борьбе за жизнь и здоровье людей.

В комплексном обследовании пациента лабораторные методы исследования углубляют данные объективного осмотра и помогают расшифровать и понять сущность субъективных проявлений болезни. Вспомогательные лабораторные методы исследования имеют очень важное значение для ранней диагностики и диагностики заболеваний, протекающих бессимптомно. Таким образом, роль лаборатории в обеспечении медицинской помощи пациентам исключительно велика, от качества их работы зависит не только успех лечебно-диагностического процесса.

Для будущего медицинского работника строгое соблюдение этических норм должно стать неукоснительным правилом его жизни и поведения в семье, на улице, в общественных местах. Это поможет ему почти автоматически, без особых усилий выполнять их повседневно в профессиональной медицинской деятельности.

Деонтология в лабораторной работе включает следующие аспекты:

- взаимоотношения фельдшера-лаборанта и врача-клинициста;
- взаимоотношения специалиста с пациентом;
- взаимоотношения между коллегами;
- соблюдение соответствующей дисциплины с целью предупреждения ятрогенных заболеваний;
- предупреждение ошибок в лабораторной работе и др.

Производственная работа врача клинической лабораторной диагностики включает следующие этапы:

- взятие или прием материала от больного для анализа;
- исследование этого материала;
- заключение по результатам исследования;
- выдача результатов анализа.

Значительное количество врачей КЛД постоянно или периодически связаны непосредственно с пациентом. В данном контексте особое значение приобретает первая встреча с пациентом, результат которой зависит от взаимопонимания. Именно принятый врачом при первой встрече стиль общения в дальнейшем определит конструктивность общения в целом. Пациенты нуждаются в проявлении должного внимания и чувства сострадания со стороны персонала лаборатории. Открывая дверь лаборатории, пациент должен видеть приветливый взгляд и слышать доброжелательные слова. К сожалению, бывают случаи, когда даже слова приветствия (“Здравствуйте”, “Добрый день”) остаются без ответа со стороны персонала. Иногда остаются без внимания и слова благодарности, сказанные пациентом.

Прямой вред наносят пациентам неприветливое, недоброжелательное, официальное, сухое обращение сотрудников лаборатории с проявлением раздражительности, нетерпеливости, обидчивости, антипатии, спешки, забывчивости, панибратства, своего превосходства, а также их громкие профессиональные разговоры, особенно возгласы, неделовая обстановка, перебранки и споры, замечания старших о недобросовестном отношении к своим обязанностям младших.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Документы, регламентирующие деятельность КДЛ.
2. Организационные мероприятия, направленные на обеспечение биологической безопасности.
3. Использование средств индивидуальной и коллективной защиты.
4. Соблюдение санитарно-дезинфекционного режима.
5. Уборка помещений в лаборатории.
6. Стерилизация и дезинфекция инструментов.
7. Меры безопасности в аварийных ситуациях.
8. Этика и деонтологии в работе КДЛ.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач.
2. Записать правила техники безопасности и санитарно-эпидемиологический режим при работе с биологическим материалом.
3. Записать основные регламентирующие документы, приказы при работе в лаборатории.

2. Тема занятия: Организация лабораторной службы. Организационные основы КДЛ.

Цель занятия: Знакомство с организацией лабораторной службы, основными принципами клинической лабораторной диагностики; законодательными, нормативными, методическими документами, регламентирующими деятельность лабораторной службы и освоение понятия о стандартизации в КЛД, ее задачах, цели, объектах.

Перечень знаний и практических навыков:

- Знать основы организации лабораторной службы.
- Усвоить цели, задачи и место клинической лабораторной диагностики в практической медицине.
- Изучить понятия диагностической чувствительности и специфичности теста.
- Овладеть навыком расчета диагностической чувствительности и специфичности теста.
- Знать организационные основы КЛД.
- Освоить понятие о стандартизации, ее цели и задачи.
- Охарактеризовать типы клинико-диагностических лабораторий ЛПУ.
- Ознакомиться с оснащением КДЛ.
- Уметь дифференцировать стандартные и не стандартные единицы измерения лабораторных величин.

Клиническая лабораторная диагностика представляет собой медицинскую диагностическую специальность, состоящую из совокупности исследований *in vitro* биоматериала человеческого организма, основанных на использовании гематологических, общеклинических, паразитарных, биохимических, иммунологических, серологических, молекулярно-биологических, бактериологических, генетических, цитологических, токсикологических, вирусологических методов, сопоставления результатов этих методов с клиническими данными и формулирования лабораторного заключения.

Клинико-диагностические лаборатории подразделяются на две большие группы:

- лаборатории общего типа;
- специализированные лаборатории.

Структура лабораторной службы в основном соответствует потребностям учреждений здравоохранения в лабораторной диагностике и мониторинге за терапией больных, обеспечивая повседневные запросы лечащих врачей в наиболее распространенных исследованиях (КДЛ общего типа), экстренном их выполнении в ургентной практике (экспресс-лаборатории), а также серийное производство наиболее сложных исследований. Этим занимаются специализированные лаборатории (гематологические, цитологические, биохимические, иммунологические).

Клинико-диагностическая лаборатория является диагностическим подразделением лечебно-профилактического учреждения и создается на правах отделения. КДЛ, независимо от подчиненности и формы собственности, должна иметь сертификат на избранный вид деятельности.

Штаты КДЛ устанавливаются в соответствии с действующими нормативными документами с учетом местных условий или рассчитываются в соответствии с объемом работы (приложение 12 к приказу МЗ РФ № 380).

Оснащение КДЛ осуществляется в соответствии с профилем и уровнем лечебно-профилактического учреждения (приложение 8 к приказу МЗ РФ № 380).

КДЛ размещается в специально оборудованных помещениях, полностью соответствующих требованиям правил по устройству, эксплуатации и технике безопасности.

Основными задачами КДЛ являются:

- проведение клинических лабораторных исследований в соответствии с профилем ЛПУ (общеклинических, гематологических, иммунологических, цитологических, биохимических, микробиологических и других, имеющих высокую аналитическую и диагностическую надежность) в объеме согласно

заявленной номенклатуре исследований при аккредитации КДЛ в соответствии с лицензией ЛПУ;

- объем выполняемых исследований не должен быть ниже минимального объема, рекомендуемого для ЛПУ данной мощности;
- внедрение прогрессивных форм работы, новых методов исследований, имеющих высокую аналитическую точность и диагностическую надежность;
- повышение качества лабораторных исследований путем систематического проведения внутрिलाбораторного контроля качества лабораторных исследований и участия в программе Федеральной системы внешней оценки качества (ФСВОК);
- оказание консультативной помощи врачам лечебных отделений в выборе наиболее диагностически информативных лабораторных тестов и трактовке данных лабораторного обследования больных;
- обеспечение клинического персонала, занимающегося сбором биологического материала, детальными инструкциями о правилах взятия, хранения и транспортировки биоматериала, обеспечивающими стабильность образцов и надежность результатов. Ответственность за точное соблюдение этих правил клиническим персоналом несут руководители клинических подразделений;
- повышение квалификации персонала лаборатории;
- проведение мероприятий по охране труда персонала, соблюдение техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима в КДЛ;
- ведение учетно-отчетной документации в соответствии с утвержденными формами.

В соответствии с указанными задачами КДЛ осуществляет:

- Освоение и внедрение в практику методов клинической лабораторной диагностики, соответствующих профилю и уровню лечебно-профилактического учреждения.
- Проведение клинических лабораторных исследований и выдачу по их результатам заключений.

Деятельность КДЛ регламентируется нормативными документами Минздрава России и «Положением о клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (приложение 1 приказа МЗ № 380 от 25.12.1997 г.).

Документы, регламентирующие деятельность КДЛ

Основные нормативные документы Минздрава России, регламентирующие деятельность КДЛ:

- Приказ Минздрава России от 25.12.1997 № 380 «О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».
- Приказ Минздрава России от 07.02.2000 № 45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».
- Приказ Минздрава России от 21.12.1993 № 295 «Об утверждении положения об аккредитации клинико-диагностических лабораторий».
- Приказ Минздрава России от 05.06.1996 № 233 «Об аккредитации клинико-диагностических лабораторий в качестве экспертных».
- Приказ МЗ СССР от 23.04.1985 № 545 «О дальнейшем совершенствовании контроля качества клинических лабораторных исследований».
- Приказ МЗ СССР от 24.12.1990 № 505 «О дальнейшем совершенствовании и развитии системы межлабораторного контроля качества клинических лабораторных исследований».
- Приказ Минздрава России от 26.01.1994 № 9 «О совершенствовании работы по внешнему контролю качества клинических лабораторных исследований».
- Приказ МЗ и МП РФ от 03.05.1995 № 117 «Об участии клинико-диагностических лабораторий лечебно-профилактических учреждений России в Федеральной системе внешней оценки качества клинических лабораторных исследований».

- Приказ МЗ и МП РФ от 19.02.1996 № 60 «О мерах по дальнейшему совершенствованию Федеральной системы внешней оценки качества клинических лабораторных исследований».
- Приказ МЗ СССР от 04.10.1980 № 1030 «Об утверждении форм первичной документации учреждений здравоохранения».
- Приказ Минздрава России от 29.04.1997 № 126 «Об организации работы по охране труда в органах управления, учреждениях, организациях и на предприятиях системы Министерства здравоохранения Российской Федерации».
- «Правила устройства техники безопасности и производственной санитарии в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР», 1971 г.
- «Правила устройства, техники безопасности и производственной санитарии, противэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР», 1981 г.
- «Положение о порядке учета, хранения, обращения, отпуска и пересылки культур бактерий, вирусов, риккетсий, грибов, простейших, микоплазм, бактериальных токсинов, ядов биологического происхождения», МЗ СССР от 18.05.1979 г.
- «Правила техники безопасности при эксплуатации изделий медицинской техники в учреждениях здравоохранения», МЗ СССР, 1985 г.
- «Инструкция по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утверждена 17.01.1991 г. МЗ СССР.
- «Инструкция по противэпидемическому режиму в лабораториях диагностики СПИД» № 42–28/39–90 от 05.06.1990 г.
- «Правила по эксплуатации и технике безопасности при работе на автоклавах» от 30.03.1991 г.
- Санитарные правила и нормы 2.1.7.728–99. «Правила сбора, хранения и удаления отходов в лечебно-профилактических учреждениях».

Создание и развитие системы стандартизации в здравоохранении направлено на достижение оптимальной степени упорядочивания в системе охраны здоровья граждан посредством широкого и многократного использования установленных положений, требований, норм для решения реально существующих, планируемых или потенциальных задач.

Цели, задачи и принципы стандартизации в здравоохранении

Целью стандартизации в здравоохранении является повышение качества профилактических и лечебно-диагностических мероприятий, решение задач сохранения и улучшения здоровья населения.

Основными задачами в области стандартизации в здравоохранении являются:

- нормативное обеспечение реализации законов в области охраны здоровья граждан и Концепции развития здравоохранения и медицинской науки в Российской Федерации;
- создание единой системы оценки показателей качества и экономических характеристик медицинских услуг, установление научно обоснованных требований к их номенклатуре, объему и качеству, обеспечение взаимодействия между субъектами, участвующими в оказании медицинской помощи;
- установление требований к условиям оказания медицинской помощи, эффективности, безопасности, совместимости и взаимозаменяемости процессов, оборудования, инструментов, материалов, медикаментов и других компонентов, применяемых в здравоохранении;
- нормативное обеспечение метрологического контроля;
- установление единых требований к лицензированию и аккредитации медицинских учреждений, подготовке, аттестации и сертификации специалистов;
- нормативное обеспечение сертификации и оценки качества медицинских услуг;
- создание и обеспечение в установленном порядке надзора и контроля за соблюдением требований нормативных документов;
- содействие обеспечению национальной безопасности страны.

В соответствии с международной организацией по стандартизации, (ИСО, International Organization for Standardization, ISO), которая занимается выпуском стандартов, рекомендуются следующие разновидности нормативных документов, принятые в Государственной системе стандартизации РФ:

1. Стандарт – нормативный документ, разработанный на основе консенсуса и утвержденный признанным органом, в котором устанавливаются для всеобщего и многократного использования правила, общие принципы или характеристики касающиеся различных видов деятельности или их результатов, и который направлен на достижение оптимальной степени упорядочения в определенной области.

- ГОСТ (ГОСТ Р) – Государственный стандарт России
- ОСТ – Отраслевой стандарт
- СТП – Стандарт предприятия
- СТО – Стандарт объединений

В состав могут входить руководящие документы, рекомендации, методические указания.

Отраслевой стандарт – стандарт, разрабатываемый в случае отсутствия на объект стандартизации ГОСТ Р или при необходимости установления требований, превышающих установленные ГОСТ Р. Порядок разработки ОСТа устанавливается отраслевым органом государственного управления.

Региональный стандарт – стандарт, принятый региональной организацией, занимающейся стандартизацией, и доступный широкому кругу потребителей.

Национальный стандарт – стандарт, принятый национальным органом по стандартизации и доступный широкому кругу потребителей. К нему можно отнести Государственные стандарты и стандарты отрасли.

Стандарт объединений (союзов, ассоциаций объединений и др.) разрабатывается в случае отсутствия на объект стандартизации ГОСТ Р и ОСТ или при необходимости установления требований, расширяющих установленные ГОСТом Р или ОСТом; порядок разработки стандарта

объединения гармонизируется с государственным и отраслевым порядком разработки и устанавливается этим объединением.

Стандарт предприятия разрабатывается в случае отсутствия на объект стандартизации ГОСТ Р и ОСТ или при необходимости установления требований, расширяющих установленные ГОСТом Р или ОСТом; порядок разработки стандарта предприятия гармонизируется с государственным и отраслевым порядком разработки и устанавливается этим предприятием.

2.Технические условия (ТУ) – это документ, устанавливающий технические требования, которым должны удовлетворять конкретное изделие, материал, вещество и пр. или их группа.

3.Технический регламент – документ (нормативный правовой акт), устанавливающий **обязательные** для применения и исполнения требования к объектам технического регулирования (продукции, в том числе зданиям, строениям и сооружениям, процессам производства, эксплуатации, хранения, перевозки, реализации и утилизации), в отличие от ИСО, ГОСТ, ТУ и других стандартов, имеющих добровольное применение.

| № пп | Обозначение и наименование национального стандарта |
|------|---|
| 1. | ГОСТ Р ИСО 15189-2006. Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности |
| 2. | ГОСТ Р ИСО 15195-2006. Лабораторная медицина. Требования к лабораториям референтных измерений |
| 3. | ГОСТ Р ИСО 17511-2006. Изделия медицинские для диагностики in vitro. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам и контрольным материалам |
| 4. | ГОСТ Р ИСО 18153-2006. Изделия медицинские для диагностики in vitro. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений каталитической концентрации ферментов, приписанных калибраторам и контрольным материалам |
| 5. | ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003). Лаборатории медицинские. Требования безопасности |
| 6. | ГОСТ Р ИСО 15194-2007. Изделия медицинские для диагностики in vitro. Измерение величин в пробах биологического происхождения. Описание |

| | |
|-----|--|
| | стандартных образцов |
| 7. | ГОСТ Р ИСО 15193-2007. Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Измерение величин в пробах биологического происхождения. Описание референтных методик выполнения измерений |
| 8. | ГОСТ Р 53022.1-2008. Технологии лабораторные клинические – Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 1. Правила менеджмента качества клинических лабораторных исследований |
| 9. | ГОСТ Р 53022.2-2008. Технологии лабораторные клинические – Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 2. Оценка аналитической надежности методов исследования |
| 10. | ГОСТ Р 53022.3-2008. Технологии лабораторные клинические – Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. |
| 11. | ГОСТ Р 53022.4-2008. Технологии лабораторные клинические – Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила разработки требований к своевременности предоставления лабораторной информации |
| 12. | ГОСТ Р 53079.1-2008 Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Описание методов исследования |
| 13. | ГОСТ Р 53079.2-2008. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Руководство по качеству исследований в клинико-диагностической лаборатории. Типовая модель |
| 14. | ГОСТ Р 53079.3-2008. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила взаимодействия персонала клинических подразделений и клинико-диагностических лабораторий медицинских организаций при выполнении клинических лабораторных исследований |
| 15. | ГОСТ Р 53079.4-2008. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа |
| 16. | ГОСТ Р 53133.1-2008. Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клинико-диагностических лабораториях |
| 17. | ГОСТ Р 53133.2-2008 Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Правила |

| | |
|-----|---|
| | проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов |
| 18. | ГОСТ Р 53133.3-2008. Технологии лабораторные медицинские. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 3. Описание материалов для контроля качества клинических лабораторных исследований |
| 19. | ГОСТ Р 53133.4-2008. Технологии лабораторные медицинские. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила проведения клинического аудита эффективности лабораторного обеспечения деятельности медицинских организаций |
| 20. | ГОСТ Р ИСО 6710-2009. Контейнеры для сбора образцов венозной крови одноразовые. Технические требования и методы испытаний |
| 21. | ГОСТ Р ИСО 15189-2009. Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности |
| 22. | ГОСТ Р ИСО/ТО 22869-2009. Лаборатории медицинские. Руководство по внедрению ИСО 15189:2003 |
| 23. | ГОСТ Р ИСО 22870-2009. Исследования по месту лечения. Требования к качеству и компетентности |
| 24. | ГОСТ Р ИСО 15197-2009. Системы диагностические <i>in vitro</i> . Требования к системам мониторинга наблюдения за концентрацией глюкозы в крови для самоконтроля при лечении сахарного диабета |
| 25. | ГОСТ Р ИСО 17593-2009. Исследования лабораторные клинические и изделия медицинские <i>in vitro</i> . Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> , применяемые для самотестирования пероральной терапии антикоагулянтами |
| 26. | ГОСТ Р ИСО 15198-2009. Клиническая лабораторная медицина. Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Подтверждение методик контроля качества, рекомендуемых производителями пользователям |
| 27. | ГОСТ Р ЕН 592-2010. Инструкция по применению инструментов для диагностики <i>in vitro</i> для самотестирования |
| 28. | ГОСТ Р ЕН 12322-2010. Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Питательные среды для микробиологии. Критерии функциональных характеристик для питательных сред |
| 29. | ГОСТ Р ЕН 13532-2010. Общие требования к медицинским изделиям для диагностики <i>in vitro</i> для самотестирования |
| 30. | ГОСТ Р ЕН 13612-2010. Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики <i>in vitro</i> |
| 31. | ГОСТ Р ЕН 13640-2010. Исследование стабильности реагентов для диагностики |

| | |
|-----|---|
| | in vitro |
| 32. | ГОСТ Р ЕН 13641-2010. Устранение или снижение риска инфицирования, связанного с реагентами для диагностики in vitro |
| 33. | ГОСТ Р ЕН 14254-2010. Изделия медицинские для диагностики in vitro. Одноразовые емкости для сбора образцов у человека (кроме крови) |
| 34. | ГОСТ Р ИСО 20776.1-2010. Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы in vitro. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод лабораторного исследования активности антимикробных агентов против быстрорастущих аэробных бактерий, вызывающих инфекционные болезни |
| 35. | ГОСТ Р ИСО 20776.2. Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы in vitro. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 2. Оценка функциональных характеристик изделий для испытания антимикробной чувствительности |

Номенклатура лабораторных анализов

Номенклатура (лат. nomenclatura – роспись имен, перечень, список) – совокупность названий, употребляемых в какой-либо отрасли науки, производства и т.д. для обозначения объектов (в отличие от терминологии, содержащей также обозначения отвлеченных понятий и категорий).

Систематика (греч. systematikos – упорядоченный, относящийся к системе), область знания, в рамках которой решаются задачи упорядоченного определенным образом обозначения и описания всей совокупности объектов, образующих некоторую сферу реальности.

Приказ МЗ РФ № 64 от 21.07.2000 «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований»:

1. Химико-микроскопическое исследование биологических жидкостей.
2. Гематологические исследования.
3. Цитологические исследования.
4. Биохимические исследования.
5. Коагулологические исследования.

6. Иммунологические исследования.
7. Химико-токсикологические исследования.
8. Лекарственные средства для проведения терапевтического лекарственного мониторинга.
9. Микробиологические исследования.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Основные задачи применения лабораторного обследования.
2. Основные лабораторные методы исследования.
3. Структура и оснащение современных лабораторий.
4. Диагностическая специфичность теста.
5. Диагностическая чувствительность теста.
6. Виды клинико-диагностических лабораторий.
7. Вопросы стандартизации лабораторных исследований.
8. Понятие о ГОСТах, ОСТах, ТР.
9. Понятие о метрологии.
10. Номенклатура лабораторных анализов.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, основных задач лабораторного исследования.
2. Записать типы лабораторий, виды оборудования и лабораторных исследований, основные обязанности врача клинической лабораторной диагностики.
3. Записать директивные документы, регламентирующие работу клинико-диагностической лаборатории.

3. Тема занятия: Организация контроля качества лабораторных исследований.

Цель занятия: Ознакомление с принципами клинической биохимии, организацией контроля качества лабораторных исследований. Знать понятия скрининговое, профилактическое и дифференциально-диагностическое исследования, экспресс-диагностика, унификация биохимических методик.

Перечень знаний и практических навыков:

- Знать организацию контроля качества лабораторных исследований.
- Сформировать понятие о скрининговом, профилактическом и дифференциально-диагностическом исследовании, экспресс-диагностике.
- Уметь оценивать правильность ведения контроля качества в лаборатории.
- Уметь выбирать адекватные средства и методы контроля качества.

Правильную диагностическую информацию с помощью лабораторных исследований можно получить, зная нормальные величины данного лабораторного теста, пределы внутри- и межиндивидуальных колебаний и влияние на них различных факторов.

Источниками вариабельности показателей КЛД являются такие биологические факторы, как возраст, пол, масса и поверхность тела (особенно важны при обследовании детей); околосуточные месячные и сезонные ритмы; этническое происхождение; условия, в которых производится забор материала для анализа (положение тела, физическое напряжение, прием жидкости, курение, прием лекарств, стресс и др.), а также климатогеографические условия и экологическая обстановка в районе проживания больного.

Истинно нормальными (референтными) считают величины лабораторных показателей, установленные в группах тщательно обследованных здоровых лиц в возрасте 20 – 30 лет, а нормальными для контингента, отличающегося по каким-либо признакам (по полу, возрасту, профессии, месту обитания и т.д.), – величины этих показателей у здоровых лиц данного контингента. При этом в оценке отклонений величины какого-либо показателя учитывают и так называемую

индивидуальную норму – величину показателя у данного пациента, установленную ранее при профилактических и диспансерных обследованиях. Сравнивая обнаруживаемые у обследуемого результаты лабораторных исследований с нормальными для него и для соответствующего ему контингента, а также с референтными величинами, можно получить наиболее достоверное суждение о характере обнаруженного отклонения. Для оценки результатов единичного анализа необходимо знание пределов колебания показателей в норме с вычислением верхней и нижней границ с помощью статистических методов.

Контроль качества лабораторных исследований

Для выявления и оценки систематических и случайных погрешностей результатов измерений, производимых в лаборатории, осуществляют внутрилабораторный и межлабораторный контроль качества лабораторных исследований.

При этом используют ряд критериев качества:

- **Точность измерений** – близость результатов к истинному значению измеряемой величины. Высокая точность соответствует несущественным погрешностям, как при систематических, так и при случайных измерениях.

- **Погрешность измерения** – отклонение результата измерения от истинного значения измеряемой величины.

- **Систематическая погрешность измерения** – погрешность, остающаяся постоянной или закономерно изменяющаяся при повторных измерениях одной и той же величины.

- **Случайная погрешность измерения** – погрешность, изменяющаяся случайным образом при повторных измерениях одной и той же величины.

- **Правильность измерений** – отсутствие систематических погрешностей в результатах (для контроля правильности используется только материал с исследованным содержанием компонентов).

- **Прецизионность** – степень близости (или степень разброса) результатов для серии измерений, выполненных по данной методике на различных пробах одного и того же однородного образца. Прецизионность может рассматриваться

на трех уровнях: сходимость, внутрилабораторная прецизионность и воспроизводимость.

- **Сходимость результатов измерений** – отсутствие существенных различий между результатами измерений, выполняемых в одинаковых условиях (контроль сходимости и воспроизводимости результатов исследований может осуществляться с помощью контрольного материала с неисследованным содержанием).

- **Воспроизводимость результатов измерений** – отсутствие существенных различий между результатами измерений, выполняемых в отличающихся условиях (в различное время, в разных местах). Воспроизводимость результатов исследований характеризуется степенью их совпадения при многократном исследовании одной и той же пробы биологического материала. Воспроизводимость выражается величиной, обратной коэффициенту вариации результатов. Чем меньше коэффициент вариации, тем выше воспроизводимость. Контроль качества лабораторных исследований проводят путем сопоставления результатов измерений, производимых в лаборатории, с контрольным и определения величины отклонения.

Для контрольных измерений используют контрольные материалы: водные растворы стандартов, слитую сыворотку крови, приготавливаемую в самой лаборатории, биологический материал, изготовленный производственным путем как с исследованным, так и с неисследованным содержанием компонентов (сыворотка, плазма, клетки крови, моча, цереброспинальная жидкость и т.п.), материалы искусственного происхождения, специфические контрольные средства (мазки, микробиологические культуры, патогенные грибки, суспензии цист и т.п.).

Основными требованиями к контрольным материалам являются идентичность по физико-химическим свойствам анализируемому образцу; стабильность при длительном хранении; минимальная вариабельность состава и свойств внутри серии; пригодность для выявления систематических и случайных погрешностей. Контроль сходимости и воспроизводимости результатов исследований осуществляется с помощью контрольного материала с неисследованным содержанием; для контроля правильности используется только материал с исследованным содержанием компонентов.

Внутрилабораторный контроль включает контроль сходимости, воспроизводимости и правильности измерений.

Воспроизводимость считают достаточной, если величина коэффициента вариации результатов для исследований субстратов не превышает 5%, а для определения активности ферментов – 10%, что соответствует процентному выражению отношения примерно 1/8 пределов нормальных колебаний исследуемых параметров к средней величине нормы. Для оценки воспроизводимости результатов удобно использовать контрольные карты, на которых отмечают повседневные результаты контрольных исследований (рис. 1, 2, 3).



Рисунок 1



Рисунок 2



Рисунок 3

Для построения карты предварительно в течение 20 дней исследуют контрольный материал одной серии выпуска и результаты ежедневно регистрируют. Из полученных 20 результатов вычисляют среднюю величину и коэффициент вариации.

Если коэффициент вариации больше допустимого, проверяют весь ход анализа, устраняют причины неудовлетворительной воспроизводимости и повторяют предварительный этап. Контрольную карту строят для каждого контролируемого показателя и только для данной серии контрольного материала. Результаты ежедневного исследования контрольных проб той же серии в последующие дни наносят на карту в виде точки и используют для оценки воспроизводимости лабораторных исследований.

Контроль правильности результатов измерений проводят при условии хорошей их сходимости. Методами контроля могут быть сравнение результатов

собственных определений с номинальным значением контрольных материалов; сравнение результатов с результатами референтного метода; участие в межлабораторном эксперименте по контролю качества; дополнительное исследование пробы материала, к которой предварительно добавлено точное количество чистого вещества; исследования проб с различными концентрациями. Полученные результаты обрабатывают статистически.

Межлабораторный контроль – это сравнительный контроль качества результатов исследований, полученных в ряде лабораторий при использовании единого контрольного материала. Он включает контроль воспроизводимости и правильности, осуществляется не реже чем один раз в квартал под методическим руководством контрольных центров республиканского, краевого и областного уровней. Контрольные центры определяют цели, задачи и порядок проведения контрольного эксперимента, собирают и изучают результаты контрольных определений и вырабатывают рекомендации по улучшению качества работы лаборатории.

Важной предпосылкой преемственности ведения больных в различных лечебных учреждениях (в поликлинике, больнице, в разных городах и т. д.) является унификация диагностических методов лаб. диагностики на уровне страны. Внедрение в клиническую и лабораторную практику международной системы единиц помогло унифицировать результаты методов лаб. диагностики в разных странах мира.

Для правильного выбора метода КЛД и интерпретации полученных показателей необходимо знание возможностей каждого из методов, зависимости результатов анализа от условий взятия исследуемого материала, его транспортировки, а также от соблюдения правил выполнения анализов.

Надежность результатов зависит от качества применяемых лабораторией методов, приборов, реактивов, калибровочных материалов, от тщательности работы персонала. Если отклонение лабораторных показателей обусловлено патологией, то при повторных исследованиях в большинстве случаев выявляются повторяемость и направленность отклонений. Для некоторых форм патологии

характерны изменения нескольких лабораторных показателей, например, при острых воспалительных процессах одновременно могут изменяться количество лейкоцитов в крови, СОЭ, содержание ряда ферментов и др.

Некоторые лабораторные тесты специфичны для нарушений деятельности определенных органов или для определенного вида патологии (например, органоспецифические изоферменты, парапротеины при миеломной болезни); однако большая часть тестов дает результаты, которые имеют лишь вероятностный диагностический характер. Так, повышение СОЭ отмечается и при бактериальном воспалении, и при аутоиммунном процессе, и при опухоли. В оценке пригодности лабораторного теста для диагностики определенной формы патологии используют критерии диагностической специфичности, чувствительности, эффективности лабораторного теста и применяемого метода исследования. При этом учитывают частоту как истинных, так и ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

- Диагностическая чувствительность теста при определенной болезни представляет собой процентное выражение частоты только истинно положительных результатов теста у больных данной болезнью. Например, рассмотрим метод исследования, обладающий 90% чувствительностью. Если 100 человек, страдающих данным заболеванием, пройдут обследование с помощью этого метода, он позволит выявить заболевание у 90 из 100 пациентов. Остальные 10 обследуемых также страдают этим заболеванием, но метод исследования не может его выявить. Для этих 10% выявленные «нормальные» результаты исследования окажутся ложноотрицательными. Чувствительность методов исследования приобретает особенно большое значение в случаях, когда требуется исключить наличие особо опасного инфекционного заболевания. **Чем чувствительнее данный метод исследования, тем реже он дает "ложноотрицательные" результаты. Ложноотрицательными называют результаты, не позволяющие выявить имеющееся у пациентов заболевание.**

- Диагностическая специфичность теста при определенной болезни – процентное выражение частоты истинно отрицательных результатов теста у лиц,

не страдающих данной болезнью. Например, рассмотрим метод исследования, обладающий 90% специфичностью. Если этим методом обследовать 100 человек, не страдающих искомым заболеванием, только у 90 из этих 100 здоровых людей результаты исследования окажутся «нормальными» (свидетельствующими об отсутствии заболевания). У остальных 10 человек, также не страдающих заболеванием, результаты исследования будут показывать, будто оно имеется. Для этих 10% обследуемых такое «отклонение результатов исследования от нормы» на самом деле является ложно-положительным результатом. Специфичность особенно важна для исследований, используемых при подтверждении диагнозов, требующих применения тяжелых методов лечения. **Чем специфичнее данный метод исследования, тем реже он дает "ложно-положительные" результаты. Ложно-положительные результаты исследования могут привести к неправильному диагнозу и назначению ненужных и, возможно, ухудшающих качество жизни пациента диагностических и лечебных процедур.**

Диагностическая значимость положительных результатов выражается процентным отношением истинно положительных к общему числу положительных результатов, включающему также и ложноположительные. Диагностическая значимость отрицательных результатов представляет собой процентное отношение истинно отрицательных результатов к общему числу отрицательных результатов. Диагностическая эффективность теста выражается процентным отношением истинных (и положительных, и отрицательных) результатов теста к общему числу полученных результатов. В расчеты перечисленных характеристик лабораторного теста вводится поправка на частоту заболевания данной болезнью среди общего числа обследованных.

Виды лабораторных исследований

В зависимости от клинических задач лабораторные исследования могут производиться однократно и многократно (в динамике), а также в процессе проведения функциональных или фармакологических тестов со стимуляцией или торможением этапов исследуемого вида обмена веществ, клеточных или

гуморальных реакций либо других функций, выраженность или качество которых отражается в параметрах определяемого лабораторного показателя.

При массовых осмотрах населения, а также при первом контакте с больным в поликлинике или стационаре применяют многостороннее лабораторное обследование, которое не исключает целенаправленных исследований, проводимых при необходимости для уточнения диагноза.

Осуществляются также одномоментные массовые профилактические **скрининговые исследования** одного показателя, («screening» означает "просеивание"). Это профилактическое обследование крупных контингентов населения с помощью метода, обладающего высокой пропускной способностью, для выявления относительно небольшой группы повышенного риска, нуждающейся в дополнительном обследовании. Дообследование группы повышенного риска проводится методами, разрешающие способности которых позволяют осуществлять окончательную диагностику онкологического заболевания на ранних стадиях развития. Типичными примерами скрининговых методов являются анкетирование, флюорография, пальцевое исследование прямой кишки, пальпаторное исследование молочных желез, анализ кала на скрытую кровь, определение простатоспецифического антигена в крови, маркера СА15-3, выявления у детей генетической патологии (фенилкетонурии и других врожденных энзимопатий). Основные требования, предъявляемые к скрининговому методу: идеальный метод скрининга должен не только обладать высокими чувствительностью и специфичностью, но и быть безопасным, широко доступным и недорогим.

Экспресс-методы лабораторной диагностики – ускоренные методы лабораторных анализов, обеспечивающие проведение исследования в срок до 10 – 15 мин после получения материала. Экспресс-методы основаны на тех же или аналогичных химических реакциях, что и классические методы анализа. Широкое развитие экспресс-тестов стало возможным на основе достижений клинической биохимии и промышленного производства наборов сухих реактивов (экспресс-тесты) для определения различных ингредиентов крови, мочи и других биологических жидкостей.

Различают монотесты, т.е. сухие реактивы для определения в биожидкости какого-либо одного вещества, и политесты – комбинированные реактивные полоски, на которых имеется несколько индикаторных зон, предназначенных для исследования 5 и более биохимических параметров одновременно. Результаты анализа могут быть только качественными или позволяют определить концентрацию вещества в исследуемой жидкости, т.е. являются количественными. Наиболее распространены экспресс исследования мочи и крови. Использование таких тестов особенно ценно в отделениях интенсивной терапии и реанимации, где в процессе круглосуточного наблюдения за больным необходим частый контроль динамики ряда лабораторных показателей, отражающей состояние больного и эффективность проводимого лечения. Для проведения экспресс тестирования, как правило, не требуется сложной аппаратуры, поэтому их целесообразно использовать в приемных отделениях больниц, в амбулаторной практике, при посещении больных на дому врачом или средним медицинским персоналом. Они могут применяться специально проинструктированными больными в порядке самонаблюдения («карманная» лаборатория). С помощью экспресс-тестов проводят массовые (скрининговые) обследования и динамические наблюдения за лицами, нуждающимися в медицинском патронировании.

Основные разделы лабораторных исследований

Клиническая биохимия – один из наиболее обширных разделов лабораторной медицины, включающий исследования содержания органических и неорганических веществ, образующихся в процессе биохимических реакций, а также активности ферментов в сыворотке, плазме, крови, моче, ликворе и других биологических жидкостях. Современные приборы для биохимических исследований автоматически определяют одновременно до 20 – 30 показателей, используя несколько микролитов крови.

Клинико-лабораторная иммунология – раздел лабораторной медицины, обеспечивающий определение на основе комплекса показателей степени противoinфекционной и противоопухолевой защиты организма, а также

лабораторную диагностику и контроль эффективности терапии аллергических заболеваний.

Клиническая микробиология (бактериология, микология, вирусология)

Лабораторные микробиологические исследования проводятся для выявления возбудителей инфекционно-воспалительных процессов, определения их чувствительности к лекарственным препаратам и контроля эффективности лечения. В последние десятилетия в этой области достигнут большой прогресс благодаря широкому внедрению иммунологических и молекулярно-генетических методов, позволяющих с высокой точностью определять специфические поверхностные антигены и фрагменты ДНК вирусов, бактерий, грибов, простейших с помощью реакции иммунофлюоресценции (РИФ), иммуноферментного анализа (ИФА), полимеразной цепной реакции (ПЦР), ДНК-зондов. Это дает возможность точно определять возбудителей, которые с помощью культуральных и серологических методов выявлены быть не могут.

Цитология (эксфолиативная и пункционная)

Цитологическая диагностика заключается в изучении строения и выявлении патологических изменений в структуре клеток, полученных из экссудатов, синовиальной и спинномозговой жидкости, с поверхности слизистых оболочек, а также из тканей и органов при их пункционной биопсии. Пункционная цитология является основным методом дооперационной и операционной диагностики доброкачественных и злокачественных новообразований. Современные методы автоматизированной цитофотометрии, гистохимии, радиоизотопного исследования делают цитологический анализ оперативным и точным.

Клиническая молекулярная биология и диагностическая генетика

Исследует генетический материал – хромосомы, гены, нуклеиновые кислоты для выявления разных типов мутаций, лежащих в основе наследственных заболеваний и пороков развития. Современные методы ДНК-диагностики – гибридизационный анализ, амплификация геномов, полимеразная цепная реакция, ДНК-зонды и другие незаменимы в пренатальной диагностике, а также широко используются для определения вирусов и бактерий.

Клиническая токсикология

Обеспечивает лабораторную диагностику острых и хронических отравлений, вызванных органическими и неорганическими веществами, лекарственными препаратами и т.д. Высокая степень загрязнения окружающей среды, производства с вредными условиями, техногенные аварии и многие другие факторы определяют современную значимость этой области медицины.

Клинико-лабораторная паразитология

Выявляет и идентифицирует возбудителей паразитарных заболеваний – насекомых, гельминтов, простейших. Такие заболевания имеют определенные территориальные и социальные особенности распространения, но в связи с высокой миграционной активностью населения у людей появляются паразитарные заболевания, не характерные для мест постоянного проживания, поэтому лабораторная паразитология в настоящее время сохраняет высокую актуальность и значимость.

Лабораторный контроль (мониторинг) лекарственной терапии

Используя комплекс биохимических, физико-химических, цитологических и других методов осуществляет контроль соотношения дозы и эффекта лекарственных препаратов, их индивидуальной фармакокинетикой. Такой лабораторный контроль распространен еще недостаточно широко, хотя необходим и эффективен при лекарственной терапии опухолей, неотложных состояний, длительных хронических заболеваниях и т.д. Современные автоматизированные системы регистрации обеспечивают высокую скорость и точность анализов.

Клинические анализы крови

Когда говорят об анализах крови, всегда нужно иметь в виду, что собственно кровь является только частью системы, включающей в себя еще органы кроветворения (костный мозг, селезенка, лимфотические узлы, печень) и кроверазрушения (селезенка, ткани). Все звенья в этой системе взаимосвязаны и взаимозависимы.

Костный мозг является органом, в котором рождаются и созревают клетки крови. Через определенное время клетки поступают в кровеносное русло, в котором

эритроциты живут около 120 суток, тромбоциты – 10, а нейтрофилы всего около 10 часов. Причем, если эритроциты и тромбоциты функционируют в кровеносном русле, то гранулоциты (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы) и макрофаги – еще и в тканях.

Подсчет количества клеточных элементов, который может производиться, как в ручную, с помощью микроскопа, так и автоматически, позволяет определить функциональное состояние костного мозга, диагностировать целый ряд заболеваний, связанных с нарушением его деятельности.

Кроме того, определяя количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов и других элементов, концентрацию гемоглобина и скорость оседания эритроцитов (СОЭ), можно выявить наличие воспалительного заболевания (пневмонии, ревматизма, полиартрита, туберкулеза и др.).

Исследования свертывающей системы крови

Кровь – уникальная жидкая ткань, обладающая не только текучестью, но и способностью свертываться (коагулировать), то есть сгущаться и образовывать плотные сгустки (тромбы). Свойство текучести предотвращает слипание клеток, и они легко перемещаются по всем сосудам, включая самые тонкие – капилляры. Благодаря свертывающей способности при повреждении мелких и средних сосудов кровотечение через некоторое время самостоятельно останавливается, так как брешь в сосуде закрывается тромбом. Как текучесть, так и свертываемость крови обеспечивается многими веществами и клетками, которые, взаимодействуя между собой, образуют систему гемостаза.

Расстройства гемостаза могут быть причинами самостоятельных заболеваний, но чаще всего они играют очень серьезную роль в течении, а иногда и в исходе других заболеваний, в первую очередь, травм, хирургических вмешательств, сердечно-сосудистых заболеваний, обширных воспалений, родов. Поэтому определение показателей свертывающей системы крови (гемостаза) является очень информативным для оценки состояния, прогноза и эффективной терапии многих острых и хронических заболеваний.

Исследования эндокринной системы

Железы внутренней секреции или эндокринные железы – гипофиз, эпифиз, щитовидная и паращитовидные железы, надпочечники, поджелудочная железа, мужские и женские половые железы – получили свое название в связи с тем, что выделяют синтезируемые ими вещества – гормоны – непосредственно в кровь. Это обеспечивается очень развитой сосудистой сетью желез.

Продукция гормонов находится под контролем нервной системы, которая через гипоталамус осуществляет регуляцию синтеза гормонов в гипофизе. Гормоны периферических желез, в частности мозгового слоя надпочечников, в свою очередь, контролируют секрецию гипоталамических гормонов. Благодаря такому тесному взаимному влиянию и контролю железы внутренней секреции образуют единую эндокринную систему. Поэтому повышение или снижение содержания гормона в организме может возникать не только из-за изменений в самой железе (опухоль, атрофия, склероз и др.), но и в результате нарушения регуляции со стороны других систем.

Получить информацию об активности эндокринной железы можно путем непосредственного определения уровня соответствующего гормона, промежуточных продуктов его синтеза или превращения, а, также, определяя биохимические, физиологические и другие параметры процессов, на которые влияет тот или иной гормон.

Исследования функции почек

Почки участвуют в удалении конечных продуктов обмена веществ, чужеродных и ядовитых веществ, поступающих в организм из внешней среды, поддерживают постоянство в крови осмотически активных веществ, кислотно-щелочное равновесие, участвуют в регуляции водного баланса, продуцируют вещества, регулирующие артериальное давление, эритропоэз и т.д. В конечном итоге, основная функция почек – образование мочи.

Пробы, используемые для изучения функции почек, в одних случаях позволяют оценивать их способность концентрировать мочу и выводить воду, в других – характеризовать отдельные процессы, связанные с мочеобразованием (функцию клубочков, извитых канальцев, исследовать почечный кровоток и т.д.).

Исследования функции печени

Печень занимает центральное место в процессах обмена веществ организме человека. Большое количество крови, проходящее через печень, позволяет этому органу выделять в кровоток и извлекать из него многие биологические вещества. Выделение желчи – лишь одна из функций печени.

Печень участвует в синтезе белков, углеводов, жиров, в пигментном обмене, образовании мочевины, креатина и целого ряда других соединений. Велика роль печени в обезвреживании различных токсических веществ путем образования безвредных комплексов, удаляемых из организма через почки.

Маркеры опухолей

Маркеры опухолей – белки с углеводными или липидными компонентами, которые выявляются в опухолевых клетках или сыворотке крови, являются показателем злокачественного процесса в организме. Эти белки обладают равной степенью специфичности – одни могут появляться при нескольких видах опухолей разной локализации, другие – только при каком-то одном определенной злокачественном новообразовании. Опухолевые маркеры используются для контроля течения заболевания и эффективности проводимой химиотерапии, хирургического и биологического лечения.

В соответствии с Государственным стандартом, во всех отраслях науки и техники, в том числе и в медицине, обязательным является применение единиц Международной системы единиц (СИ). Единицей объема в СИ является кубический метр (м³). Для удобства в медицине допускается применять единицу объема литр (л; 1 л = 0,001 м³).

Единицей количества вещества, содержащего столько же структурных элементов, сколько содержится атомов в нуклиде углерода ¹²C массой 0,012 кг, является моль, т. е. моль – это количество вещества в граммах, число которых равно молекулярной массе этого вещества.

Количество молей соответствует массе вещества в граммах, деленному на относительную молекулярную массу вещества. 1 моль = 10³ ммоль = 10⁶

мкмоль = 10^9 нмоль = 10^{12} пмоль. Содержание большинства веществ в крови выражается в миллимолях на литр (ммоль/л).

Только для показателей, молекулярная масса которых неизвестна или не может быть измерена, поскольку лишена физического смысла (общий белок, общие липиды и т. п.), в качестве единицы измерения используют массовую концентрацию – грамм на литр (г/л).

Активность ферментов в единицах СИ выражается в количествах молей продукта (субстрата), образующихся (превращающихся) в 1 с в 1 л раствора – моль/(с-л), мкмоль/(с-л), нмоль/(с-л).

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Организация контроля качества лабораторных исследований.
2. Референтные величины и средний показатель.
3. Скрининговое, профилактическое и дифференциально-диагностическое исследования. Экспресс-диагностика.
4. Основные единицы СИ в биохимии.
5. Средства контроля качества. Методы контроля качества (контроль воспроизводимости, контроль правильности). Внешняя оценка качества.
6. Основные статистические критерии в контроле качества лабораторных исследований.
7. Унификация биохимических методик.
8. Критерии унификации: аналитические, технико-экономические, диагностическая ценность. Стандартизация исследований.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, видов контроля качества.
2. Записать стадии внутрилабораторного контроля качества и их особенности, критерии качества лабораторных исследований.
3. Записать характерные черты внешней оценки качества.

4. Тема занятия: Получение и подготовка биологического материала для исследований.

Цель занятия: Знакомство со способами получения и подготовки биологического материала для исследования.

Перечень знаний и практических навыков:

- Знать способы забора биологического материала.
- Ознакомиться с правилами хранения, маркировки и транспортировки биологического материала.
- Изучение методов фиксации и окраски мазков.
- Уметь микроскопически дифференцировать способы окраски мазков.

Условия взятия материала для клинических лабораторных исследований

Наиболее распространенным материалом для лабораторных исследований является кровь, моча и некоторые другие биологические жидкости.

Взятие материала для лабораторных исследований должно проводиться **до принятия обследуемым пищи (натошак)**. Последний прием пищи за 8–12 часов (12 часов для исследований липидного спектра) до взятия. Исключением из этого правила являются исследования, которые проводятся при неотложных состояниях, в любое время, но с учетом этого фактора.

Время взятия с 7 до 9 ч утра при плановых исследованиях и в любое время для срочных случаев диагностики (неотложные состояния). Не допустим забор крови для плановых биохимических исследований накануне вечером.

Лекарственные средства существенно влияют на результаты лабораторных исследований различным образом. Поэтому при подготовке обследуемых к проведению лабораторных исследований приняты следующие подходы:

- лекарственные средства, мешающие определению компонентов, исключаются до взятия биоматериала, если они даются не по жизненным показаниям;

- утренний прием лекарственных средств проводится только после взятия биоматериала;

- взятие крови с диагностической целью проводится перед проведением инфузии лекарственных средств и растворов.

Взятие биоматериала осуществляется **до проведения диагностических или лечебных процедур:** операций, инфузий, переливаний крови, растворов, пункций, инъекций, биопсий, общего массажа тела, эндоскопии, физических нагрузок, выполнения ЭКГ, рентгеновского обследования.

Во время проведения глюкозотолерантного теста (тест с нагрузкой глюкозой) не должно проводиться никаких других манипуляций, в том числе диагностических.

Значительная физическая и мышечная нагрузка должны быть исключены как минимум за 3 дня до взятия биоматериала.

Для исключения **влияния изменения положения тела** обследуемый должен находиться в покое, сидеть или лежать не менее 5 мин в связи с изменением концентрации ряда компонентов при переходе пациента из горизонтального в вертикальное положение. Особенно это важно при исследовании показателей кислотно-основного равновесия и активности ферментов. Предпочтительно, за исключением тяжелобольных, кровь у пациентов должна забираться в положении сидя.

При динамическом наблюдении за пациентом взятие материала нужно проводить в идентичном положении тела.

При гормональных исследованиях у женщин репродуктивного возраста (примерно с 12 – 13 лет и до наступления климактерического периода) на результаты влияют физиологические факторы, связанные со стадией менструального цикла. Поэтому при подготовке к обследованию на гормоны ФСГ (фолликулостимулирующего гормона), ЛГ (лютеинизирующего гормона), пролактин, эстриол, эстрадиол, прогестерон следует указать фазу цикла. При проведении исследования на половые гормоны нужно строго придерживаться рекомендаций

лечащего врача о дне менструального цикла, в который необходимо сдать кровь (на ФСГ, ЛГ, эстрадиол, тестостерон на 6 – 7 день менструального цикла).

При контроле лабораторных показателей в динамике рекомендуется проводить повторные исследования в одинаковых условиях – в одной лаборатории, сдавать кровь в одинаковое время суток и пр.

Получение крови для клинических лабораторных исследований

1. Нативная венозная кровь, взятая из крупных вен (чаще из локтевой) без применения антикоагулянтов.

2. Венозная кровь с добавлением антикоагулянтов.

3. Капиллярная кровь из пальца для определения глюкозы, общего анализа крови (ОАК) и других компонентов.

4. Артериальная кровь, взятая из крупных артерий (чаще бедренной или подключичной) – для определения газов крови.

Венозная кровь

Использование венозной крови для биохимических исследований наиболее предпочтительно.

В настоящее время взятие венозной крови осуществляется одноразовым шприцем с толстой иглой в стеклянную или пластиковую пробирку или вакуумными системами промышленного производства, например, Вакутайнером. В зависимости от того, какой материал необходимо получить (сыворотку или плазму), кровь собирают в чистые сухие центрифужные пробирки без добавок (для получения сыворотки), либо с добавлением антикоагулянтов (для получения плазмы).

Капиллярная кровь

Капиллярная кровь чаще всего используется для определения глюкозы или общего анализа крови. Для взятия пробы капиллярной крови используют стерильные скарификаторы-копья одноразового применения или лазерные перфораторы. Между объемом получаемой крови и глубиной прокола имеется прямая зависимость. В связи с этим скарификатор должен выбираться в зависимости от места прокола и количества крови, необходимого для выполнения различных исследований с лезвиями разных размеров.

Свернувшаяся и гемолизированная пробы не подлежат исследованию. Количество собираемой крови зависит от количества назначенных анализов и требуемых для них объемов биоматериала. Для биохимии хотя бы 6 мл, для коагулограммы – 4,5 мл.

Основные химические добавки, используемые при взятии крови на анализ:

Этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) – антикоагулянт, который предохраняет кровь от свертывания, связывая и эффективно удаляя ионы кальция, присутствующие в плазме (кальций необходим для свертывания крови). ЭДТА также защищает клетки крови от разрушения. Добавляют в пробирки для сбора крови с целью полного подсчета клеток крови и выполнения некоторых других гематологических тестов.

Гепарин (в виде натриевой или калиевой соли этой кислоты, т. е. натрий гепарина или калий гепарина) – антикоагулянт, который предохраняет кровь от свертывания, ингибируя превращение протромбина в тромбин. Добавляют в пробирки для сбора крови с целью проведения биохимических исследований, для которых необходима плазма. Антикоагулянтные свойства гепарина используются в терапии.

Цитрат (в виде натриевой соли, т. е. цитрата натрия) – антикоагулянт, который предохраняет кровь от свертывания, связывая ионы кальция (подобно ЭДТА). Добавляют в пробирки для сбора крови с целью изучения процессов свертывания.

Оксалат (в виде натриевой или аммонийной соли, т. е. оксалата натрия или аммония) – антикоагулянт, который предохраняет кровь от свертывания, связывая ионы кальция (подобно ЭДТА). Используют вместе с фторидом натрия для определения содержания глюкозы в крови.

Фторид натрия – это ферментный яд, который прекращает метаболизацию глюкозы в крови после ее сбора, т. е. сохраняет ее концентрацию. Используется вместе с оксалатом аммония специально для определения содержания глюкозы в крови.

Сыворотка

Сыворотку получают из спонтанно свернувшейся цельной крови путем центрифугирования (1000 – 1200 об в течение 10 – 15 минут). Она не содержит

факторов свертывания крови. Центрифугирование свернувшейся крови с целью получения сыворотки следует выполнять, только убедившись в том, что кровь полностью свернулась (в нормальных условиях кровь свертывается около 30 минут). Сыворотку используют для проведения биохимических, иммунологических исследований.

Плазма

Плазма получается из крови путем отделения клеток крови. В противоположность сыворотке она содержит факторы свертывания крови, т.е. является бесклеточной надосадочной жидкостью, получаемой при центрифугировании крови, свертываемость которой ингибирована добавлением антикоагулянтов. После этого полученную плазму (верхняя фаза) отобрать индивидуальным наконечником с фильтром (аэрозольным барьером) в количестве не менее 1 мл в сухую стерильную пластиковую пробирку типа Эппендорф. Плазму используют для исследования системы гемостаза.

Время от момента забора проб до их доставки в лабораторию должно составлять не более 6 часов при комнатной температуре (18 – 25°C) и не более 24 часов при температуре – 2 – 8°C (при доставке проб в лабораторию в специальных термоконтейнерах с хладогеном, термосах с термопакетами). При транспортировке пробирки с образцами должны находиться строго в вертикальном положении. Замораживание проб цельной крови с антикоагулянтом недопустимо.

Получение мочи для клинических лабораторных исследований

Сбор мочи проводится после тщательного туалета наружных половых органов, чтобы в мочу не попали выделения из них.

Моча, собранная для анализа, может храниться не более 1,5 – 2 часов (обязательно на холоде). Длительное стояние ведет к изменению физических свойств, размножению бактерий и разрушению элементов осадка мочи. При этом рН мочи будет сдвигаться к более высоким значениям из-за аммиака, выделяемого в мочу бактериями. Микроорганизмы потребляют глюкозу, поэтому при глюкозурии можно получить отрицательные или заниженные результаты.

Желчные пигменты разрушаются при дневном свете. Наиболее приемлемый способ сохранения мочи – охлаждение (можно хранить в холодильнике, но не доводить до замерзания). При охлаждении не разрушаются форменные элементы, но возможно влияние на результаты определения относительной плотности.

Далее сбор мочи, в зависимости от вида исследования, имеет свои особенности.

1. Для проведения **общего анализа мочи** собирают только утреннюю мочу, взятую в середине мочеиспускания, так как она более концентрированная и с ней вымываются патологические элементы, скопившиеся в почках и в мочевыводящих путях за ночь.

2. Для проведения *пробы по Зимницкому* (оценка концентрационной способности почек) за сутки собирают 8 порций мочи. Условием правильного проведения пробы, является исключение избыточного потребления воды. Необходимо предупредить больного о том, что желательно, чтобы количество принимаемой жидкости в день сбора мочи не превышало 1 – 1,5 л. В остальном пациент остается в обычных условиях, принимает обычную пищу, но учитывает количество выпиваемой за сутки жидкости.

Заранее необходимо подготовить 8 чистых сухих банок для сбора мочи. Каждую банку подписывают, указывая фамилию и инициалы пациента, отделение, дату и время сбора мочи.

- 1-я банка – с 6 до 9 часов,
- 2-я – с 9 до 12 часов,
- 3-я – с 12 до 15 часов,
- 4-я – с 15 до 18 часов,
- 5-я – с 18 до 21 часа,
- 6-я – с 21 до 24 часов,
- 7-я – с 24 до 3 часов,
- 8-я – с 3 до 6 часов.

Собирают за сутки 8 порций мочи. В 6 часов утра больной опорожняет мочевой пузырь (эта порция выливается). Затем, начиная с 9 часов утра, точно

каждые 3 часа собирают 8 порций мочи в отдельные банки (до 6 часов утра следующего дня). Все порции доставляют в лабораторию. Вместе с мочой доставляют сведения о количестве принятой за сутки жидкости.

3. Для определения количества форменных элементов в 1 мл мочи по **методу Нечипоренко** (выявление скрытого воспалительного процесса) собирается средняя порция первой утренней мочи – не более 15 – 20 мл.

4. **Двухстаканная проба** чаще используется в урологии у женщин. Мочу при мочеиспускании делят на две части. Важно, чтобы первая порция в этом случае была небольшой по объему. Посуду также готовят предварительно и указывают номер порции на каждом сосуде.

5. **Сбор суточной мочи.** Пациент собирает мочу в течение 24 часов, соблюдая обычный питьевой режим (1,5 – 2 л в сутки). Утром в 6 – 8 часов он опорожняет мочевой пузырь и отмечает время (эту порцию мочи выливают), а затем в течение суток собирают всю мочу в чистый широкогорлый сосуд емкостью не менее 2 л, с плотно закрывающейся крышкой. Последняя порция берется точно в то же время, когда накануне был начат сбор (время начала и конца сбора отмечают). Если не вся моча направляется в лабораторию, то количество суточной мочи измеряют мерным цилиндром, отливают часть в чистую посуду, в которой ее доставляют в лабораторию, и обязательно указывают объем суточной мочи.

6. Порядок подготовки для проведения исследования на пробу Реберга (оценка секреторной и экскреторной функции почек):

1. Утром помочиться в туалет.
2. Выпить 300 – 400 мл жидкости.
3. Через 10 – 15 минут помочиться в туалет.
4. Лечь в постель и через 60 и через 120 минут помочиться в отдельную посуду (2раза)
5. Измерить объем мочи.
6. В промежутке между опорожнением мочевого пузыря взять кровь для исследования на креатинин.

Доставить в лабораторию и провести исследование в тот же день.

7. 3-стаканная проба. Используется для установления уровня гематурии и источника лейкоцитурии. Пробу проводят только в утренние часы без предварительного туалета наружных половых органов. Без перерывов в акте мочеиспускания больной собирает мочу в 2 сосуда, не опорожняя полностью мочевого пузыря. Затем после массажа простаты в 3-ий сосуд собирается 3-я порция мочи.

Помимо общеклинических, биохимических и коагулологических исследований, в лаборатории производят исследование материала, полученного из уrogenитального тракта, мокроты, слюны, а также биопсийным и пункционным путем. Данный материал исследуют как микроскопически, оценивая микрофлору, наличие признаков воспаления, цитологические особенности, так и генетически, выявляя возбудителей инфекций.

Соскоб эпителиальных клеток из уrogenитального тракта женщины

Соскобы производят из трех точек тремя разными зондами: цервикальный канал, задний свод влагалища, уретра – в одну пробирку, поочередно ополаскивая каждый зонд. При необходимости берут материал из эрозивно-язвенных поражений. Отделяемое забирают в небольшом количестве. Присутствие примесей (слизь, кровь, гной) недопустимо, т. к. приводит к деградации исследуемых микроорганизмов.

Ни в коем случае нельзя смачивать в пробирках типа «Эппендорф» зонды перед забором отделяемого, т. к. они заполнены или содержат транспортную среду (может вызвать зуд, раздражение, ожог)!

Для получения мазков уrogenитального тракта наносят материал зондом на предметное стекло и подсушивают на воздухе.

Время от момента забора клинического материала до его доставки в лабораторию должно составлять не более 2 суток для охлажденных и замороженных проб.

Хранение клинического материала: при комнатной температуре – в течение 2 суток, при температуре – 2 – 8 °С – в течение 2 недель.

Соскоб эпителиальных клеток из уретры мужчин

Перед взятием соскоба из уретры необходимо воздержаться от мочеиспускания в течение не менее двух часов. При наличии свободно стекающих из уретры выделений удаляют их сухим зондом (после чего его выкидывают). Вводят зонд в уретру на глубину 3 – 4 см несколькими вращательными движениями производят соскоб эпителиальных клеток и переносят зонд в пробирку типа «Эппендорф» с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда в транспортную среду, вращают зонд в течение 10 – 15 сек., избегая разбрызгивания раствора. Вынимают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки. Отжав избыток жидкости, удаляют зонд и закрывают пробирку. Присутствие примесей (слизь, кровь, гной) недопустимо, т. к. приводит к деградации исследуемых микроорганизмов. В процедурном кабинете должен быть запас стерильных зондов (либо тампонов) для удаления слизи. Шпатель гинекологический входит в гинекологический набор.

Для получения мазка, вынув зонд из уретры, наносят мазок такими же вращательными движениями в обратном направлении (против часовой стрелки) на всю поверхность предметного стекла тонким слоем.

Взятие спермы

Взятие спермы осуществляют в стерильный одноразовый флакон. Для анализа спермограммы каплю исследуемого материала наносят на предметное стекло и накрывают покровным стеклом. Анализируют нативный препарат в темном поле.

Время от момента забора образцов секрета простаты и спермы до их доставки в лабораторию должно составлять не более 1 суток для охлажденных проб. Хранение образцов секрета простаты и спермы: при комнатной температуре – в течение 6 часов, при температуре – 2 – 8°С – в течение 1 суток.

Взятие мокроты

Взятие мокроты осуществляют утром натощак после гигиены полости рта при глубоком откашливании в количестве не менее 0,5 мл в стерильный одноразовый флакон с широким горлом, завинчивающейся крышкой, объемом не менее 50 мл.

Взятие биопсийного материала

Взятие материала осуществляют из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, из поврежденной ткани или из пограничного с повреждением участка. Материал помещают в одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл, содержащие 0,5 мл транспортной среды. Возможно приготовление препарата сразу после взятия материала (мазки-отпечатки, распределение материала по предметному стеклу).

Время от момента забора клинического материала до его доставки в лабораторию должно составлять не более 2 часов при комнатной температуре и не более 1 суток для охлажденных проб.

Взятие спинномозговой жидкости (ликвор)

Взятие ликвора производится только врачом в условиях стационара. Ликвор получают путем прокола поясничной, субоктиципитальной области или мозговых желудочков одноразовыми пункционными иглами.

Время от момента забора клинического материала до его доставки в лабораторию должно составлять: не более 4 часов при комнатной температуре и не более 1 суток для охлажденных проб.

Взятие слюны

Перед взятием материала следует провести тщательную гигиену полости рта (почистить зубы, прополоскать рот водой до полного удаления зубной пасты) через 30 минут можно начинать сбор слюны в стерильную емкость. Забор слюны можно производить в течение дня. Время от момента забора клинического материала до его доставки в лабораторию должно составлять не более 4 часов при комнатной температуре и не более 1 суток для охлажденных проб.

Приготовление, фиксация и окраска мазков крови

Подготовка стекол

С предметных стекол, бывших в употреблении и соприкасавшихся с иммерсионным маслом, последнее удаляют сухой тряпкой или бензином. Затем стекла кипятят без мыла и соды в течение 15 – 20 мин, промывают чистой водой и

погружают на 1 ч в насыщенный раствор двуххромовокислого калия в серной кислоте. Обработанные таким образом стекла промывают в течение не менее 1 ч под струей водопроводной воды и насухо вытирают чистым полотенцем.

При отсутствии двуххромовокислого калия и серной кислоты стекла, бывшие в употреблении кладут в мыльный раствор и выдерживают в нем 8–10 ч, а затем в том же растворе кипятят их 5–10 мин. От более длительного кипячения стекла делаются мутными. После кипячения стекла вынимают и тщательно промывают под струей водопроводной воды, а затем насухо вытирают.

Стекла, не бывшие в употреблении, промывают в горячей воде и насухо вытирают.

Приготовление мазка крови

Мазки крови делают на предметных стеклах с помощью более узкого шлифованного предметного стекла.

Взяв предметное стекло за длинные края, прикасаются его поверхностью (отступя 0,5–1 см от узкого края) к капле крови (но не к коже). Предметное стекло держат на столе или в левой руке за узкие края. Правой рукой приставляют шлифованное стекло узким краем к стеклу с кровью слева от капли под углом 45° и продвигают его вправо до соприкосновения с кровью.

Выжидают, пока кровь расплывется по всему ребру шлифованного стекла, и затем легким быстрым движением ведут его справа налево до тех пор, пока не будет исчерпана вся капля. Капля крови должна быть небольшой (не более 10 мкл) и соразмерена так, чтобы весь мазок помещался на стекле, не доходя 1–1,5 см до его края. Нельзя прекращать размазывание и отнимать стекло раньше, чем капля будет исчерпана. Нельзя также сильно нажимать на стекло, так как многие клетки могут оказаться поврежденными. Хорошо сделанный мазок тонок, имеет желтоватый цвет и оканчивается «метелочкой».

Густо-розовые и красноватые мазки непригодны для счета, так как они слишком толсты и клеточные элементы при этом дифференцировать невозможно. После приготовления мазки быстро сушат на воздухе до

исчезновения влажного блеска. При медленном высыхании может изменяться морфология клеток.

На высушенном мазке уголком предметного стекла или карандашом (только не химическим) пишут фамилию, инициалы больного, дату. При необходимости переслать мазок с консультационной целью в другой город мазок рекомендуется делать на хорошо отмытой использованной рентгеновской пленке, нарезанной по размеру предметного стекла. Такие мазки можно пересылать в письмах.

Симптом крошковатости мазка крови

При заболеваниях, протекающих с повышенным содержанием фибриногена в крови, мазок, сделанный на предметном стекле, имеет крошковатый характер. На этот простой, и доступный признак рекомендуется обратить особое внимание при взятии крови.

Фиксация мазков

После высыхания производится обработка мазков фиксирующими жидкостями, придающими форменным элементам стойкость по отношению к содержащейся в красках воде, которая без фиксации мазков гемолизует эритроциты и изменяет строение лейкоцитов. Кроме того, фиксация, вызывая коагуляцию белка, прикрепляет препарат к стеклу. Лучшим фиксатором является метиловый спирт.

Препараты в специальных штативах опускают в раствор фиксатора. В метиловом спирте мазки выдерживают не менее 5 мин, а в этиловом и денатурированном спирте и смеси Никифорова – не менее 30 мин.

По окончании срока фиксации препараты вынимают, сушат на воздухе или ополаскивают в банке с нейтрализованной дистиллированной водой и укладывают мазками кверху на стеклянный мостик для окраски.

Окраска мазков

Краску следует готовить на воде нейтральной реакции.

Все предложенные методы окраски мазков основаны главным образом на химическом сродстве основных частей клеток к определенным анилиновым краскам и в меньшей степени на их физических свойствах. Цитоплазма одних

клеток, будучи щелочной, имеет сродство к кислым краскам, выявляя оксифильные элементы крови. Цитоплазма других клеток, содержащих базофильные и нейтрофильные субстанции, поглощает и кислые, и основные краски. Ядра, содержащие в значительном количестве нуклеиновую кислоту, связывают главным образом основные краски.

К основным гематологическим краскам относятся метиленовый синий и его производные – азур I (метиленазур) и азур II (смесь равных частей азура I и метиленового синего), к кислым – водорастворимый желтый эозин.

Азур-эозиновые смеси красок обладают высокой чувствительностью к реакции воды и поэтому применяемая для приготовления красителей и для смывания их дистиллированная вода должна иметь нейтральную реакцию, т.е. рН 7,0. При кислой реакции воды клетки долго не прокрашиваются и имеют красный оттенок. При щелочной реакции эритроциты окрашиваются в серовато-синий цвет, а ядра и цитоплазма клеток – в очень темные цвета.

Окраска по Романовскому

Окрашивание различных элементов клеток в разные цвета и оттенки смесью основных (азур II) и кислых (водорастворимый желтый эозин) красок.

В продаже имеется готовый раствор краски Романовского, а также сухая краска Романовского (Гимзы), из которой готовят раствор.

Раствор оставляют на 3 – 5 сут, часто взбалтывая для лучшего растворения краски. Затем прибавляют 250 мл чистого глицерина и вновь оставляют на 3 – 5 сут, периодически взбалтывая. Приготовленная таким образом краска хорошо сохраняется длительное время в темных бутылках в шкафу, где нет ни кислот, ни щелочей.

Вновь полученный или приготовленный раствор красителя Романовского перед употреблением оттитровывают, т. е. окрашивают несколько фиксированных мазков крови в течение 25 – 40 мин различно разведенной краской (1 – 2 капли краски на 1 мл дистиллированной воды). По хорошо окрашенному препарату устанавливают нужное количество капель краски на 1 мл воды и время окрашивания.

Фиксированные мазки укладывают на мостик, состоящий из двух стеклянных палочек, уложенных на два противоположных края кюветы.

Затем мазки заливают разведенной краской, которую наливают на мазок возможно более высоким слоем. Окрашивание длится в зависимости от температуры воздуха в помещении от 25 до 45 мин.

Если температура в помещении низкая или требуется быстрее окрасить мазки, то разведенную краску можно подогреть до 60 – 70°C (до кипения доводить нельзя).

После окончания окраски краску смывают (но не сливают) сильной струей воды и ставят мазки вертикально в штатив для просушивания. Разведенной краской можно пользоваться только в течение одного дня.

Окраска по Паппенгейму – Крюкову

Это комбинированная окраска фиксатором-красителем Мая-Грюнвальда и краской Романовского, дающая возможность очень хорошо дифференцировать составные части клеток.

При отсутствии готового красителя-фиксатора Мая-Грюнвальда его можно приготовить растворением 0,3 – 0,5 г сухой краски Мая-Грюнвальда в 100 мл чистого метилового спирта с добавлением (или без него) 50 мл чистого глицерина. Краситель в обоих случаях созревает 4 дня при комнатной температуре.

На нефиксированный мазок наливают пипеткой 10 – 15 капель готового красителя-фиксатора Мая-Грюнвальда, через 3 мин прибавляют по каплям столько же воды и продолжают окрашивание еще 1 мин, после чего краситель смывают водой и мазок высушивают на воздухе.

Затем на высушенный мазок наливают свежеприготовленный водный раствор красителя Романовского на 8 – 15 мин в зависимости от температуры в помещении, смывают краску водой и мазок высушивают на воздухе. Этот способ окраски является наилучшим.

Приготовление и окраска толстой капли

В данной технологии используется большой объем крови с целью улучшения условий обнаружения в крови малярийных плазмодиев, спирохет возвратного тифа, эозинофилов и полихроматофилов.

Приготавливают обычный мазок крови и на толстые места его наносят отдельно две большие капли крови. Каждую каплю концом иглы или углом другого стекла размазывают до величины двух- или трехкопеечной монеты и сушат на воздухе.

Мазок до нанесения толстых капель и после не фиксируют, а наливают на него на несколько минут дистиллированную воду для извлечения гемоглобина. Окрашенную гемоглобином воду затем осторожно сливают и на препарат наливают разведенную, как обычно, краску Романовского на 20 – 30 мин. После окраски препарат осторожно промывают водой, чтобы не смыть каплю, и высушивают на воздухе.

Большой объем крови, чем в мазках, и гемолиз эритроцитов позволяют легче обнаружить в крови малярийные плазмодии, спирохеты возвратного тифа, а также эозинофилы и полихроматофилы.

При хорошей фиксации и окраске любым из приведенных выше способов ядра лейкоцитов окрашиваются в вишнево-красный цвет с хорошо видимой структурой хроматина, ядрышки – в синевато-голубоватый или в светло-фиолетовый, цитоплазма нейтрофилов – в светло-розовый, лимфоцитов – в чистый сине-голубой, моноцитов – в серо-голубой или дымчатый, зернистость нейтрофильная – в красновато-фиолетовый, эозинофильная – в оранжево-красный, базофильная – в темно-фиолетовый или темно-серый, азурофильная – в вишнево-красный, эритроциты – в бледно-розовый цвет.

Окраска для выявления базофильной пунктации эритроцитов по Фрейфельду

Базофильная зернистость эритроцитов хорошо воспринимает щелочной раствор метиленового синего.

Мазок фиксируют в течение 3 мин в метиловом спирте, а затем окрашивают в течение часа раствором метиленового синего (5 капель 1% раствора на 20 мл водопроводной воды). Краску смывают водой и мазок высушивают.

Базофильную пунктацию можно обнаружить и в мазках крови, окрашенных обычными способами по Романовскому, Паппенгейму-Крюкову и др. В этом случае она приобретает фиолетово-синий цвет.

Обычно сосчитывают 10 000 эритроцитов и отмечают количество эритроцитов с базофильной пунктацией. Лучше считать 1 000 000 эритроцитов, а ответ давать в пересчете на 10 000. У здоровых людей количество эритроцитов с базофильной пунктацией колеблется от 0 до 3 – 4 на 10 000 эритроцитов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Способы забора биологического материала для исследования.
2. Виды пробирок и антикоагулянтов для гематологических исследований.
3. Способы хранения и транспортировки биологического материала.
4. Методы приготовления, фиксации и окраски гематологических мазков.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, основных способов получения биологического материала.
2. Записать условия хранения и транспортировки основных видов биологического материала.

5. Тема занятия: Методы гематологических исследований.

Цель занятия: Знать структуру и особенности функционирования костного мозга, основные цитологические характеристики гемопоэтических элементов. Освоение рутинных методов подсчета показателей клинического анализа крови.

Перечень знаний и практических навыков:

- Изучить стадии созревания клеток крови в костном мозге.
- Ознакомиться с основными гемопоэтическими факторами и состояниями, связанными с их недостаточностью.
- Уметь дифференцировать основные клеточные элементы костного мозга.
- Знать нормативные показатели общего анализа крови.
- Знание методов подсчета эритроцитов и лейкоцитов в камере Горяева.
- Освоение методики измерения концентрации гемоглобина в крови.
- Умение рассчитывать цветовой показатель крови.
- Владение методикой подсчета тромбоцитов в мазках крови.
- Определение скорости оседания эритроцитов методом Панченкова.
- Ассоциировать изменения в организме с возможными изменениями в миелограмме и периферической крови.

Гематология – это раздел медицины, изучающий кровь, органы кроветворения, и заболевания крови. Гематология изучает этиологию, диагностику, лечение, прогнозирование и предотвращение заболеваний системы крови, которые влияют на производство крови и ее компонентов, а именно клетки крови, гемоглобин, белки крови, и механизм коагуляции (свертывание крови).

Кроветворением, или гемопоэзом, называют образование клеток крови. Различают эмбриональный гемопоэз, который происходит в эмбриональный период и приводит к развитию крови, как ткани, и постэмбриональный гемопоэз, который представляет собой процесс физиологической регенерации крови.

Костный мозг – это составляющая часть костей скелета, которая заполняет внутреннюю полость кости и осуществляет в организме функцию образования клеток крови. Существует 2 вида костного мозга: красный костный

мозг, состоящий в основном из кроветворной миелоидной ткани и желтый, основой которого являются клетки жировой ткани.

Красный костный мозг состоит из фиброзной ткани (стромы) и собственно кроветворной ткани. В кроветворной ткани костного мозга выделяют несколько ростков гемопоэза, количество которых увеличивается по мере созревания (рис. 4).

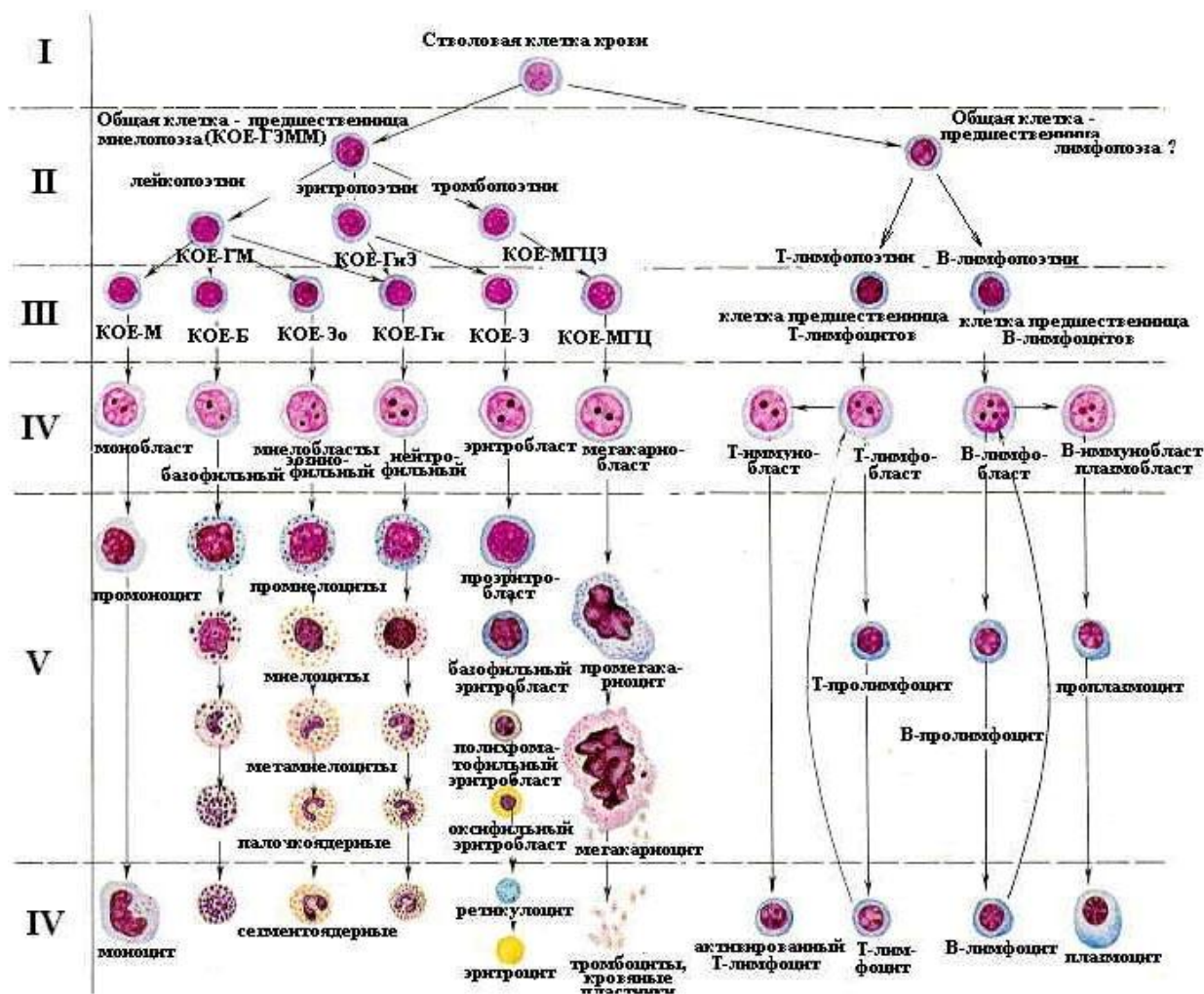


Рис. 4. Схема гемопоэза.

Зрелых ростков в красном костном мозге пять:

- Эритроцитарный
- Гранулоцитарный
- Лимфоцитарный
- Моноцитарный
- Мегакариоцитарный

Каждый из этих ростков даёт, соответственно, следующие клетки и постклеточные элементы: эритроциты; эозинофилы, нейтрофилы и базофилы; лимфоциты; моноциты; тромбоциты.

Развитие ростков гемопоэза представляет собой сложный процесс дифференцировки клеток. Родоначальники всех ростков названы полипотентными клетками за их способность дифференцироваться в клетки всех ростков гемопоэза под действием цитокинов. Так же эти клетки называют колониеобразующими элементами (КОЭ) за их локальное расположение в костном мозге или стволовыми клетками крови (СКК). Количество полипотентных стволовых клеток, то есть клеток, которые являются самыми первыми предшественниками в ряду кроветворных клеток, в костном мозге ограничено, и они не могут размножаться, сохраняя полипотентность, и тем самым восстанавливать численность. Ибо при первом же делении полипотентная клетка выбирает путь развития, и её дочерние клетки становятся либо мультипотентными клетками, у которых выбор более ограничен (только в эритроцитарный или лейкоцитарный ростки), либо мегакариобластами и затем мегакариоцитами – клетками, от которых отшнуровываются тромбоциты.

Под действием цитокинов КОЭ начинают специализироваться, переходя на следующий этап – олигопотентные клетки, вариантов дифференцировки у них уже меньше. Второе название этих клеток – колониеобразующие единицы (КОЕ), поскольку они расположены более мелкими группами, чем КОЭ. КОЕ неоднородны между собой: выделяют колониеобразующие единицы гранулоцитарно-эритроцитарно-миелоцитарно-макрофагального (КОЕ-ГЭММ) и колониеобразующие единицы лимфоцитарного (КОЕ-Л) ростков. Дальнейшее развитие КОЕ ещё более специфично.

Под действием цитокинов КОЕ-ГЭММ даёт следующие три типа клеток: колониеобразующая единица гранулоцитов и моноцитов (КОЕ-ГМ), колониеобразующая единица эритроцитов (КОЕ-Э) и колониеобразующая единица мегакариоцитов (КОЕ-МГЦ). Эти переходы инициируются лейкопоэтином, эритропоэтином и тромбопоэтином соответственно. Эти КОЕ –

последние, дальнейшие клетки ростков называются бластами, поскольку они уже становятся на один путь дифференцировки в одну конечную клетку. Так, КОЕ-ГМ развивается либо в промонобласт, либо в програнулобласт; КОЕ-Э развивается в эритробласт; КОЕ-МГЦ развивается в мегакариобласт. Таким образом, вкупе с лимфоидным ростком, получают 5 вышеперечисленных ростков гемопоэза.

Регуляция гемопоэза

Кроветворение регулируется:

- факторами роста, обеспечивающими пролиферацию и дифференцировку СКК и последующих стадий их развития;
- факторами транскрипции, влияющими на экспрессию генов, определяющих направление дифференцировки гемопоэтических клеток;
- микроэлементами, витаминами, гормонами (эритропоэтин, тироксин, андрогены, кортикостероиды, гормоны роста).

Факторы роста включают колониестимулирующие факторы (КСФ), интерлейкины и ингибирующие факторы. Они являются гликопротеинами, действующими и как циркулирующие гормоны, и как местные медиаторы, регулирующие гемопоэз и дифференцировку специфических типов клеток. Почти все факторы роста действуют на СКК, КОЕ, коммитированные и зрелые клетки. Однако отмечаются индивидуальные особенности действия этих факторов на клетки-мишени.

КСФ действуют на специфические клетки или группы клеток на различных стадиях дифференцировки. Например, фактор роста стволовых клеток влияет на пролиферацию и миграцию СКК в эмбриогенезе. В постнатальном периоде на гемопоэз оказывают влияние несколько КСФ, среди которых наиболее изучены факторы, стимулирующие развитие гранулоцитов и макрофагов (гранулоцит-макрофагальный КСФ, гранулацитарный КСФ, моноцитарный КСФ), а также интерлейкины.

Дифференцировка полипотентных клеток в унипотентные определяется действием ряда специфических факторов, поэтинов – эритропоэтинов (для

эритробластов), гранулопоэтинов (для миелобластов), лимфопоэтинов (для лимфобластов), тромбопоэтинов (для мегакариобластов).

Большая часть эритропоэтина образуется в почках. Его образование регулируется содержанием в крови кислорода, которое зависит от количества циркулирующих в крови эритроцитов. Снижение числа эритроцитов и соответственно парциального давления кислорода, является сигналом для увеличения продукции эритропоэтина. Эритропоэтин действует на чувствительные к нему КОЕ-Э, стимулируя их пролиферацию и дифференцировку, что в конечном итоге приводит к повышению содержания в крови эритроцитов. При хронической болезни почек выработка эритропоэтина снижается, поэтому такие пациенты нуждаются в медикаментозном его введении. Тромбопоэтин синтезируется в печени, стимулирует пролиферацию КОЕ-МГЦ, их дифференцировку и образование тромбоцитов.

Ингибирующие факторы дают противоположный эффект, т.е. тормозят гемопоэз; их недостаток может быть одной из причин лейкемии, характеризующейся значительным увеличением числа лейкоцитов в крови. Выделен ингибирующий лейкемию фактор (ЛИФ), который тормозит пролиферацию и дифференцировку моноцитов-макрофагов.

Для кроветворения требуются также микроэлементы (железо и медь) и ряд витаминов (фолиевая кислота, витамины В12, В6, В2 и С). Дефицит этих веществ обычно приводит к анемиям, каждая из которых имеет свои характерные особенности; реже развивается панцитопения.

Морфофункциональная характеристика клеток крови

Эритроциты (красные кровяные тельца) – самые многочисленные из форменных элементов. Зрелые эритроциты не содержат ядра и имеют форму двояковогнутых дисков. Циркулируют 120 дней и разрушаются в печени и селезёнке. В эритроцитах содержится железосодержащий белок – гемоглобин. Он обеспечивает главную функцию эритроцитов – транспорт газов, в первую очередь – кислорода. Именно гемоглобин придаёт крови красную окраску. В

лёгких гемоглобин связывает кислород, превращаясь в оксигемоглобин, который имеет светло-красный цвет.

Тромбоциты (кровяные пластинки) представляют собой ограниченные клеточной мембраной фрагменты цитоплазмы гигантских клеток костного мозга (мегакариоцитов). Совместно с белками плазмы крови (например, фибриногеном) они обеспечивают свёртывание крови, вытекающей из повреждённого сосуда, приводя к остановке кровотечения и тем самым защищая организм от кровопотери.

Лейкоциты – белые кровяные клетки; неоднородная группа различных по внешнему виду и функциям клеток крови человека, выделенная по признаку отсутствия самостоятельной окраски и наличия ядра. Главная сфера действия лейкоцитов – защита. Они играют главную роль в специфической и неспецифической защите организма от внешних и внутренних патогенных агентов, а также в реализации типичных патологических процессов.

В крови взрослого человека лейкоцитов содержится в 1000 раз меньше, чем эритроцитов, и в среднем их количество составляет $4-9 \times 10^9$ /л. Содержание лейкоцитов в крови не является постоянным, а динамически изменяется в зависимости от времени суток и функционального состояния организма. По наличию специфических гранул в цитоплазме выделяют две большие группы лейкоцитов периферической крови – гранулоциты (к ним относятся нейтрофилы, эозинофилы и базофилы) и агранулоциты (к ним относят лимфоциты и моноциты).

Нейтрофильные гранулоциты или нейтрофилы – подвида гранулоцитарных лейкоцитов, названный нейтрофилами за то, что при окраске по Романовскому они интенсивно окрашиваются как кислым, так и основным красителем.

Зрелые нейтрофилы имеют сегментированное ядро, то есть относятся к полиморфноядерным лейкоцитам. Они являются классическими фагоцитами: имеют адгезивность, подвижность, способность к хемотаксису, а так же способность захватывать частицы (например, бактерии).

Зрелые сегментоядерные нейтрофилы в норме являются основным видом лейкоцитов, циркулирующих в крови человека, составляя от 47% до 72% общего количества лейкоцитов крови. Ещё 1 – 5% в норме составляют юные,

функционально незрелые нейтрофилы, имеющие палочкообразное сплошное ядро и не имеющие характерной для зрелых нейтрофилов сегментации ядра – так называемые палочкоядерные нейтрофилы.

Нейтрофилы способны к активному амёбоидному движению, к экстравазации (эмиграции за пределы кровеносных сосудов), и к хемотаксису (преимущественному движению в направлении мест воспаления или повреждения тканей). Нейтрофилы способны к фагоцитозу, причём являются микрофагами, то есть способны поглощать лишь относительно небольшие чужеродные частицы или клетки.

Эозинофильные гранулоциты или эозинофилы – подвид гранулоцитарных лейкоцитов крови. Эозинофилы названы так потому, что при окраске по Романовскому интенсивно окрашиваются кислым красителем эозином и не окрашиваются основными красителями. Так же отличительным признаком эозинофила является двудольчатое ядро (у нейтрофила оно имеет 4 – 5 долей, а у базофила не сегментировано). Эозинофилы способны к активному амёбоидному движению, к экстравазации (проникновению за пределы стенок кровеносных сосудов), фагоцитозу и к хемотаксису. Главнейшее свойство эозинофилов – экспрессия Fc-рецепторов, специфичных для Ig E. Так же эозинофилы способны поглощать и связывать гистамин и ряд других медиаторов аллергии и воспаления. Они также обладают способностью при необходимости высвободить эти вещества. Процентное содержание эозинофилов в крови увеличивается при аллергических состояниях. Большая часть эозинофилов недолго остаётся в крови и, попадая в ткани, длительное время находится там.

Нормальным уровнем для человека считается 120 – 350 эозинофилов на микролитр. Повышение уровня эозинофилов в крови называют эозинофилией, снижение уровня эозинопенией.

Базофильные гранулоциты или базофилы – подвид гранулоцитарных лейкоцитов. Содержат базофильное S-образное ядро, зачастую не видимое из-за перекрытия цитоплазмы гранулами гистамина и прочих аллергомедиаторов. Базофилы названы так за то, что при окраске по Романовскому интенсивно

поглощают основной краситель и не окрашиваются кислым эозином. Базофилы – очень крупные гранулоциты: они крупнее и нейтрофилов, и эозинофилов. Гранулы базофилов содержат большое количество гистамина, серотонина, лейкотриенов, простагландинов и других медиаторов аллергии и воспаления. Базофилы принимают активное участие в развитии аллергических реакций немедленного типа (реакции анафилактического шока). Подобно тканевым лаброцитам, базофилы несут на поверхности иммуноглобулин Е и способны к дегрануляции (высвобождению содержимого гранул во внешнюю среду) или аутолизу (растворению, лизису клетки) при контакте с антигеном-аллергеном. Базофилы способны к экстравазации (эмиграции за пределы кровеносных сосудов), причём могут жить вне кровеносного русла, становясь резидентными тканевыми лаброцитами (тучными клетками).

Моноциты образуются из промоноцитов и представляет собой крупные зрелые одноядерные лейкоциты диаметром 18 – 20 мкм с эксцентрично расположенным полиморфным ядром, имеющим рыхлую хроматиновую сеть, и азурофильной зернистостью в цитоплазме. Как и лимфоциты, моноциты имеют неsegmentированное ядро. Моноцит – наиболее активный фагоцит периферической крови. Клетка овальной формы с крупным бобовидным, богатым хроматином ядром (что позволяет отличать их от лимфоцитов, имеющих округлое тёмное ядро) и большим количеством цитоплазмы, в которой имеется множество лизосом.

Лимфоциты – это клетки иммунной системы, относящиеся к группе агранулоцитарных лейкоцитов. Непосредственно в крови содержится всего 2% лимфоцитов, остальные 98% располагаются в тканях.

Лимфоциты обеспечивают:

- выработку антител – гуморальный иммунитет;
- клеточный иммунитет – тип иммунного ответа, при котором активизируются натуральные киллеры, макрофаги и др.;
- регуляцию деятельности других клеток.

Лимфоциты образуются в костном мозге, откуда мигрирует для дальнейшего развития в тимус (вилочковую железу), костный мозг, лимфатические узлы, миндалины, селезенку, червеобразный отросток, пейеровы бляшки.

Существует два типа лимфоцитов, выделяющихся по морфологическим признакам: большие гранулярные и малые. К первому типу относятся НК-клетки, реже это делящиеся лимфобласты и иммунобласты, ко второму типу относятся Т и В клетки. Лимфоциты имеют небольшие размеры и округлую форму, у них темное ядро, что связано с конденсацией хроматина, и небольшой ободок базофильной цитоплазмы, в которой содержится небольшое количество митохондрий.

Лимфоциты делятся на 3 группы по выполняемым функциям:

- НК-лимфоциты – контролируют качество клеток в организме;
- В-лимфоциты – находят антигены и вырабатывают антитела;
- Т-лимфоциты – регулируют иммунитет при помощи Т-хелперов и Т-киллеров.

НК-лимфоциты, или по-другому, естественные киллеры (англ. Natural killer) – один из основных компонентов врожденного иммунитета, они способны атаковать опухолевые клетки и клетки, зараженные вирусами. НК-лимфоциты имеют множество рецепторов, позволяющих им отличать клетки организма от несвойственных ему образований. НК имеют в своей цитоплазме перфторин и протеазы, перфторин, выделяясь, образует отверстия в мембране зараженной клетки, а протеазы проходят сквозь них и приводят к апоптозу или лизису клетки, в первом случае погибают и вирус, и клетка, в которой он находится. НК-лимфоцитов в организме человека 5 – 20% от общего количества лимфоцитов.

Т-лимфоциты делятся на Т-помощников (Т-хелперов), на их поверхности находятся молекулы CD4 и Т-киллеров, на поверхности которых находятся молекулы CD8. Помимо них существуют Т-регуляторы, Т-амплифайеры, Т-контрсупрессоры, Т-клетки памяти. Т-лимфоциты, в отличие от НК-лимфоцитов, отвечают за приобретенный иммунитет, они уничтожают нехарактерные антигены, усиливают воздействие НК-лимфоцитов, усиливают моноциты. Т-лимфоцитов в общем количестве лимфоцитов в крови человека – 65 – 80%.

И, наконец, В-лимфоциты, их основная функция – образовывать антитела, эти лимфоциты также отвечают за приобретенный иммунитет.

Увеличение числа лимфоцитов в крови называется лимфоцитозом, уменьшение – лимфопенией.

Общий анализ крови

Общий анализ крови – наиболее распространенный вид лабораторного исследования, он относится к базовым клиническим тестам, который дает представление о гемограмме – клеточном составе крови. Он позволяет оценить содержание гемоглобина в системе красной крови, количество эритроцитов, цветовой показатель, количество лейкоцитов, тромбоцитов. Клинический анализ крови позволяет рассмотреть лейкоцитарную формулу и скорость оседания эритроцитов (СОЭ).

Забор крови для проведения анализа необходимо производить натощак, и производится он двумя способами:

- из пальца (как правило – безымянного),
- из вены.

Подсчет гемограммы ручным способом:

Определение концентрации гемоглобина

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.

Определение проводят в упрощенном колориметре – гемометре Сали. Этот прибор состоит из пластмассового штатива с 3 вертикальными гнездами. В боковых гнездах находятся 2 запаянные пробирки со стандартной жидкостью. В среднее гнездо гемометра 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. в грамм-процентах (г%). При гемометре 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% раствор хлористо-водородной кислоты. Затем набирают кровь в капиллярную пипетку до метки «0,02 мл» (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 гемометр 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.

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 (гемиглобина), который затем превращается при помощи цианина калия в цианметгемоглобин (гемоглобинцианид). Через 20 мин,

необходимых для полного превращения гемоглобина в гемоглобинцианид, измеряют экстинкцию при длине волны 540 нм и толщине слоя в 1 см против воды на спектрофотометре. 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 на оси ординат, а концентрацию гемоглобина в граммах на литр на оси абсцисс. На основании калибровочной кривой определяют концентрацию гемоглобина в пробах пациентов. Существуют колориметры, специально разработанные для определения гемоглобина, – гемоглобинометры. В большинстве из них используется цианометгемоглобиновый метод.

В норме содержание гемоглобина в крови:

- Мужчины – 130 – 150 г/л
- Женщины – 120 – 140 г/л
- Дети – 120 – 140 г/л

Повышение гемоглобина отмечается при:

- первичной и вторичной эритремии;
- обезвоживании (ложный эффект за счёт гемоконцентрации);
- чрезмерном курении (образование функционально неактивного НbCO).

Снижение гемоглобина выявляется при:

- анемии;
- гипергидратации (ложный эффект за счёт гемодилюции – «разбавления» крови).

Определение количества эритроцитов и лейкоцитов

Для подсчета количества эритроцитов и лейкоцитов необходимо приготовить две пробирки: для эритроцитов – с 4 мл физиологического раствора и для лейкоцитов – с 400 мкл 3% раствора уксусной кислоты. В обе пробирки вносят по 20 мкл крови и тщательно перемешивают содержимое.

Таким образом, в первой пробирке (для эритроцитов) получают разведение в 200 раз, а во второй пробирке (для лейкоцитов) – в 20 раз.

Для подсчета количества эритроцитов и лейкоцитов используют счетную камеру Горяева (рис. 5).

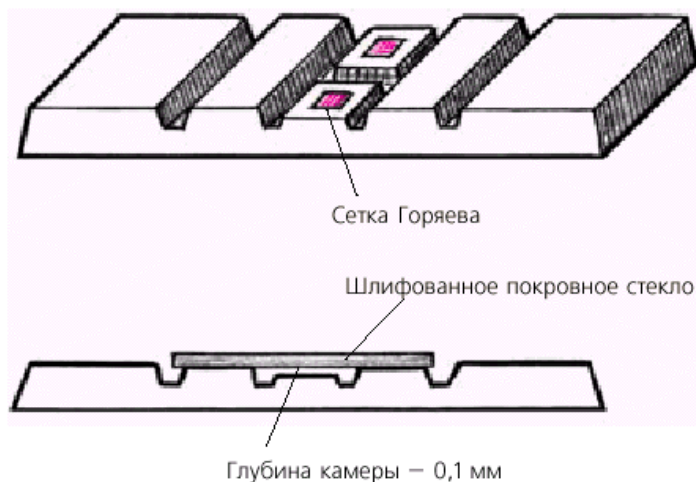


Рис. 5. Камера Горяева.

Она представляет собой толстое прямоугольное прозрачное стекло обычно с двумя сетками, выгравированными на его поверхности. На боковых участках стекла нанесены основные показатели и название счетной камеры. Сетки отделены друг от друга во избежание затекания жидкости поперечной канавкой, двумя глубокими продольными канавками сетки отделены от стеклянных прямоугольных пластинок, к которым притирают шлифованные покровные стекла; поверхность этих стеклянных прямоугольных пластинок находится на 0,1 мм выше участков камеры, на которых нанесена сетка.

Сетка камеры Горяева образована системой разграничительных линий, проведенных взаимно перпендикулярно. В ней имеются 3600 малых квадратов: сторона $1/20$ мм, площадь $1/400$ мм², объем $1/4000$ мкл; 225 больших квадратов: сторона $1/5$ мм, площадь $1/25$ мм², объем $1/250$ мкл. Сторона всей сетки 3 мм, площадь 9 мм², объем 0,9 мкл; высота камеры, создающаяся при притирании шлифованного покровного стекла, – 0,1 мм.

Камеру перед заполнением моют водопроводной водой, насухо вытирают, так же подготавливают шлифованное покровное стекло. Камеру Горяева берут в левую руку. На участок камеры, где нанесены сетки, укладывают шлифованное

покрывное стекло. Теперь стекло берут и правой рукой. При этом нижняя поверхность камеры находится на двух III пальцах, два II пальца придерживают ее спереди. Свободными двумя I пальцами притирают шлифованное покрывное стекло, продвигая его по поверхности прямоугольных стеклянных пластинок плавно до появления цветных колец Ньютона в местах соприкосновения покрывного стекла с поверхностью прямоугольных пластинок камеры. Каплю исследуемой жидкости помешают перед щелью, образующейся между шлифовальным стеклом и счетной камерой, в результате чего жидкость заполняет пространство над сеткой. В соответствии с описанной выше методикой одну из сеток заполняют для подсчета эритроцитов, вторую – для подсчета лейкоцитов. При заполнении камеры следят за тем, чтобы в пространстве над сеткой не было пузырьков воздуха и избытка жидкости.

К подсчету форменных элементов в счетной камере приступают через 2 – 3 мин после ее заполнения. Сетку камеры Горяева изучают при увеличении (окуляр 10×, объектив 8×) с опущенным конденсором. Камеру устанавливают на предметный столик микроскопа. Наблюдая в окуляр, отыскивают сетку камеры, четко фокусируют ее изображение, устанавливают в поле зрения верхний левый угол сетки. Передвигая стекло левой рукой, последовательно изучают отдельные малые и большие квадраты, рассматривают их группировки, при этом должна быть изучена вся площадь сетки (рис. 6).

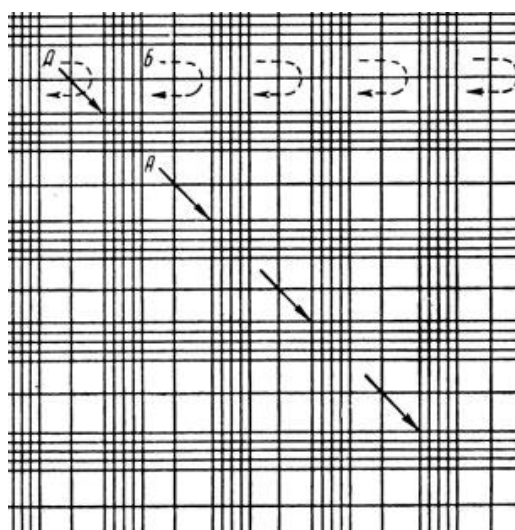


Рис. 6. Сетка камеры Горяева.

Эритроциты подсчитывают в 5 больших квадратах, каждый из которых разделен на 16 малых квадратов. Подсчет начинают с левого верхнего квадрата, а затем продвигают камеру по диагонали сверху вниз.

Во избежание повторного подсчета одних и тех же эритроцитов руководствуются следующим правилом: подсчитывают все эритроциты, находящиеся внутри малого квадрата, и на разграничительных линиях, когда они большей своей половиной заходят внутрь квадрата; клетки же, пересеченные разграничительной линией пополам, подсчитывают лишь на двух сторонах квадрата (на левой и верхней); клетки, выходящие большей своей половиной за пределы разграничительных линий, совсем не считают. Результаты подсчета эритроцитов по каждому из 5 больших квадратов записывают отдельно и суммируют. Для расчета количества эритроцитов в 1 л пользуются следующей формулой:

$$x = \frac{a \times v \times 4000}{c} \times 10^6,$$

где x – количество эритроцитов в 1 л крови; a – сумма эритроцитов, подсчитанных в 5 квадратах; 4000 – множитель, приводящий результат к объему 1 мкл крови, поскольку объем малого квадрата 1/4000 мкл; v – разведение крови в 200 раз; c – число сосчитанных малых квадратов – 80; 10^6 – количество мкл в 1 л.

Для получения более точного результата рекомендуют производить подсчет в двух сетках и использовать для подсчета средний арифметический результат. Таким образом,

$$x = a \times 10\,000 \times 10^6 / \text{л}.$$

В норме содержание эритроцитов в крови:

- мужчины – $(4,0-5,1) \times 10^{12} / \text{л}$;
- женщины – $(3,7-4,7) \times 10^{12} / \text{л}$;
- дети – $(3,8-4,9) \times 10^{12} / \text{л}$.

Увеличение (эритроцитоз) количества эритроцитов бывает при:

- новообразованиях;
- гидронефрозе;

- влиянии кортикостероидов;
- болезни и синдроме Кушинга;
- истинной полицитемии;
- относительное увеличение количества эритроцитов связано со сгущением крови вследствие ожога, диареи, приема диуретиков.

Уменьшение содержания эритроцитов в крови наблюдается при:

- кровопотере;
- анемии;
- беременности;
- гидремии;
- снижении интенсивности образования эритроцитов в костном мозге;
- ускоренном разрушении эритроцитов.

Лейкоциты подсчитывают в 100 больших квадратах. Эти квадраты сгруппированы по 4. Подсчет начинают с левой верхней группировки, а затем продвигают камеру последовательно от группировки к группировке. При подсчете лейкоцитов в каждой группировке из 4 квадратов придерживаются схемы, указанной на рисунке. При подсчете лейкоцитов в каждом большом квадрате придерживаются тех же правил, которые описаны для эритроцитов. Подсчитав число лейкоцитов во всех 100 квадратах, записывают результат, а затем производят расчет по приведенной выше формуле, в которой лишь цифра, характеризующая разведение крови, равна 20, а количество подсчитанных малых квадратов – 1600.

$$y = \frac{a \times 4000 \times 20}{1600} \times 10^6 = a \times 50 \times 10^6$$

В норме содержание лейкоцитов в крови: $4-9 \times 10^9/\text{л}$

Увеличение (лейкоцитоз) бывает при:

- острых воспалительных процессах;
- гнойных процессах, сепсисе;
- инфекционных заболеваниях вирусной, бактериальной, грибковой этиологии;
- злокачественных новообразованиях;

- травмах тканей;
- инфаркте миокарда;
- беременности (последний триместр);
- в период лактации;
- после больших физических нагрузок (физиологический лейкоцитоз).

К снижению (лейкопения) приводит:

- аплазия, гипоплазия костного мозга;
- воздействие ионизирующего излучения, лучевая болезнь;
- брюшной тиф;
- вирусные заболевания;
- анафилактический шок;
- гиперспленизм;
- острые лейкозы;
- метастазы новообразований в костный мозг;
- пернициозная анемия.

Вычисление цветового показателя:

Зная число эритроцитов в крови и содержание в ней гемоглобина, можно высчитать, в какой мере насыщен каждый эритроцит. Цветовой показатель соответствует максимальному содержанию гемоглобина в одном нормальном эритроците, величина его условно принимается за единицу. Для вычисления цветового показателя пользуются следующей формулой:

$$\text{ЦП} = \frac{\text{Hb пациента} \times \text{RBC пациента}}{\text{Hb в норме} \times \text{RBC в норме}}$$

Однако, на практике удобно использовать другой метод подсчета:

$$\text{ЦП} = \frac{\text{Hb} \times 3}{\text{RBC}}$$

Получаем ЦП в %, который легко привести к долям единицы.

Значения ЦП:

- 0,85 – 1,05– норма;

- меньше 0,85 – гипохромная анемия;
- 0,85 – 1,05 – эритроциты считаются нормохромными;
- больше 1,05 – гиперхромная анемия.

Уменьшение ЦП (0,50 – 0,70) бывает при:

- железодефицитной анемии;
- анемии, вызванной свинцовой интоксикацией.

Увеличение ЦП (1,10 и более) бывает при:

- недостаточности витамина В12 в организме;
- недостаточности фолиевой кислоты;
- раке;
- полипозе желудка.

Подсчет тромбоцитов в мазках крови (метод Фонио)

Метод основан на определении количества кровяных пластинок в окрашенных мазках крови на 1000 эритроцитов. Капилляром Панченкова набирают раствор сульфата магния или ЭДТА до метки «75» и вносят в пробирку размером 10×1 см. Туда же вливают кровь, взятую из пальца капилляром Панченкова до метки «0». Таким образом, получают соотношение антикоагулянта и крови 1:4. Содержимое пробирки хорошо перемешивают и из смеси готовят тонкие мазки, которые фиксируют и окрашивают по Романовскому-Гимзе.

Определяют количество тромбоцитов на 1000 эритроцитов. То есть просматривают 5 полей зрения, в которых количество эритроцитов достигает 250, при этом они должны лежать монослоем, то есть не перекрывать друг друга. В каждом таком поле зрения подсчитывается количество тромбоцитов. Полученные результаты складываются. Вычисляют количество кровяных пластинок в 1 мкл крови, зная абсолютное число эритроцитов в 1 мкл крови. Составляется пропорция, по которой вычисляется абсолютное количество тромбоцитов в крови.

Определение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) методом Панченкова

Смесь антикоагулянта и крови в соотношении 1:4 (как описано выше) тщательно перемешивают и набирают в капилляр Панченкова точно до отметки 0. В капилляре не должно быть пузырьков воздуха, так как это приведет к искажению результатов. Капилляр устанавливают в специальный штатив (рис. 7) строго вертикально на 1 час. Через час учитывают высоту столбика эритроцитов по градуировочной шкале капилляра. СОЭ выражают в мм/ч.

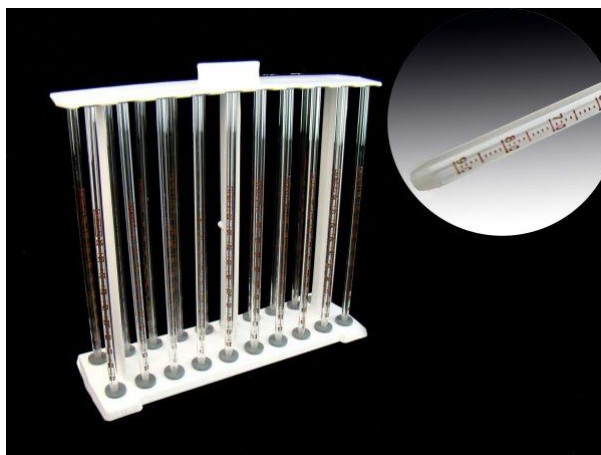


Рис. 7. Капилляры Панченкова в штативе.

В норме:

- новорождённые – 0 – 2 мм/ч;
- дети до 6 лет – 12 – 17 мм/ч;
- мужчины до 60 лет – до 8 мм /ч;
- женщины до 60 лет – до 12 мм/ч;
- мужчины старше 60 лет – до 15 мм/ч;
- женщины старше 60 лет – до 20 мм/ч.

Увеличение СОЭ встречается при:

- инфекционно-воспалительном заболевании;
- коллагенозах;
- поражении почек, печени, эндокринных нарушениях;
- беременности, в послеродовом периоде, менструации;
- переломах костей;
- оперативных вмешательствах;
- анемиях;

- онкологических заболеваниях;
- после приёма пищи (до 25 мм/ч);
- во время беременности (до 45 мм/ч).

Снижение СОЭ бывает при:

- гипербилирубинемии;
- повышении уровня желчных кислот;
- хронической недостаточности кровообращения;
- эритремии;
- гипофибриногенемии.

В настоящее время для выполнения общего анализа крови используют автоматические гематологические анализаторы, которые способны измерять огромный спектр параметров за считанные минуты. Автоматизация приходит на смену рутинным методам, что облегчает работу лаборатории и значительно повышает качество медицинских услуг.

Микроскопия мазков крови

Микроскопия мазка крови – исследование под микроскопом препарата, приготовленного из капли крови (менее 10 мкл) и окрашенного по методу Романовского-Гимзе. Несмотря на появление современных гематологических анализаторов микроскопия окрашенного мазка крови (лейкоцитарная формула крови) является «золотым стандартом» диагностики. Лейкоцитарная формула включает определение относительного количества (%) нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов, базофилов, моноцитов, а также незрелых форм, если они присутствуют в крови.

Микроскопия окрашенного и высушенного препарата производится с использованием иммерсионного объектива. На препарате выбирается тонкое место, на которое наносится капля иммерсионного масла. Согласно правилам работы с микроскопом, сначала производят настройку изображения на малом увеличении, затем его сменяет иммерсионный объектив, который окунают в нанесенную каплю масла. Необходимо выбрать на препарате участок, где

эритроциты образуют монослой, то есть лежат рядом и не наслаиваются друг на друга. Место начала подсчета лейкоформулы следует выбирать недалеко от широкого края мазка, но не на самом краю, так как здесь клетки лежат более кучно, что может исказить результат исследования. Существует несколько алгоритмов просмотра препарата. Наиболее удобный и эффективный из них – движение объектива поперек предметного стекла, затем, не доходя до края препарата, небольшой отступ в сторону (2 или 3 шага) и снова движение поперек стекла в противоположную сторону. При этом подсчитываются все клетки лейкоцитарного ряда, попадающие в поле зрения.

В лабораторной практике применяются специальные счетчики для лейкоформул. Современное устройство имеет вид калькулятора, клавиши которого соответствуют клеткам периферической крови и костного мозга. При попадании определенной клетки в поле зрения необходимо нажать соответствующую клавишу на счетчике. По достижении 100 клеток счетчик дает сигнал к завершению работы. Таким образом, мы получаем процентное соотношение видов лейкоцитов в периферической крови.

Исследование лейкоцитарной формулы имеет большое значение в диагностике гематологических, инфекционных, воспалительных заболеваний, а также оценке тяжести состояния и эффективности проводимой терапии. В то же время, изменения лейкоцитарной формулы не являются специфичными – они могут иметь сходный характер при разных заболеваниях или, напротив, могут встречаться непохожие изменения при одной и той же патологии у разных больных.

Лейкоцитарная формула имеет возрастные особенности, поэтому ее сдвиги должны оцениваться с позиции возрастной нормы (это особенно важно при обследовании детей).

Некоторые варианты изменения (сдвига) лейкоцитарной формулы:

Сдвиг влево (в крови увеличено количество палочкоядерных нейтрофилов, возможно появление метамиелоцитов (юных), миелоцитов) может указывать на:

- острые инфекционные заболевания;

- физическое перенапряжение;
- ацидоз и коматозные состояния.

Сдвиг вправо (в крови появляются гиперсегментированные гранулоциты)

может указывать на:

- мегалобластную анемию;
- болезни почек и печени;
- состояния после переливания крови.

Значительное омоложение клеток происходит в таких случаях:

- так называемый «бластный криз» – в крови отмечается присутствие метамиелоцитов, миелоцитов, промиелоцитов, бластных клеток, может указывать на: острые лейкозы, метастазы злокачественных новообразований, обострение хронических лейкозов;

- «провал» лейкоцитарной формулы – бластные клетки, промиелоциты и зрелые клетки, промежуточных форм нет (характерно для дебюта острого лейкоза).

Характеристика основных параметров гемограммы, полученной на автоматическом гематологическом анализаторе

WBC (white blood cells – белые кровяные тельца) – абсолютное содержание лейкоцитов (норма $4,5-9,0 \times 10^9$ /л).

RBC (red blood cells – красные кровяные тельца) – абсолютное содержание эритроцитов (норма $4,3-5,7 \times 10^{12}$ /л)

HGB (Hb, hemoglobin) – концентрация гемоглобина в цельной крови (норма 132 – 173 г/л).

HCT (hematocrit) – гематокрит, соотношение объёма форменных элементов к плазме крови (норма 0,39 – 0,49).

PLT (platelets – кровяные пластинки) – абсолютное содержание тромбоцитов (норма $150-400 \times 10^9$ /л)

Эритроцитарные индексы:

MCV – средний объём эритроцита (норма 80 – 95 фл).

MCH – среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците в абсолютных единицах (норма 27 – 31 пг), пропорциональное отношению «гемоглобин/количество эритроцитов». Из показателя MCH вычисляют цветной показатель по формуле: ЦП=MCH×0,03.

MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците (норма 300 –380 г/л), отражает степень насыщения эритроцита гемоглобином.

RDW – показатель гетерогенности эритроцитов, рассчитывается как коэффициент вариации среднего объема эритроцитов.

RDW-SD – относительная ширина распределения эритроцитов по объёму, стандартное отклонение.

RDW-CV – относительная ширина распределения эритроцитов по объёму, коэффициент вариации.

Тромбоцитарные индексы:

MPV (mean platelet volume) – средний объем тромбоцитов (норма 7 – 10 фл).

PDW – относительная ширина распределения тромбоцитов по объёму, показатель гетерогенности тромбоцитов.

PCT (platelet crit) – тромбокрит (норма 0,108 – 0,282), доля (%) объёма цельной крови, занимаемая тромбоцитами.

P-LCR – коэффициент больших тромбоцитов.

Лейкоцитарные индексы:

LYM% (LY%) (lymphocyte) – относительное (%) содержание (норма 25 – 40%) лимфоцитов.

LYM# (LY#) (lymphocyte) – абсолютное содержание (норма 1,2 – 3,0×10⁹/л) лимфоцитов.

MXD% – относительное (%) содержание смеси (норма 5 – 10%) моноцитов, базофилов и эозинофилов.

MXD# – абсолютное содержание смеси (норма 0,2–0,8×10⁹/л) моноцитов, базофилов и эозинофилов.

NEUT% (NE%) (neutrophils) – относительное (%) содержание нейтрофилов.

NEUT# (NE#) (neutrophils) – абсолютное содержание нейтрофилов.

MON% (MO%) (monocyte) – относительное (%) содержание моноцитов (норма 0,04 – 0,11).

MON# (MO#) (monocyte) – абсолютное содержание моноцитов (норма $0,1-0,6 \times 10^9$ /л).

EO% – относительное (%) содержание эозинофилов.

EO# – абсолютное содержание эозинофилов.

BA% – относительное (%) содержание базофилов.

BA# – абсолютное содержание базофилов.

IMM% – относительное (%) содержание незрелых гранулоцитов.

IMM# – абсолютное содержание незрелых гранулоцитов.

ATL% – относительное (%) содержание атипичных лимфоцитов.

ATL# – абсолютное содержание атипичных лимфоцитов.

GR% – относительное (%) содержание (норма 47 – 72%) гранулоцитов.

GR# – абсолютное содержание (норма $1,2-6,8 \times 10^9$ /л) гранулоцитов.

ESR (СОЭ) (скорость оседания эритроцитов) – неспецифический индикатор патологического состояния организма.

Как правило, автоматические гематологические анализаторы строят также гистограммы для эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Предмет и области изучения гематологии.
2. Костный мозг: виды, локализация, строение, функционирование.
3. Стволовая клетка крови и ее дифференцировка.
4. Колониеобразующие единицы костного мозга, их дифференцировка и взаимосвязь.
5. Принципиальная схема костномозгового кроветворения.
6. Способы взятия биологического материала для оценки миелограммы: преимущества и недостатки.
7. Миелограмма в норме.

8. Миелограмма при остром и хроническом лейкозах.
9. Миелограмма при острой лучевой болезни.
10. Регуляция гемопоэза: факторы роста.
11. Регуляция гемопоэза: факторы транскрипции.
12. Регуляция гемопоэза: витамины и гормоны.
13. Методы определения концентрации гемоглобина в цельной крови, их характеристика, преимущества и недостатки. Диагностическая значимость показателя. Нормальные значения.
14. Метод подсчета форменных элементов крови в камере Горяева: пробоподготовка, техника просмотра препарата, расчетные формулы. Диагностическая значимость показателя. Нормальные значения.
15. Определение цветового показателя, формула расчета. Диагностическая значимость, нормальные значения.
16. Подсчет количества тромбоцитов в гематологических мазках. Диагностическая значимость, нормальные значения.
17. Измерение скорости оседания эритроцитов. Диагностическая значимость, нормальные значения.
18. Общий анализ крови с использованием гематологического анализатора. Характеристика основных параметров.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задачи, характеристику костномозгового кроветворения.
2. Записать морфологическую характеристику клеток крови.
3. Записать механизмы регуляции кроветворения.
4. Записать способы подсчета лейкоцитов крови.
5. Записать основные характеристики и зарисовать принципиальную схему сетки камеры Горяева.

6. Тема занятия: Диагностика патологии белого ростка системы крови.

Цель занятия: Знакомство с видами новообразований кроветворной системы, агранулоцитозами, их характерные особенности.

Перечень знаний и практических навыков:

- Определения, причины, механизмы возникновения, классификации и клиничко-лабораторные проявления основных гематологических синдромов и заболеваний белого ростка системы крови.
- Уметь интерпретировать результаты миелограмм и гемограмм в норме и при различных заболеваниях системы кроветворения.
- Используя бланки учебных анализов, проводить анализ изменений клеточного состава белой крови.

Изменение количества лейкоцитов как сопутствующие реакции

Лейкоцитоз

Лейкоцитоз – увеличение количества зрелых клеток от 9 до 40×10^9 в литре крови. От него следует отличать лейкомоидную реакцию (увеличение количества зрелых клеток более 40×10^9 с появлением незрелых лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов).

Этиология – чаще всего инфекционная.

Патогенез: бактерии и/или их токсины увеличивают продукцию фагоцитами лейкопоэтинов, которые стимулируют деление полустволовых унипотентных клеток и созревание промежуточных форм (гранулярного и моноцитарного рядов).

Виды лейкоцитозов:

а) нейтрофильный, симптом гнойного воспаления (основная функция – фагоцитоз);

б) эозинофильный, симптом аллергических реакций (основная функция – инактивация биологически активных веществ (например, гистамина);

в) базофильный, симптом системных заболеваний крови, например, при эритремии (основная функция – депо биологически активных веществ);

г) лимфоцитоз, симптом системных заболеваний крови, например, лимфолейкоз (основная функция – участие в иммунных реакциях);

д) моноцитоз, симптом острых вирусных заболеваний (основная функция – фагоцитоз).

Лейкопении

Лейкопении – уменьшение количества зрелых клеток менее 4×10^9 в литре крови. Диагностическая ценность лейкопении низка, т. к. она отражает лишь тяжесть процесса.

Этиопатогенез: токсическое действие цитостатиков (ксенобиотики, ионизирующее излучение) приводит к угнетению деления стволовых и полустволовых клеток костного мозга. Поэтому токсический агранулоцитоз часто сочетается с анемией и тромбоцитопенией. Иммунный агранулоцитоз возникает в результате образования аутоантител к лейкоцитам при длительном лечении некоторыми медикаментами (амидопирин, сульфаниламиды). Важным дифференциально - диагностическим признаком является то, что при иммунном агранулоцитозе отмечается избирательное уменьшение количества лейко- и лимфоцитов, а при токсическом регистрируется угнетение всех ростков крови

Изменение количества лейкоцитов как заболевание

Гемобластозы – это опухоли кроветворной ткани с обязательным поражением костного мозга.

Гемобластозы подразделяют на системные заболевания – **лейкозы**, а также регионарные – **лимфомы**. Отличия между лейкозами и лимфомами заключаются не только в наличии или отсутствии системности поражения. При лейкозах костный мозг поражается первично, а при лимфомах – вторично в результате метастазирования.

Как всякие другие опухоли, каждый из видов гемобластозов представляет собой группу клеток, возникших из одной измененной клетки. Рост этой группы клеток (опухолевого клона) становится совершенно неуправляемым. В отличие от других опухолей гемобластозы очень рано начинают распространяться по току крови (метастазируют), образуют очаги опухоли в

других органах. Второй отличительной особенностью гемобластозов является угнетение нормального кровообразования и, в первую очередь того роста костного мозга, из которого исходит опухоль. Если опухоль развивается из лейкоцитарного роста костного мозга, возникают лейкозы, из эритроцитарного роста – эритремия, из плазматических клеток – миеломная болезнь.

Лейкозы бывают трех видов – острый лейкоз, хронический миелоидный лейкоз и хронический лимфатический лейкоз. Общим признаком для них является значительное увеличение в крови лейкоцитов и изменение лейкоцитарной формулы.

При остром лейкозе в крови и костном мозге находят самые молодые, функционально совершенно неполноценные формы лейкоцитов. Острый лейкоз характеризуется острым началом (высокая лихорадка, явления тяжелой интоксикации) и быстрой прогрессией заболевания. Наиболее частыми формами острых лейкозов являются острый лимфобластный лейкоз и острый миелобластный лейкоз.

Хронические лейкозы обычно характеризуются постепенным началом, медленной прогрессией, даже без лечения продолжительность жизни составляет 10 – 15 лет. При хроническом миелоидном лейкозе много молодых форм, но есть и более зрелые лейкоциты. У больных хроническим лимфатическим лейкозом 90 и более % лейкоцитов составляют незрелые лимфоциты. Когда опухоль достаточно развита, можно наблюдать признаки, общие для всех лейкозов – малокровие вследствие угнетения образования эритроцитов и гемоглобина; кровоизлияния и кровотечения из-за уменьшения числа тромбоцитов; склонность к развитию инфекционных осложнений – нет зрелых лейкоцитов, "защитников" организма от микробов. Практически при всех лейкозах увеличиваются лимфатические узлы, особенно при хроническом лимфатическом лейкозе. У больных хроническим миелоидным лейкозом из-за разрастания опухолевых клеток в селезенке она значительно увеличивается.

Лимфомы бывают ходжкинские и неходжкинские. Все неходжкинские лимфомы разделяются на три больших прогностических группы:

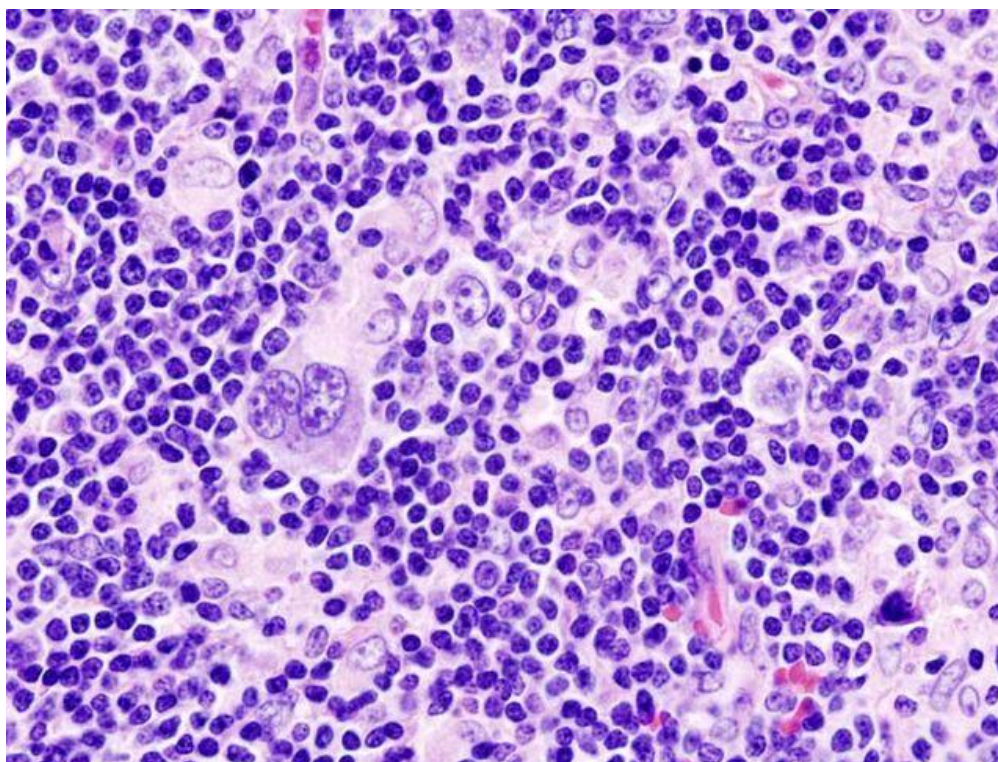
- медленно прогрессирующие лимфомы;
- умеренно прогрессирующие;
- быстро прогрессирующие лимфомы.

Типы неходжкинских лимфом:

- В-клеточные лимфомы;
- Т-клеточные лимфомы.

Лимфома Ходжкина (лимфогрануломатоз) – это злокачественная лимфома, которая характеризуется наличием клеток Рида-Березовского-Штернберга в пораженной ткани, хроническим, рецидивирующим (реже острым) течением с преимущественным развитием опухолевой ткани в лимфатических узлах.

Клетки Рида-Березовского-Штернберга представляют собой двух- или многоядерные гигантские клетки обнаруживаемые при микроскопическом исследовании поражённых лимфатических узлов (рис. 8).



**Рис. 8. Микропрепарат: биоптат лимфоузла.
Характерная клетка Рид – Березовского – Штернберга**

Различают два варианта болезни Ходжкина:

- изолированный, или локальный;
- генерализованный.

При изолированной форме чаще всего поражаются лимфатические узлы шеи, средостения, забрюшинной клетчатки, реже паховые. При генерализованном процессе, как правило, поражается селезенка.

Больные умирают от интоксикации, малокровия, присоединения вторичных инфекций. Несмотря на интенсивные исследования и накопление многочисленных иммунологических данных, диагностика лимфомы Ходжкина по-прежнему базируется на гистологическом исследовании – нахождение классических клеток Рида-Березовского-Штернберга в пораженной ткани является необходимым условием постановки диагноза.

Эритремия – хроническая доброкачественно текущая опухоль из эритроцитарного ростка костного мозга. Значительно повышается количество эритроцитов и гемоглобина. Заболевание проявляется головными болями, головокружением, повышением артериального давления. Характерны кожный зуд и жгучие приступообразные боли в кончиках пальцев. Отмечается склонность к тромбозам сосудов – коронарных, мозговых, периферических с развитием инфарктов, инсультов. Окраска кожи типичная, особенно на лице – красно-синеватая.

Парапротеинемические гемобластозы – группа опухолевых заболеваний системы крови, основным признаком которых – секреция моноклональных иммуноглобулинов (парапротеинов) и их фрагментов. Моноклональные иммуноглобулины у разных больных могут относиться к различным классам и достигать в сыворотке крови значительных концентраций. Источником опухолевого роста при парапротеинемии являются В-лимфоциты.

В зависимости от морфологической характеристики опухолевого субстрата и секретируемых иммуноглобулинов выделяют такие формы парапротеинемических гемобластозов, как множественная миелома, острый

плазмобластный лейкоз, солитарные плазмоцитомы (костные и внекостные), макроглобулинемия Вальденстрема (болезнь Вальденстрема), болезни тяжелых цепей, Ig-секретирующие лимфомы.

Клиническая картина характеризуется наличием опухоли, продуцирующей парапротеин, а также вторичным гуморальным иммунодефицитом, который развивается у всех больных по мере нарастания массы опухоли. В зависимости от течения парапротеинемии выделяют развернутую (хроническую) и терминальную (острую) стадии.

Парапротеинемией обусловлены такие общие для гемобластозов проявления, как повышение вязкости крови и нарушение микроциркуляции (синдром повышенной вязкости), поражение почек (парапротеинемическая тубулоинтерстициальная нефропатия, миеломная почка), амилоидоз, криоглобулинемия I и II типов, геморрагический синдром, связанный с блокадой тромбоцитарного и коагуляционных звеньев гемостаза и микроциркуляторными нарушениями, периферическая нейропатия. Перечисленные нарушения встречаются с разной частотой при различных формах парапротеинемических гемобластозов.

Агранулоцитоз – это клинико-гематологический синдром, характеризующийся лейкопенией и значительным уменьшением, иногда вплоть до полного исчезновения, гранулоцитов из периферической крови. Агранулоцитоз, как правило, представляет собой синдром какого-то общего заболевания. У детей встречается сравнительно редко, чаще как симптом гипопластической анемии. Чаще встречается миелотоксический и иммунный агранулоцитоз.

Агранулоцитоз может быть обусловлен рядом факторов: инфекционными болезнями (брюшной тиф, малярия, сепсис, корь в период высыпания); некоторыми медикаментами (амидопирин, антипирин, ацетилсалициловая кислота, барбитураты, изониазид, мепротан, фенацетин, бутадиион, новокаиномид, индометацин, левамизол, сульфаниламиды, метициллин, триметоприм, инсектициды и др.), а также химиопрепаратами с выраженным

миелотоксическим действием (винбластин, циклофосфан, миелосан, 6-меркаптопурин и др.); лучевым воздействием.

Возможно усиленное разрушение гранулоцитов в периферической крови вследствие повышенной индивидуальной чувствительности к тому или иному фактору (иммуноаллергические и аутоиммунные агранулоцитозы). Агранулоцитоз может развиваться под действием не только антител к гранулоцитам, но и циркулирующих иммунных комплексов.

Для клинической картины характерны общая слабость, гингивит, стоматит, язвенно-некротическое поражение слизистых оболочек рта, глотки, желудочно-кишечного тракта, высокая температура тела, иногда умеренное увеличение печени, селезенки и регионарных лимфоузлов.

В периферической крови: лейкопения $(1-2) \times 10^9/\text{л}$ и ниже, относительный лимфоцитоз, гранулоцитопения (от 20 % до 0 гранулоцитов, с грубой токсической зернистостью), умеренная анемия, анизоцитоз, полихромазия. В тяжелых случаях – тромбоцитопения, сопровождающаяся геморрагическим синдромом. Картина костного мозга непостоянна – от незначительного функционального угнетения гранулоцитопоэза до выраженной гипоплазии гранулоцитарного ростка. Система красной крови и мегакариоцитарный аппарат поражаются редко.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Изменение количества лейкоцитов как сопутствующие реакции (лейкоцитоз, лейкопения).
2. Общая характеристика гемобластозов. Классификация, характерные особенности.
3. Лейкозы. Этиология, патогенез, клиническая картина, диагностика.
4. Лимфомы. Этиология, патогенез, клиническая картина, диагностика.
5. Эритремии. Этиология, патогенез, клиническая картина, диагностика.
6. Парапротейнемии. Этиология, патогенез, клиническая картина, диагностика.

7. Агранулоцитоз. Этиология, патогенез, клиническая картина, диагностика.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, изменение количества лейкоцитов как сопутствующие реакции (лейкоцитоз, лейкопения).
2. Записать классификацию гемобластозов.
3. Используя бланки учебных анализов, провести анализ изменений клеточного состава белой крови (устанавливать вид лейкоцитоза и лейкопении, оценивать индекс лейкоцитарного сдвига, определять основные гематологические симптомы, характерные для того или иного вида лейкозов).

7. Тема занятия: Диагностика патологии красного ростка системы крови.

Цель занятия: Знакомство с патологией красного ростка кроветворения, нарушениями метаболизма железа.

Перечень знаний и практических навыков:

- Знать определения, причины, механизмы возникновения, классификации и клинико-лабораторные проявления основных гематологических синдромов и заболеваний красного ростка системы крови.
- Уметь интерпретировать результаты гемограмм в норме и при различных заболеваниях системы кроветворения.
- Используя бланки учебных анализов, проводить анализ изменений клеточного состава красной крови.

Характеристики эритроцитов в гемоцитограме

Эритроциты – безядерные клетки, в цитоплазме содержат железосодержащий пигмент (гем) связанный белком (глобин) – гемоглобин, который связывает кислород или углекислый газ. Основная функция эритроцитов – обеспечение газообмена: доставка к тканям кислорода и удаление углекислого газа.

Кроме того эритроциты могут адсорбировать на своей поверхности самые различные вещества (аминокислоты, антигены, антитела, лекарственные вещества, токсины и т.д.) и транспортировать по всему организму; благодаря амфотерным свойствам гемоглобина эритроциты участвуют в поддержании pH крови.

Эритроциты имеют форму двояковогнутого диска (дискоциты). У здорового человека в крови может встречаться до 10 штук на 1000 клеток (‰) атипичные формы эритроцитов:

1. Эхиноцит ("волосатая клетка") – клетка с тонкими короткими выростами.
2. Акантоцит – клетка с грубыми толстыми шипиками на поверхности.
3. Мишеневидный эритроцит (кодоциты) – клетки с бледной тонкой периферией и центральным утолщением, содержащем скопление гемоглобина.

4. Планоцит – клетка с плоскопараллельными поверхностями.

5. Сфероцит – клетка шарообразной формы.

Увеличение атипичных форм эритроцитов больше 10% называется пойкилоцитозом и является патологическим признаком. Так, сфероцитоз наблюдается при некоторых формах наследственной анемии; эллиптоциты (эритроциты овальной формы) встречаются при мегалобластной и железодефицитной анемии, талассемиях и других заболеваниях; акантоциты и эхиноциты встречаются при поражениях печени, наследственных дефектах пируваткиназы и др.; мишеневидные эритроциты встречаются при талассемиях и других гемоглобинопатиях, интоксикации свинцом и др.; серповидные эритроциты – признак серповидноклеточной анемии.

При изменении кислотно-щелочного баланса крови в сторону закисления (от 7,43 до 7,33) происходит склеивание эритроцитов в виде монетных столбиков, либо их агрегация.

У здорового человека около 75% эритроцитов имеют диаметр 7 – 8 мкм (нормоциты), по 12% меньше 7 мкм (микроциты) и больше 8 мкм (макроциты). Нарушение данного соотношения по диаметру эритроцитов называется анизоцитозом и может быть по типу микроцитоза или макроцитоза. Анизоцитоз наблюдается при анемиях.

По степени зрелости среди эритроцитов различают зрелые эритроциты и ретикулоциты. Ретикулоциты – это только что вышедшие из красного костного мозга эритроциты; в цитоплазме имеют остатки органоидов, выявляющиеся при окраске специальными красителями в виде зерен и нитей, обуславливающие сетчатый рисунок – отсюда и название: ретикулоцит = "сетчатая клетка". Ретикулоциты в течение 1 суток после выхода из красного костного мозга созревают, теряют остатки органоидов и превращаются в зрелые эритроциты. Количество ретикулоцитов в норме 1 – 5%. Увеличение показателя свидетельствует об усилении эритроцитопоэза.

Эритроциты образуются в красном костном мозге под влиянием особого гормона почек эритропоэтина, функционируют в кровеносных сосудах, в

среднем живут около 120 суток, стареющие и поврежденные эритроциты разрушаются в селезенке. Железо гемоглобина погибших эритроцитов доставляется моноцитами в красный костный мозг и повторно используется в новых эритроцитах.

Эритроцитозы

Эритроцитоз – состояние, характеризующееся увеличением количества эритроцитов (выше $5,0 \times 10^{12}/л$ у женщин, более $5,5 \times 10^{12}/л$ у мужчин) и гемоглобина (выше 164 г/л у женщин и 172 г/л у мужчин) в единице объема крови, повышением гематокрита (соответственно выше 47 и 48%).

Гематокрит (Ht) – доля (выраженная в процентах) общего объема крови, которую составляют эритроциты.

Различают эритроцитозы абсолютные (истинные) и относительные (ложные).

Абсолютные эритроцитозы возникают в результате усиления эритропоэза и сопровождаются увеличением массы циркулирующих эритроцитов. Они бывают первичными и вторичными.

Первичные эритроцитозы представляют собой самостоятельные нозологические формы – болезни. К ним относятся:

1) эритремия (истинная полицитемия, болезнь Вакеза) – злокачественное заболевание, рассматриваемое в группе гемобластозов; при этом заболевании усиленная пролиферация клеток эритрона не связана с повышением концентрации эритропоэтина, а является результатом «внутреннего» дефекта, позволяющего пролиферирующим клеткам ускользать от нормальных регулирующих воздействий или избегать апоптоза;

2) «семейные» (наследуемые) эритроцитозы, проявляющиеся неопухоловой активацией пролиферации эритроидных клеток костного мозга.

Вторичные эритроцитозы являются симптомом того или иного заболевания. Чаще всего они развиваются при гипоксии и усилении процесса выработки эритропоэтинов (заболевания органов дыхания, сопровождающиеся дыхательной недостаточностью, врожденные пороки сердца, рак паренхимы почки и др.). При

этом имеют место умеренная полицитемическая гиперволемиа, повышение гематокрита, вязкости крови, артериального давления, может развиваться гипертрофия миокарда, нарушение ритма и сократительной функции сердца, кожный зуд, тромбгеморрагический синдром. Кроме эритроцитоза в периферической крови отмечается ретикулоцитоз.

Относительные эритроцитозы (ложные) развиваются вследствие уменьшения объема плазмы и сгущения крови без усиления эритропоэза. Причины относительного эритроцитоза: обезвоживание организма при усиленном потоотделении, ожогах, профузных поносах, рвоте и пр.

При ложных эритроцитозах ухудшаются реологические свойства крови, нарушается микроциркуляция, что способствует развитию стаза и тромбоза. Все перечисленные эритроцитозы являются патологическими.

К физиологическим эритроцитозам относятся эритроцитоз у жителей высокогорий, у новорожденных.

Эритропении

Уменьшение числа эритроцитов в единице объема крови называется эритропенией (менее $4,0 \times 10^{12}/л$ у мужчины и $3,7 \times 10^{12}/л$ у женщин).

Сниженное количество эритроцитов возможно при:

- всех вариантах анемий,
- после перенесенной кровопотери,
- в период беременности (наиболее выражено на поздних сроках),
- на фоне наличия хронического очага воспаления в организме,
- при избытке жидкости в организме – гипергидратация.

Анемия – группа клинико-гематологических синдромов, общим признаком которых является снижение концентрации гемоглобина в крови, чаще при одновременном уменьшении числа эритроцитов (или общего объема эритроцитов).

Общие лабораторные признаки анемии:

- 1) содержание гемоглобина меньше 100 г/л;
- 2) количество эритроцитов меньше $4 \times 10^{12}/л$;

При снижении содержания гемоглобина в крови до 70 – 80 г/л обнаруживаются начальные дистрофические явления в сердечной мышце. Если его уровень падает до 50 г/л, дистрофические явления имеют выраженный характер. Вследствие гипоксии в организме накапливаются недоокисленные продукты обмена и, в первую очередь, молочная кислота, уменьшается резервная щелочность крови, в тяжелых случаях наблюдается склонность к ацидозу, что еще больше ухудшает трофику тканей. Тяжелые анемии, сопровождающиеся значительными нарушениями тканевого обмена, несовместимы с жизнью.

Компенсаторные процессы в организме:

1. Возрастает интенсивность кровообращения – увеличивается ударный и минутный объем сердца; возникает тахикардия, нарастает скорость кровотока.

2. Происходит перераспределение крови – мобилизация из «депо» (печень, селезенка, мышцы), ограничивается кровоснабжение периферических тканей, за счет чего увеличивается кровоснабжение жизненно важных органов.

3. Усиливается утилизация кислорода тканями; возрастает роль анаэробных процессов в тканевом дыхании.

4. Стимулируется эритропоэтическая функция костного мозга.

Классификация анемий

1. **По цветовому показателю (ЦП).** В норме ЦП равен 0,85 – 1,05. В зависимости от него различают такие анемии:

- Гипохромная анемия (ЦП < 0,85):
 - железодефицитная анемия,
 - талассемии.
- Нормохромная анемия (ЦП 0,85 – 1,05):
 - гемолитические анемии (когда скорость разрушения эритроцитов превышает скорость их продукции),
 - постгеморрагическая (как результат потери крови вследствие кровотечения или кровоизлияния),
 - неопластические заболевания костного мозга,

- апластические анемии,
- внекостномозговые опухоли,
- анемии вследствие снижения выработки эритропоэтина.

- Гиперхромная анемия (ЦП > 1,1):

- витамин В12-дефицитная анемия,
- фолиеводефицитная анемия,
- миелодиспластический синдром,
- лекарственные анемии (как правило, гемолитические).

2. По степени тяжести.

- Лёгкая – уровень гемоглобина ниже нормы, но выше 90 г/л.
- Средняя – гемоглобин в пределах 90 – 70 г/л.
- Тяжёлая – уровень гемоглобина менее 70 г/л.

3. По способности костного мозга к регенерации.

Основным признаком такой регенерации является увеличение количества ретикулоцитов в периферической крови. Норма – 0,5 – 2%.

- Арегенераторная (к примеру, апластическая анемия) – характерно отсутствие ретикулоцитов.
- Гипорегенераторная (витамин В12-дефицитная анемия, железодефицитная анемия) – характерно количество ретикулоцитов ниже 0,5%.
- Норморегенераторная или регенераторная (постгеморрагическая) – количество ретикулоцитов в норме (0,5 – 2%).
- Гиперрегенераторная (гемолитические анемии) – количество ретикулоцитов более 2%.

4. Патогенетическая классификация. Основана на механизмах развития анемий как патологического процесса.

- Дисгемопоэтические анемии – анемии, связанные с нарушением функции красного костного мозга.
- Постгеморрагические (связаны с острой или хронической кровопотерей).
- Гемолитические (связаны с повышенным гемолизом).

5. Этиологическая классификация.

- Анемии при хронических воспалениях:
 - При инфекциях.
 - При коллагенозах.
- Мегалобластные анемии:
 - Пернициозная анемия.
 - Гемолитический брадикардит.

Как правило, страдающие анемией отмечают проявления, обусловленные развитием анемической гипоксии. При лёгких формах это может быть слабость, быстрая утомляемость, общее недомогание, а также снижение концентрации внимания. Люди с более выраженной анемией могут жаловаться на одышку при незначительной или умеренной нагрузке, сердцебиения, головную боль, шум в ушах, могут также встречаться нарушения сна, аппетита, полового влечения. При очень сильной анемии, или при наличии сопутствующей патологии, возможно развитие сердечной недостаточности. Часто встречаемым диагностически важным симптомом умеренной или выраженной анемии является бледность (кожных покровов, видимых слизистых и ногтевых лож). Проявления острых и тяжёлых анемий всегда более выражены, чем хронических и средней тяжести.

Чаще всего наблюдается железodefицитная анемия.

Железodefицитная анемия (ЖДА) обусловлена дефицитом железа в сыворотке крови, костном мозге и депо, в результате чего нарушается образование гемоглобина, а затем и эритроцитов.

Основные причины железodefицитных анемий:

- 1) хронические кровопотери;
- 2) ахлоргидрия, ахилия, рак, резекция желудка, при которых нарушаются процессы ионизации железа в желудке и, соответственно, всасывание экзогенного железа;
- 3) дуодениты и энтериты, ведущие к нарушению всасывания экзогенного железа в двенадцатиперстной кишке и других отделах тонкой кишки;
- 4) недостаточное поступление железа с пищей;

5) беременность и лактация, при которых наблюдается повышенное потребление железа и, нередко, истощение его депо в печени.

Синдромы при ЖДА:

1. Циркуляторно-гипоксический синдром (при достаточной выраженности анемии и кислородного голодания тканей); жалобы на слабость, шум в ушах, сердцебиение, одышку при физической нагрузке, ноющие боли в области сердца.

2. Поражения эпителиальных тканей (тканевой сидеропенический синдром) гастроэнтерологические расстройства – извращения вкуса, снижения и извращения аппетита (желание есть мел, сухие макароны, зубной порошок), отмечаются затруднение при глотании, неопределенные болевые ощущения в эпигастрии, трофические нарушения кожи и ее дериватов – сглаженность сосочков языка, сухость и шелушение кожных покровов, ломкость ногтей, сухость и выпадение волос.

3. Гематологический (анемия гипохромного типа и признаки дефицита железа) – сниженный уровень гемоглобина; микроцитоз (увеличение количества эритроцитов малого диаметра) и гипохромия эритроцитов; снижение цветового показателя, среднего содержания гемоглобина в эритроците (весовое и процентное); содержание ретикулоцитов в норме или повышено; изменяются показатели обмена железа: снижается содержание свободного железа в сыворотке крови и насыщение трансферрина железом, повышается ОЖСС (общая железосвязывающая способность сыворотки).

В организме здорового человека в среднем содержится 3 – 5 г железа, 73,9% которого входит в состав гемоглобина (Hb), 3,3% – миоглобина и 16,4% находится в запасах (депо) в виде ферритина (80%) и гемосидерина. Физиологические потери железа составляют 0,6 – 1,2 мг/сут у мужчин и 1,5 – 2 г/сут у женщин и компенсируются за счет железа попадающего с пищей.

В пище при обычном питании содержится около 14 мг железа или в виде составляющей гема (мясо, рыба), или негемового железа (овоци, фрукты). Стенки кишок содержат фермент гемоксигеназы, который расщепляет гем пищевых

продуктов на билирубин, оксид углерода (II) и ионы железа. Органическое железо (Fe^{+2}) хорошо всасывается (до 20 – 30%), а неорганическое – (Fe^{+3}) – не более 5%. Всего за сутки в верхних отделах тонкой кишки абсорбируется 1 – 2 мг железа, или 8 – 15% от того, что содержится в пище. Всасывание железа регулируется клетками кишечника – энтероцитами. Абсорбция железа из просвета кишечника происходит с помощью белка – мукозного апотрансферина, который синтезируется в печени и поступает в энтероциты.

Транспорт от кишечной стенки до предшественников эритроцитов и клеточного депо происходит с помощью белка плазмы – трансферрина, который синтезируется преимущественно в печени. Каждая молекула трансферрина может связать два атома железа. Мерой количества свободного трансферрина в плазме, который способен полностью насыщаться железом, есть общая железосвязывающая способность. Железо, не использованное для синтеза гема в эритроцитах, переносится трансферрином в резервный пул, обеспечиваемый ферритином (растворимая активная резервная фракция железа, сосредоточенная в гепатоцитах печени, в макрофагах костного мозга и селезенке, в эритроцитах и сыворотке крови (в концентрации около 100 нг/мл) и гемосидерином (малорастворимое вещество, накапливающееся в печени (в клетках Купфера) и в костном мозге (в макрофагах).

Таким образом, патогенез железодефицитных состояний схематично можно отобразить следующим образом:

- 1) дефицит железа → нарушение синтеза гема и гемоглобина → анемия;
- 2) дефицит железа → нарушение синтеза гема → нарушение образования цитохромов → нарушения клеточного дыхания (нарушение утилизации кислорода) → тканевая гипоксия;
- 3) дефицит железа → нарушение синтеза гема → уменьшение активности каталазы → нарушения функции антиоксидантных систем → активация свободнорадикального окисления → повреждения клеток → гемолиз эритроцитов и развитие дистрофических изменений в клетках;

4) дефицит железа → нарушение синтеза гема → уменьшения синтеза миоглобина → ухудшение приспособления клеток к гипоксии.

Показатели метаболизма железа при различных видах анемий представлены в табл. 1.

Таблица 1

Показатели обмена железа при различных видах анемий

| Показатели метаболизма железа | Референтная величина | Железодефицитная анемия | Инфекционная, опухолевая анемия | Нарушение синтеза гемма и глобина |
|--------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--|--|
| Железо сыворотки крови, мкг/дл | | | | |
| мужчины | 65 – 175 | < 50 | < 50 | > 180 |
| женщины | 50 – 170 | < 40 | < 40 | > 170 |
| ОЖСС, мкг/дл | 250 – 425 | > 400 | 180 | 200 |
| Коэффициент насыщения, % | 15 – 54 | < 15 | < 15 | > 60 |
| Ферритин, мкг/л | 20 – 250 | < 10 – 12 | > 150 | 160 – 1000 |

Железодефицитные состояния (гипосидероз, железодефицитная анемия) – одно из наиболее распространенных заболеваний человека.

К современным методам ранней диагностики гипосидероза относят определение концентрации железа в сыворотке, общей железосвязывающей способности сыворотки (ОЖСС), трансферрина и ферритина в сыворотке.

Избыточное содержание железа в организме носит название «сидероз» или «гиперсидероз», «гемосидероз». Он может иметь местный и генерализованный характер. Различают экзогенный и эндогенный сидероз.

Экзогенный сидероз нередко наблюдают у шахтёров, участвующих в разработке красных железных руд, у электросварщиков (отложения железа в ткани лёгких). Эндогенный сидероз чаще всего имеет гемоглобиновое

происхождение и возникает в результате повышенного разрушения этого пигмента крови в организме.

Особой формой наследственных отложений гемосидерина, возникающего из ферритина в результате нарушения клеточного метаболизма, является гемохроматоз. При этом заболевании особенно большие отложения железа наблюдаются в печени, поджелудочной железе, почках, в клетках системы мононуклеарных фагоцитов, слизистых железах трахеи, в щитовидной железе, эпителии языка и мышцах.

Наиболее известен первичный, или идиопатический, гемохроматоз – наследственное заболевание, для которого характерны нарушение обмена железосодержащих пигментов, повышенное всасывание в кишечнике железа и накопление его в тканях и органах с развитием в них выраженных изменений.

В12 дефицитная анемия обусловлена нарушением синтеза ДНК при недостатке витамина В12 – цианкобаламина, который содержится преимущественно в продуктах животного происхождения (мясо, печень, почки, молоко, яйца, сыр). Недостаток витамина В12 может быть вызван недостаточным его поступлением с пищей, например, у вегетарианцев, или нарушением его усвоения в желудочно-кишечном тракте при заболеваниях желудка, тонкого кишечника (дивертикулы, глисты), лечении противосудорожными средствами, при приеме оральных контрацептивов. Повышение потребности в витамине В12 наблюдается у беременных женщин, кормящих матерей, раковых больных.

Диагностика В12 дефицитной анемии основана на выявлении анемии и обнаружении в крови гигантских эритроцитов, эритроцитов с остатками ядер (тельца Жолли, кольца Кебо) и появлении гиперсегментированных нейтрофилов. В крови может быть снижена концентрация витамина В12.

Фолиеводефицитная анемия обусловлена недостатком витамина В9 – фолиевой кислоты. В организм витамин поступает с такой пищей как печень говяжья и куриная, салат, шпинат, спаржа, томаты, дрожжи, молоко, мясо. Фолиевая кислота способна накапливаться в печени. Недостаток фолиевой

кислоты возможен при вскармливании детей козьим молоком, при длительной термической обработке пищи, у вегетарианцев, при недостаточном или несбалансированном питании, при повышенной потребности у беременных женщин, кормящих матерей, недоношенных детей, подростков, раковых больных. К фолиеводефицитной анемии приводит наличие хронической почечной недостаточности, заболеваний печени, алкоголизм, прием оральных контрацептивов и недостаток витамина В12.

Симптомы фолиеводефицитной анемии связаны, в основном, с нарушениями работы желудочно-кишечного тракта. А в системе крови происходят такие же изменения, как и при В12 – дефицитной анемии.

"Анемии хронических заболеваний" (АХЗ) – это анемии, сопровождающие инфекционные, ревматические и опухолевые заболевания. АХЗ занимают по распространенности второе место после железодефицитной анемии (ЖДА). При АХЗ количество эритроцитов и гемоглобина снижено, но объем и содержание гемоглобина в эритроците нормальные. Реже эти показатели бывают снижены. Количество ретикулоцитов нормальное или уменьшенное. Изменения метаболизма железа характеризуются перераспределительным дефицитом железа: снижением железа в плазме, железосвязывающей способности, трансферрина при повышении запасов железа, которые оцениваются по уровню ферритина. Ферритин относится к острофазным белкам, поэтому повышенный уровень сывороточного ферритина при АХЗ может отражать не только запас железа в организме, но и явиться проявлением ответа организма на острое воспаление. Определение ферритина проводится совместно с определением содержания С-реактивного белка, уровень которого отражает наличие и степень воспаления. В последнее время для дифференциальной диагностики ЖДА и АХЗ используется новый тест – определение растворимых трансферриновых рецепторов, уровень которых повышается при железодефицитной анемии.

Острые постгеморрагические анемии связаны с острой (кровотечение, ранение) кровопотерей. Диагностика основана на клинической симптоматике. Лабораторные показатели изменяются через 4 – 5 дней.

Гипопластические анемии обусловлены нарушением кроветворения в костном мозге.

Гемолитические анемии – это группа анемий, при которых процессы разрушения эритроцитов преобладают над процессами их образования.

Общим признаком всех гемолитических анемий является желтуха. Желтуха обусловлена поступлением в кровь, а из крови в мочу и кал избыточного количества билирубина, который появляется вследствие разрушения эритроцитов. Помимо желтухи наблюдается увеличение печени и селезенки, темный цвет мочи и кала, лихорадка, ознобы, боли.

Усиленное разрушение эритроцитов, или гемолиз, как причина снижения количества эритроцитов в крови встречается при наследственных заболеваниях в результате нарушения строения мембраны эритроцита (микросфероцитоз, овалоцитоз), гемоглобинопатиях (талассемия, серповидно-клеточная анемия); приобретенные причины гемолиза – болезнь Маркиафава-Микели, механическое повреждение мембраны эритроцитов (искусственный клапан сердца, гигантские размеры селезенки у больных с циррозом), токсическое повреждение мембраны эритроцитов (ядовитые грибы, укус змеи, соли тяжелых металлов).

Гемоглобинопатии (ГП) – это наследственные гемолитические анемии, обусловленные нарушением синтеза гемоглобина (Hb) человека, приводящего либо к появлению в эритроцитах аномальных гемоглобинов, не встречающихся у здоровых людей, либо к нарушению скорости синтеза полипептидных цепей гемоглобина с неизменной первичной архитектурой молекулы гемоглобина.

Гемоглобинопатии подразделяются на две основные категории: серповидноклеточную анемию и талассемии.

Серповидноклеточная анемия характеризуется изменением формы красных кровяных клеток из ровной, кольцевидной в серповидную форму, или

форму в виде полумесяца. Такие деформированные клетки теряют пластичность и могут закупоривать мелкие кровеносные сосуды, нарушая кровоток. Это состояние ведет к сокращению срока жизни красных кровяных клеток и последующей анемии, часто называемой серповидноклеточной анемией. Низкие уровни содержания кислорода в крови и закупорка кровеносных сосудов у людей с серповидноклеточной анемией могут приводить к синдромам хронической острой боли, тяжелым бактериальным инфекциям и некрозу (отмиранию тканей).

Талассемии – это тоже наследственные нарушения крови. У людей с талассемией не может вырабатываться достаточно гемоглобина, содержащегося в красных кровяных клетках. Если в красных кровяных клетках недостаточно гемоглобина, кислород не достигает всех частей организма. Органам начинает не хватать кислорода, и они не могут нормально функционировать. Существует два основных типа талассемии – альфа и бета, названные так по двум белковым цепям, из которых состоит нормальный гемоглобин. Как альфа-, так и бета-талассемии имеют легкую и тяжелую формы.

В эритроцитах здоровых людей содержатся следующие нормальные гемоглобины: HbA1 (альфа²-бета²) – 96 – 98%, HbA2 (альфа²- бета²) – 2 – 3%, HbF (альфа²-гамма²) – 1 – 2%, различающихся по аминокислотному составу глобина, физическим свойствам и сродству к кислороду. HbF в концентрации до 10% можно обнаружить при апластической, мегалобластной анемиях, лейкемии; при большой β-талассемии он может составлять 60 – 100% общего Hb, при малой – 2 – 5%. Повышение фракции HbA2 (4 – 10%) характерно для β-талассемии. Основной метод выявления патологических форм Hb – метод электрофореза.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Характеристики эритроцитов в гемоцитограме.
2. Пойкилоцитоз при различных патологических состояниях.
3. Эритроцитозы. Характеристика. Причины.

4. Эритропении. Характеристика. Причины.
5. Анемии. Классификация, патогенез, клиническая картина, диагностика.
6. Компенсаторные процессы, происходящие в организме человека при анемиях.
7. Железодефицитная анемия. Определение. Этиопатогенез. Синдромы. Лабораторная диагностика.
8. Метаболизм железа.
9. Нарушения метаболизма железа. Этиопатогенез. Лабораторная диагностика.
10. В12-дефицитная анемия. Определение. Этиопатогенез. Лабораторная диагностика.
11. Фолиеводефицитная анемия. Определение. Этиопатогенез. Лабораторная диагностика.
12. Анемия хронических заболеваний. Определение. Этиопатогенез. Лабораторная диагностика.
13. Гемолитическая анемия. Определение. Этиопатогенез. Лабораторная диагностика.
14. Гемоглинопатии. Определение. Этиопатогенез. Лабораторная диагностика.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, характеристики эритроцитов в гемоцитогrame.
2. Записать основные эритроцитарные показатели крови.
3. Записать классификацию анемий.
4. Используя бланки учебных анализов, провести анализ изменений клеточного состава красной крови (устанавливать наличие эритроцитоза и анемии, давать характеристику анемии), сопоставить изменения "красной" и "белой" крови, давая общее заключение по анализу.

8. Тема занятия: Биохимические методы исследования.

Цель занятия: Изучить аналитические методы и методы разделения применяющиеся в биохимических исследованиях биологических жидкостей.

Перечень знаний и практических навыков:

- Иметь представление о биохимических методах исследования, которые применяются в диагностической медицине.
- Значение и принцип основных биохимических методов, применяемых в медицине.
- Освоить методы биохимического исследования аналитические методы и методы разделения.

Биохимические исследования проводятся для получения информации о многочисленных химических и физико-химических процессах, протекающих в клетках и тканях живых организмов в норме и при патологии.

Клинические биохимические тесты составляют свыше одной трети всех лабораторных клинических исследований.

Чаще всего биохимические лаборатории выполняют «**базовые**», или «**основные**», исследования – наиболее часто требуемые врачами тесты. Распространенными являются определенные комбинации биохимических исследований (мочевина и электролиты, тесты функции печени, газы крови).

Не каждая лаборатория оборудована для выполнения всех возможных биохимических тестов. Ряд специальных исследований для диагностики редких заболеваний может выполняться только в крупных лабораториях или диагностических центрах.

Еще одна группа биохимических исследований связана с необходимостью срочного принятия решения клиницистами в экстренных ситуациях – это так называемые **ургентные тесты**, или **тесты при неоложных состояниях**.

При различных патологических состояниях происходят изменения химического состава в клетках, тканях, биологических жидкостях и выделениях. Наиболее часто биохимическому анализу подвергают кровь, мочу, кал, слюну, ликвор, желчь и

желудочный сок. Реже исследуют химический состав красного костного мозга, околоплодной жидкости, пота, рвотных масс, волос, ногтей и спермы.

Химический состав биологического материала может изменяться как количественно (увеличение или понижение содержания каких-либо веществ, нарушение соотношения между ними), так и качественно (выявление отсутствующих или не определяющихся в норме веществ). В связи с этим биохимический анализ в некоторых случаях проводят прицельно, определяя уровень вещества в исследуемом материале или выявляя только его присутствие.

Аналитическая химия – это наука о методах определения химического состава вещества и его структуры.

Изучение состава веществ, проводится с помощью химического анализа. Химический анализ может быть:

- Количественным.
- Полуколичественным.
- Качественным.

Количественное определение исследуемых компонентов проводится обычно «мокрым» анализом, когда и исследуемые вещества и химические реагенты находятся в растворенном состоянии.

Для полуколичественных и иногда количественных определений используется также метод «сухого» анализа, когда на специальную бумагу или пленку в определенных пропорциях наносятся химические реагенты, необходимые для анализа, высушиваются и стабилизируются. После нанесения точного объема биологической жидкости (кровь, сыворотка и др.) реагенты активируются и химическая реакция протекает так же, как и при «мокрым» анализе. Разработанные для этих целей тест-полоски, имеют довольно сложное строение и состоят из нескольких слоев. В наружном слое происходит отделение сыворотки от форменных элементов. Сыворотка затем проникает в нижележащие слои, содержащие химические реагенты, которые отделены друг от друга. Изменение окраски продуктов реакции регистрируется с помощью отражательного фотометра.

Для качественной оценки или полуколичественных определений широко используются диагностические полоски, которые позволяют определять в биологических жидкостях различные вещества (белки, углеводы, кетоновые тела, желчные пигменты и др.). Полоску опускают в биологическую жидкость, затем извлекают, подсушивают фильтровальной бумагой и прикладывают к цветной стандартной шкале. Сравнивают окраски и делают вывод о наличии определенных веществ и их примерном содержании.

В Аналитической химии в зависимости от вида анализа различают:

- методы разделения;
- методы определения (обнаружения);
- гибридные, сочетающие методы первых двух групп.

В методах разделения основная задача – отделение мешающих компонентов или выделение определяемого компонента в виде, пригодном для количественного определения.

В методах определения содержание анализируемого компонента находят в пробе без предварительного разделения.

Методы определения подразделяют на:

- химические методы анализа (гравиметрический анализ, титриметрия);
- физико-химические методы анализа (например, электрохимический, фотометрический, кинетический, хроматографический);
- физические методы анализа (спектральные, ядерно-физические и др.).

Из физико-химических методов в клинической биохимии чаще всего используют оптические методы – колориметрию, спектрофотометрию, нефелометрию, атомно-абсорбционную фотометрию, флюорометрию.

Оптические методы исследования веществ основаны на способности этих веществ порождать оптическое излучение или взаимодействовать с ним.

Фотометрия – совокупность оптических методов и средств измерения фотометрических величин светового потока. Основным понятием фотометрии является поток излучения, смысл которого в мощности переносимого электромагнитного (оптического) излучения.

Спектрофотометрия – определение зависимости фотометрических величин от длины волны излучения.

Спектроскопия или эмиссионный спектральный анализ – определение излучательной способности веществ в зависимости от длины волны излучения. В аналитической химии и клинической лабораторной диагностике широкое применение нашли фотометрические методы количественного анализа, основанные на переведении определяемых компонентов в поглощающие свет соединения с последующим определением их количеств путем измерения светопоглощения растворов.

По окраске растворов окрашенных веществ можно определять концентрацию компонентов при помощи фотоэлектрических приемников оптического излучения (фотоприемников) – приборов, превращающих световую энергию в электрическую. Если измерение ведется без выделения узкого диапазона длин волн, то есть измеряются характеристики всего светового потока, то такой метод анализа часто называется колориметрическим. Если же выделяется характерный для поглощения данным веществом оптический диапазон и измерение проводится на определенной длине волны, тогда говорят о собственно фотометрическом методе анализа. Фотометрический метод является более объективным методом, чем колориметрический, поскольку результаты его меньше зависят от поглощения света другими (интерферирующими) окрашенными веществами.

Фотометрический анализ – один из самых старых и распространенных физико-химических методов, для него требуется относительно простое оборудование, в то же время он характеризуется высокой чувствительностью и возможностью определения большого количества органических веществ. Открытие все новых и новых реагентов, образующих окрашенные соединения с неорганическими ионами и органическими веществами, разработка принципов сопряженных реакций делает в настоящее время применение этого метода почти неограниченным.

Фотометрический метод анализа может применяться для большого диапазона определяемых концентраций. Его используют как для определения

основных компонентов различных сложных веществ, так и для определения микропримесей в объектах.

Комбинирование с некоторыми методами разделения и обогащения – хроматографическим, экстракционным – позволяет на несколько порядков повысить чувствительность фотометрических методов.

Фотометрические свойства растворенного вещества характеризуются коэффициентом пропускания T (τ), коэффициентом отражения R (ρ), и коэффициентом поглощения A (α), которые для одного и того же вещества связаны соотношением $T + R + A = 1$. Определение безразмерных величин T , R и A выполняется с помощью фотометров (приборов для измерения какой-либо фотометрической величины) путем регистрации реакций приемника оптического излучения на соответствующие потоки излучения. При этом в рутинной лабораторной практике принято обозначать приборы, регистрирующие поглощение света веществом, фотометрами, отражение – отражательными фотометрами.

Фотометрические методы применяются также в тех случаях, когда изучается способность веществ рассеивать (нефелометрия) и пропускать излучение (турбидиметрия), переизлучать поглощенное излучение (флуориметрия), изменять степень поляризации излучения при прохождении его через оптически активные вещества (поляриметрия).

Кроме того, одним из важных разделов физической оптики является рефрактометрия, изучающая показатели преломления оптического излучения твердых, жидких и газообразных веществ в зависимости от длины волны излучения.

Названные оптические методы применяются для изучения состояния биологических систем и их изменения в процессах ассоциации-диссоциации, взаимодействия с другими молекулами, образования и распада комплексов фермент-субстрат, антиген-антитело, белок-липид, белок-нуклеиновая кислота; фотофизических и фотохимических процессов и т.д. Высокая чувствительностью, точность, быстродействие и удобство использования для рутинных исследований определяют широкое применение оптических методов в клинической лабораторной диагностике.

Электрофорез и хроматография

В процессе проведения биохимического анализа при клинико-лабораторных исследованиях часто возникает необходимость предварительного выделения анализируемых веществ, отделения их от других компонентов, находящихся в исследуемом биологическом материале. Для этих целей чаще всего используются такие физико-химические методы, как электрофорез и хроматография.

Электрофорез – процесс разделения заряженных частиц в электрическом поле. Многие биологически важные молекулы (белки, аминокислоты, нуклеиновые кислоты и др.) имеют в своем составе ионизирующие группы. Поэтому в биологических жидкостях (крови, лимфе и др.) они существуют в виде катионов и анионов. Помимо этого молекулы имеющие примерно одинаковый заряд могут отличаться молекулярными массами и отношением заряда к массе. На этих различиях и основано разделение ионов при движении их в растворе под действием электрического поля.

Скорость перемещения зависит от величины заряда, а также в ряде случаев, от размера и формы молекул. Так как в большинстве случаев молекулы отличаются по своим физическим и химическим свойствам то очень немногие из них имеют одинаковую электрофоретическую подвижность. Скорость движения частиц (см/с) при напряженности электрического поля 1 В/см называется электрофоретической подвижностью.

В зависимости от способа проведения электрофореза его делят на:

- свободный или фронтальный (электрофоретическое разделение осуществляется в водной фазе);
- зональный (электрофорез на поддерживающей среде, когда разделение осуществляется на каком-либо инертном носителе – бумага, асбестовые пластины, целлюлоза, агаровый, крахмальный и полиакриламидный гели и др.).

Суть зонального электрофореза заключается в том, что раствор смеси веществ подлежащих разделению вводят на определенный участок носителя, пропитанного электролитом. Биологический материал, подлежащий электрофоретическому

разделению, растворяют или суспензируют в буфере, чтобы обеспечить проведение электрического тока, этим же буфером насыщают и носитель. В растворе между электродами ток обусловлен ионами буфера и образца, в остальной части цепи – электронами. После снятия электрического поля ионы исследуемой смеси распределяются в соответствии с их электрофоретической подвижностью.

В клиничко-лабораторных исследованиях чаще используется зональный электрофорез на агаре или полиакриламидном геле. При наложении электрического поля частицы подлежащей разделению смеси придут в состояние направленного движения (будут двигаться к противоположно заряженному полюсу) и распределятся на носителе в виде отчетливых зон, которые легко обнаружить соответствующим аналитическим методом.

Важными характеристиками процесса зонального электрофореза являются градиент потенциала (В/см) и сила тока, приходящаяся на 1 см поперечного сечения полосы (плотность тока – мА/см).

Под градиентом потенциала понимают падение напряжения на 1 см носителя расположенного между электродами.

В зависимости от градиента потенциала различают:

- низковольтный электрофорез (5 – 15 В/см) – используется для разделения высокомолекулярных соединений типа белков, липопротеинов, гликопротеинов и др.,
- высоковольтный (более 50 В/см) – используется для разделения низкомолекулярных веществ, типа аминокислот, их производных и др. Так как различие в заряде и молекулярной массе у таких веществ невелико, то нужен большой градиент потенциала, чтобы произошло эффективное разделение частиц.

В зависимости от целей исследования электрофорез делят на:

- аналитический;
- препаративный.

В клиничко-биохимических исследованиях используют обычно аналитический электрофорез, который позволяет работать с очень небольшими количествами исследуемого вещества и вести их количественное определение. В тех случаях, когда

требуется получить большое количество изучаемого вещества, необходимого для дальнейших исследований используют препаративный вариант электрофореза.

В настоящее время для анализа биологических смесей все шире используется капиллярный электрофорез, при котором электрофоретическое разделение проводится в тонких капиллярах диаметром 25 – 200 мкм и длиной 10 – 100 см, заполненных буферным раствором. Под действием электрического поля (электрофорез проводится при напряжении 10000 – 30000 В) в капилляре создается электроосмотический поток, направленный к отрицательному полюсу, вместе с которым перемешаются и компоненты подлежащие разделению. В зависимости от заряда и массы скорость их движения будет различной, что приводит к фракционированию смеси. В концевой точке капилляра разделенные компоненты количественно определяют, используя различные оптические детекторы. Близким к электрофорезу является метод изоэлектрического фокусирования, когда разделение белков и некоторых других анализируемых веществ идет в зависимости от величины их изоэлектрических точек.

Изоэлектрической точкой называют такое состояние белковой молекулы, при котором ее суммарный заряд равен нулю. В методе изоэлектрического фокусирования вначале между электродами устанавливают градиент рН с помощью веществ особой химической природы, получивших название амфолитов-носителей. Заряженные молекулы белков в ходе опыта будут двигаться в направлении противоположно заряженного электрода в соответствии с их действительным зарядом. Так как молекулы белков амфотерны, то при перемещении в градиенте рН их суммарный заряд будет меняться до тех пор, пока он не станет равным 0. Это произойдет в том месте, где величина рН будет равна изоэлектрической точке. Поэтому молекулы с одинаковой изоэлектрической точкой сконцентрируются в одной узкой зоне.

Хроматография

Хроматография – это метод разделения и определения веществ, основанный на распределении компонентов между двумя фазами – подвижной и неподвижной. Неподвижной (стационарной) фазой служит твердое пористое

вещество (часто его называют сорбентом) или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество. Подвижная фаза представляет собой жидкость или газ, протекающий через неподвижную фазу, иногда под давлением.

Компоненты анализируемой смеси (сорбаты) вместе с подвижной фазой передвигаются вдоль стационарной фазы. Ее обычно помещают в стеклянную или металлическую трубку, называемую колонкой. В зависимости от силы взаимодействия с поверхностью сорбента (за счет адсорбции или по какому-либо другому механизму) компоненты будут перемещаться вдоль колонки с разной скоростью. Одни компоненты останутся в верхнем слое сорбента, другие, в меньшей степени взаимодействующие с сорбентом, окажутся в нижней части колонки, а некоторые и вовсе покинут колонку вместе с подвижной фазой (такие компоненты называются неудерживаемыми, а время их удерживания определяет “мертвое время” колонки). Таким образом происходит быстрое разделение сложных смесей компонентов. Следует подчеркнуть следующие достоинства хроматографических методов:

1.Разделение носит динамический характер, причем акты сорбции-десорбции разделяемых компонентов повторяются многократно. Этим обусловлена значительно большая эффективность хроматографического разделения по сравнению со статическими методами сорбции и экстракции.

2.При разделении используют различные типы взаимодействия сорбатов и неподвижной фазы: от чисто физических до хемосорбционных. Это обуславливает возможность селективного разделения широкого круга веществ.

3.На разделяемые вещества можно накладывать различные дополнительные поля (гравитационное, электрическое, магнитное и др.), которые, изменяя условия разделения, расширяют возможности хроматографии.

4.Хроматография – гибридный метод, сочетающий одновременное разделение и определения нескольких компонентов.

5. Хроматография позволяет решать как аналитические задачи (разделение, идентификация, определение), так и препаративные (очистка,

выделение, концентрирование). Решение этих задач можно сочетать, выполняя их в режиме “on line”.

Методы хроматографического анализа различаются:

- по агрегатному состоянию системы, в которой проводится разделение - на газовую и жидкостную;
- по механизму разделения - на адсорбционную, распределительную, ионообменную, гель-хроматографию, аффинную и др.

В ряде случаев разделение оказывается результатом нескольких одновременно протекающих процессов с различными механизмами. Это приводит к образованию хроматограммы смешанного типа, но один из процессов всегда является доминирующим.

В газовой хроматографии подвижной фазой является газ. В зависимости от состояния неподвижной фазы газовая хроматография подразделяется на газо-адсорбционную, когда неподвижной фазой является твердый адсорбент и газо-жидкостную, когда неподвижной фазой является жидкость, или точнее пленка жидкости на поверхности частиц твердого адсорбента.

Жидкостная хроматография основана на адсорбции твердым веществом, играющим роль неподвижной фазы, определяемых компонентов, находящихся в растворенном состоянии.

В основе адсорбционной хроматографии лежит различная сорбируемость разделяемых веществ на твердом сорбенте в соответствии с их сродством к адсорбенту. При этом сорбируемость растворителя должна быть незначительной по сравнению с таковой анализируемой смеси. Процесс адсорбции зависит от свойства адсорбента, адсорбируемых соединений, растворителя. В зависимости от этих свойств вещества, подлежащие хроматографическому разделению, образуют адсорбционный ряд выражающий относительное адсорбционное сродство его членов к адсорбенту. Образующееся в колонке адсорбента зональное распределение веществ соответствует их положению в адсорбционном ряду. В качестве адсорбентов в адсорбционно-жидкостной хроматографии применяются

органические и неорганические вещества: сахароза, крахмал, оксид алюминия, силикагель, активированный уголь и др.

Ионообменная хроматография основана на способности некоторых твердых веществ (ионитов) обмениваться ионами с подлежащими разделению веществами. Применяемые в ионообменной хроматографии иониты могут быть как органическими, так и неорганическими. Способность к ионному обмену определяется строением ионита, представляющего собой каркас, на котором закреплены активные группы ($-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{NH}_3\text{Cl}$, $-\text{NH}_2\text{Cl}$ и др.). В зависимости от обмена катионов или анионов иониты делят на катиониты, аниониты и амфолиты. На принципах ионообменной хроматографии основано разделение аминокислот в аминокислотных анализаторах.

Распределительная хроматография основана на распределении компонентов разделяемой смеси между несмешивающимися фазами. Образующая неподвижную фазу жидкость находится на поверхности или в порах твердого носителя, на который наносится смесь веществ, подлежащих разделению. Затем создают ток подвижного растворителя. Чем лучше вещество растворимо в жидкости, играющей роль подвижной фазы, тем дальше оно продвинется по направлению тока растворителя. Вещества, плохо растворимые в подвижной фазе, расположатся ближе к точке нанесения. В зависимости от техники выполнения распределительная хроматография выполняется как колоночная, бумажная или тонкослойная. Методика распределительной хроматографии в колонках аналогична адсорбционной или ионообменной: вначале в колонку с носителем и закрепленным на нем неподвижной фазой вводят небольшой объем раствора смеси компонентов и затем промывают колонку подвижным растворителем.

При бумажной хроматографии разделение проводят на полосах бумаги, где роль неподвижной фазы играет вода, удерживаемая гидрофильными целлюлозными волокнами бумаги, а подвижной фазой является какой-либо органический растворитель. В каждый момент имеет место определенное перераспределение разделяемых компонентов между слоем органического растворителя и водой. В результате одни вещества движутся быстрее вслед за фронтом органического

растворителя, другие в той или иной степени отстают, а некоторые вообще остаются на стартовой линии.

При тонкослойном варианте разделение идет в тонком слое носителя. Чаще всего для этих целей используются пластинки из силикагеля (например, Silufol) широко используемые для фракционирования липидов, аминокислот и других биосубстратов.

Гель-хроматография основана на различии в размерах и молекулярных массах белков и других макромолекул, являющихся важнейшей характеристикой молекулы. В качестве материала-носителя в гель-хроматографии используется сшитый декстран (сефадекс), сшитый полиакриламид (биогель Р) и агароза. Они получили широкое распространение как в аналитической, так и в препаративной лабораторной работе, а также в производстве, в химической и биологической промышленности.

Колонка с сефадексом действует по принципу «молекулярного сита». Молекулы большие, чем самые крупные поры разбухшего сефадекса не могут проникать в гранулы и сравнительно быстро проходят в жидкой фазе вне частиц геля, поэтому элюируются первыми. В настоящее время имеется большое число сефадексов, позволяющих разделить белки и полипептиды в диапазоне молекулярных масс от 700 до 800000 Да.

Были разработаны также хроматографические материалы для разделения белков, путем связывания некоторых ионообменных групп с сефадексами. Полученные производные-ДЭАЭ-сефадекс, КМ-сефадекс и другие широко используются при хроматографии.

Аффинная хроматография (биоспецифическая хроматография), основана на принципе специфического взаимодействия с особыми веществами (лигандами), закрепленными на носителе в результате образуются специфические комплексы биологических макромолекул, способных в определенных условиях к диссоциации. Биологические макромолекулы обладают способностью обратимо связывать многие вещества. Например, ферменты образуют комплексы с субстратами, антитела взаимодействуют с антигенами, мРНК с комплементарной ДНК и т. д. Все эти

взаимодействия строго специфичны. Если закрепить один из компонентов этого комплекса на матрице, иммобилизовать его, то получится специфический сорбент для второго компонента (аффинат). Нерастворимые аффинаты готовят обычно путем ковалентного присоединения лиганда к нерастворимому носителю. Если смесь белков пропустить через колонку, заполненную таким аффинатом, то все молекулы, которые не обладают сродством к лиганду, закрепленному на носителе пройдут не задерживаясь, а белок, имеющий сродство к аффинному лиганду, будет адсорбироваться на колонке. Вымыть адсорбированный белок с колонки можно буферными смесями с измененной величиной рН, ионной силой, а также введением в состав элюента веществ, ослабляющих связи между белками и лигандами.

Автоматизация гематологических исследований

В современных автоматических устройствах для гематологического анализа используются в основном два технологических принципа – кондуктометрический и оптический.

Основными параметрами, которые позволяют определять современные гематологические анализаторы, являются: количество лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, содержание гемоглобина, показатель гематокрита, объем эритроцита, содержание гемоглобина в эритроците, лейкограмма и др.

Кондуктометрический принцип определения заключается в изменении сопротивления клетки в постоянном электрическом поле. Технология определения состоит в том, что фиксируется момент прохода через отверстие малого диаметра (апертуру) клеток крови. Для этого по обе стороны отверстия располагаются электроды с поданным на них напряжением. При протекании через отверстие чистого раствора электролита сопротивление в цепи мало, но в момент прохождения через апертуру клетки оно резко возрастает, что приводит к увеличению напряжения в цепи. Импульсы скачкообразного изменения напряжения фиксируются и подсчитываются специальным датчиком. Специальный прибор (дискриминатор) пропускает импульсы заранее заданной амплитуды, что позволяет регистрировать клетки в зависимости от их размера.

О количестве однотипных частиц судят по числу импульсов, возникающих при прохождении клеток крови через апертуру строго определенного размера.

Оптический принцип определения в своей основе имеет измерение величины светопоглощения или светорассеивания. В анализаторах этого типа регистрируются электрооптические импульсы, возникающие при прохождении клеток крови в луче светового потока. Интенсивность импульса прямо пропорциональна размеру исследуемых частиц. Световой луч фокусируется на капилляр, через который проходят клетки, в результате чего происходит либо светопоглощение, либо светорассеяние светового потока. Величина светопоглощения или светорассеяния обусловлена размером, формой и структурой клеток крови.

Для дифференциации клеток крови используется также радиочастотный анализ. Под действием токов высокой частоты, клетки в момент прохождения ими апертуры посылают сигналы, амплитуда которых зависит от размеров ядра, его плотности, характера цитоплазматических включений. Перед подсчетом лейкоцитов вызывают гемолиз эритроцитов гипотоническим раствором, подсчет тромбоцитов проводят после осаждения эритроцитов.

В зависимости от типа анализаторов они делятся на полуавтоматические, где подготовка пробы к исследованию (ее взятие, разбавление соответствующими растворами) производится вручную и полностью автоматические, где все эти процедуры проводятся в автоматическом режиме.

Автоматизация биохимических исследований

По аналогии с гематологическими, существуют полуавтоматические и автоматические биохимические анализаторы. При использовании полуавтоматического прибора реагенты и биопроба смешиваются оператором и подаются в пробозаборник, прибор измеряет оптическую плотность смеси и по заданной программе рассчитывает концентрацию аналита.

При использовании полностью автоматического анализатора необходимо запрограммировать его на необходимые виды анализа, ввести порядок установки проб пациентов на борту прибора и загрузить эти пробы, а также

наборы реагентов на борт анализатора. По прошествии времени, необходимого для анализа, прибор выдает результат в печатном и электронном виде.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Основные задачи биохимических методов.
2. Количественные и полуколичественные методы исследования.
3. Фотометрия. Определение, суть метода.
4. Электрофорез. Определение, суть метода.
5. Хроматография. Определение, суть метода.
6. Автоматизированные методы исследований.
7. Методы биохимического исследования.
8. Аналитические методы и методы разделения.
9. Автоматизированные методы исследований.
10. Основные методы исследования состава биологических жидкостей.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, основных видов биохимических исследований.
2. Записать суть метода фотометрии, хроматографии и электрофореза.
3. Записать примеры качественных, полуколичественных и количественных методов в биохимии.

9. Тема занятия: Клинический и биохимический анализ мочи в диагностике заболеваний почек.

Цель занятия: Знать основные заболевания почек, иметь понятие о фильтрации, реабсорбции, секреции, физиологических и патологических компонентах мочи, нарушениях диуреза, клиническом и биохимическом анализе мочи.

Перечень знаний и практических навыков:

- Знать основные заболевания почек.
- Сформировать понятия о фильтрации, реабсорбции, клиренсе, почечном пороге.
- Охарактеризовать нарушения диуреза: полиурия, олигоурия, анурия, никтурия.
- Знать нормальные уровни физиологических компонентов мочи: мочевины, креатинина, креатина, мочевая кислота.
- Изучить патологические компоненты мочи: глюкозурия, протеинурия и ее виды.
- Уметь провести оценку клинического и биохимического анализа мочи при основных заболеваниях почек.
- Овладеть навыком оценки нарушения диуреза.
- Уметь провести диагностическую оценку патологических компонентов мочи.

По данным ВОЗ около 7 – 10% взрослого населения индустриально развитых стран имеют различную нефрологическую патологию. Среди многочисленных болезней почек широко распространены гломерулонефрит, пиелонефрит, поликистоз, гидронефроз, мочекаменная болезнь. В 2002 году Национальным почечным фондом США предложен термин – «Хроническая болезнь почек», объединяющий различные нозологические формы заболеваний почек. Хроническая болезнь почек – это повреждение почек либо снижение их функции в течение 3 месяцев и более. Существенное влияние на развитие и прогрессирование хронических заболеваний почек в той или иной популяции

может оказать целый ряд факторов. К ним относятся распространенность некоторых инфекций, прием некоторых лекарственных препаратов, алкоголь и курение, состояние окружающей среды, климат, характер и традиции питания, генетические особенности популяции и др. Одновременно с этим артериальная гипертензия, сахарный диабет, аутоиммунные заболевания, дислипидемия, ожирение и метаболический синдром являются факторами, ассоциирующимися с развитием дисфункции почек.

Правильная интерпретация результатов лабораторных тестов возможна в случае четкого представления о строении и функции почек, и процессе мочеобразования. Почки представляют собой парный паренхиматозный орган. Основной функциональной единицей почки является нефрон. Группы нефронов дают начало собирательным трубкам, которые открываются наружу в области верхушки почечного сосочка. Сосочек открывается в почечную чашечку, переходящую в почечную лоханку продолжением которой является мочеточник. Нефрон состоит из сосудистого клубочка, его капсулы (капсула Боумена-Шумлянского) и канальцевого аппарата (проксимального канальца, петли Генле, дистального канальца и собирательной трубки). Каждый отдел нефрона имеет высокую структурно-функциональную специализацию.

Клубочковая фильтрация представляет собой пассивный процесс перехода жидкой части плазмы крови из просвета капилляров клубочков в капсулу клубочка через почечный фильтр (эндотелий капилляров, базальная мембрана, эпителий капсулы). При этом вместе с плазмой крови фильтруются низкомолекулярные вещества. Скорость клубочковой фильтрации определяется: 1 – величиной почечного кровотока, 2 – внутриклубочковым гидростатическим давлением и 3 – площадью поверхности фильтрации. Следовательно, при повышении почечного кровотока, увеличении внутриклубочкового давления и при гипертрофии клубочков (увеличении площади поверхности фильтрации) скорость клубочковой фильтрации будет увеличиваться.

В клинической практике скорость клубочковой фильтрации измеряется по методу Реберга-Тареева, основывающемся на определении клиренса эндогенного

креатинина. Креатинин – продукт метаболизма, в норме экскретируемый почками. Креатинин – ангидрид креатина, образуется в мышцах из креатинфосфата, вместе с креатином содержится во фракции остаточного азота крови. Креатинин является постоянной составной частью мочи. Суточное выделение креатинина с мочой постоянно и пропорционально общей мышечной массе тела.

В качестве унифицированного метода при определении концентрации креатинина в крови и моче предложен метод Поппера, основанный на реакции Яффе.

В щелочной среде пикриновая кислота взаимодействует с креатинином с образованием оранжево-красной окраски (реакция Яффе – образование таутомера пикрата креатинина), которую измеряют фотометрически. Определение в сыворотке крови проводят после депротеинизирования, в моче – после разведения водой. Определение не совсем специфично, интерферируют вещества с активной метиленовой группой и некоторые восстанавливающие вещества, например глюкоза, ацетон, ацетоуксусная и пировиноградная кислоты.

Содержание креатинина сыворотки крови:

- мужчины – 61 – 115 мкмоль/литр;
- женщины – 53 – 97 мкмоль/литр.

Мочу перед анализом разводят дистиллированной водой в соотношении 1:100 (результат умножают на 50).

Существует несколько вариантов пробы Реберга. Наиболее распространенные – это суточная и разовая. В суточной пробе Реберга определяется концентрация креатинина в сыворотке крови и моче, собранной за сутки (24ч). Вычисляется минутный диурез: общее количество мочи за сутки (мл) разделить на 24 (ч) и на 60 (мин). Далее скорость клубочковой фильтрации рассчитывается по формуле:

$$\text{СКФ} = \frac{\text{Креатинин мочи (моль/л)} \times \text{минутный диурез (мл/мин)}}{\text{Креатинин крови (моль/л)}}$$

Разовая проба Реберга проводится утром до приема жидкости и после опорожнения мочевого пузыря. Далее обследуемый выпивает поллитра воды и через полчаса сдает кровь. Еще через полчаса собирает всю мочу. Измеряется объем

собранной мочи. Вычисляется минутный диурез: количество собранной мочи (мл) разделить на 60 (мин). СКФ вычисляется по ранее приведенной формуле.

Процесс реабсорбции протекает в проксимальных канальцах, петле Генли и в дистальных канальцах. Реабсорбция представляет собой способность клеток почечных канальцев к обратному всасыванию веществ из просвета канальцев в кровь. В просветах канальцев реабсорбируются все биологически важные органические вещества (глюкоза, аминокислоты, белок, мочевины), а также лактат, бикарбонат неорганический фосфор, хлор, калий, натрий. В петле Генли и дистальных канальцах реабсорбируются неорганические компоненты канальцевой жидкости: калий, натрий, магний, кальций.

Наряду с реабсорбцией в канальцах происходит секреция. Канальцевая секреция характеризуется способностью клеток почечных канальцев переносить из крови в просвет канальцев подлежащие выведению электролиты и различные вещества (органические, чужеродные, образованные в процессе метаболизма и синтезированные в клетках канальцев). В проксимальных канальцах осуществляется секреция органических кислот и оснований, конечных продуктов обмена чужеродных веществ. Секреция может быть пассивной и активной (с затратой энергии). В дистальном канальце осуществляется секреция ионов калия, водорода и аммиака. Способность почек к секреции ионов водорода и аммиака обеспечивает регуляцию кислотно-основного состояния, а способность секреции ионов калия – водно-солевой гомеостаз.

Низкомолекулярные азотистые вещества, или небелковые азотистые компоненты, состоят главным образом из конечных продуктов обмена белков и нуклеиновых кислот.

Основной фракцией остаточного азота является мочевины, определение которой может применяться в диагностических целях вместо остаточного азота. Синтез мочевины происходит в печени в основном из аммиака, который образуется при дезаминировании аминокислот, распаде пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Нормальные значения мочевины находятся в пределах 3,5 – 9,0 ммоль/л, азот мочевины – 2,9 – 8,9 ммоль/л. Существует

прямая связь между азотом мочевины крови и потреблением белка и обратная связь между скоростью экскреции мочевины и азотом мочевины.

Мочевая кислота является продуктом распада пуриновых нуклеотидов, входящих в состав нуклеиновых кислот, макроэргических соединений, некоторых коферментов. Из эндогенных нуклеотидов в организме человека образуется около 500 мг мочевой кислоты, из поступающих с пищей – примерно 200 мг. Большая часть мочевой кислоты, образовавшейся в тканях, выделяется с мочой (до 75%), остальная часть экскретируется с калом. Величина экскреции мочевой кислоты с мочой зависит от присутствия пуринов в пище: при обычной диете с мочой ежедневно выделяется до 0,7 г мочевой кислоты, при богатой пуринами диете – до 1 г. В клинко-диагностических лабораториях для определения мочевой кислоты используют колориметрический и ферментативный методы. Мочевая кислота восстанавливает фосфорно-вольфрамовый реактив с образованием соединения голубого цвета.

Нормальные величины:

- мужчины – 0,24 – 0,50 ммоль/л;
- женщины – 0,16 – 0,44 ммоль/л.

Изменение мочи являются важным признаком поражения почек и мочевыводящих путей, поэтому общий анализ мочи остается традиционным лабораторным исследованием состояния почек.

Общий анализ мочи включает определение физико-химических свойств (цвет, прозрачность, реакция, относительная плотность, белок, глюкоза, кетоны, билирубин, уробилиноген) и микроскопию мочи. Физические параметры мочи во многом зависят от особенности диеты, водного режима, приема лекарственных препаратов, возраста и поэтому могут иметь диагностическое значение в совокупности с другими параметрами мочи.

Изменение цвета мочи признак, который побудит пациента, обратиться к врачу (табл. 2).

Патологические состояния, приводящие к изменению цвета мочи

| Цвет мочи | Патологические состояния | Причина |
|-------------------------------|--|--|
| Темно-желтый | Застойная почка, отеки, ожоги, понос, рвота | Повышенная концентрация красящих веществ |
| Бледный | Сахарный и несахарный диабет, ренальная глюкозурия, почечная недостаточность | Малая концентрация красящих веществ |
| Темно-бурый | Гемолитическая анемия | Уробилиногенурия |
| Темный (черный) | Острая гемолитическая почка, алкаптонурия, меланосаркома | Гемоглобинурия, меланин |
| Красный | Нефролитиаз, инфаркт почки, свинцовая анемия | Гематурия, уропорфирурия |
| Вид «мясных помоев» | Острый и обострение хронического гломерулонефрита | Гематурия |
| Цвет пива, зеленовато-бурый | Паренхиматозная желтуха | Билирубинурия, уробилиногенурия |
| Зеленовато-желтый, коричневый | Механическая желтуха | Билирубинурия |
| Беловатый | Жировое перерождение | Липурия, гной, кристаллы фосфатов |
| Молочный | Лимфостаз почек | Хилурия |

Следует помнить, что интенсивность окраски мочи зависит от концентрации урохромов (продуктов пигментного обмена). Прием пищи влияет на оттенки мочи. Свекла придает красный оттенок, а ревень – зеленый. Прием медикаментов может изменить цвет мочи. Аспирин придает розовый оттенок, амидопирин – красный, фурагин и 5 НОК – желто-коричневый, витамины – выраженную опалесценцию желтым цветом.

Изменение цвета мочи часто зависит от наличия солей. Так мочева кислота придает моче насыщенно-желтый цвет, ураты – кирпично-красный, фосфаты формируют белый осадок.

Количество мочи зависит от водного режима. Здоровые взрослые люди в течение суток выделяют с мочой от 0,6 до 2,0 л жидкости. При этом отношение

дневного объема выводимой мочи к ночному соответствует 3–4:1. Увеличение ночного диуреза называется никтурия. Наблюдается при гипертрофии простаты, диабете, нарушении сердечно-сосудистой системы, тяжелые поражения почек. Состояние, при котором суточный объем (диурез) мочи превышает 2 л, называется полиурией. Отмечается при обильном питье, сахарном и несахарном диабете, при нефросклерозе, эндокринных нарушениях мочеобразования.

При выделении за сутки менее 500 мл мочи констатируют олигурию. Олигурия подразделяется на преренальную, ренальную и постренальную. Преренальная олигурия обусловлена недостаточностью кровенаполнения почек (уменьшение объема циркулирующей крови, падение тонуса сосудов, кровотечение, стеноз почечных сосудов). Почечная олигурия обусловлена нарушением фильтрации мочи, вследствие воспалительных изменений в клубочках почек (гломерулонефрит, вирусные и бактериальные инфекции, тубулоинтерстициальный некроз). Постренальная олигурия связана с обтурацией мочевыделительной системы камнем, кровяным сгустком, опухолью.

Полное прекращение выделения мочи называется анурией (физиологическая у новорожденных в течение первых часов жизни). Наблюдается при тяжелом поражении почек, острой почечной недостаточности, прогрессирующем перитоните, отравлениях.

Дизурия расстройство мочеиспускания, может быть поллакиурия – частое мочеиспускание, оллакиурия – редкое мочеиспускание и энурез – недержание мочи.

Относительная плотность мочи зависит от концентрационной способности почек. Кроме того, плотность мочи зависит от глюкозурии и протеинурии. Диапазон относительной плотности в течение суток должен быть от 1,003 до 1,028. Причину нарушений концентрационной функции почек лучше анализировать в динамическом наблюдении. Для этого используется проба Зимницкого. Суть пробы Зимницкого заключается в измерении относительной плотности мочи в 8-ми отдельных порциях, собранных в течение суток через каждые три часа (6, 9, 12, 15, 18, 21, 0 и 3 часа). Чем больше разница между максимальным и минимальным значением относительной плотности, тем выше

функциональная способность почек. В норме она должна быть не менее 0,007. В первую очередь эта проба более чувствительна к выявлению патологии канальцев. Гипостенурия – нарушение процесса концентрирования первичного ультрафильтрата при сохранении разведения мочи.

Реакция мочи в норме является показателем характера питания. При смешанном питании характерно преобладание кислых продуктов в пище, поэтому рН мочи 5,5 – 6,5. Для вегетарианцев характерна нейтральная или щелочная реакция. При смешанном питании щелочная моча может быть признаком инфицирования мочевых путей, поскольку микрофлора преобразует мочевины (компонент мочи) в аммоний, защелачивая мочу. В клинической практике определение рН важно в связи с тем, что одни препараты, используемые в нефрологии, эффективно действуют в кислой среде, другие – в щелочной среде.

Глюкозурия расценивается как явление патологическое. Глюкоза свободно фильтруется почечными клубочками и в норме полностью реабсорбируется клетками проксимальных канальцев. Перенос глюкозы из просвета канальца через мембрану щеточной каемки происходит с помощью переносчика. Максимальное количество молекул глюкозы, реабсорбируемых из канальцевой жидкости в кровь, зависит от числа переносчиков глюкозы. Если количество реабсорбируемой глюкозы превышает возможности переносчиков, то глюкоза появляется в моче. Максимальная концентрация глюкозы в крови, при которой не наблюдается глюкозурии, называется почечным порогом. В норме почечный порог составляет 10 ммоль/л глюкозы в крови. С возрастом почечный порог для глюкозы повышается. Количество переносчиков глюкозы снижается при хронических заболеваниях почек, при гипертонической болезни, при диабетической нефропатии. Это означает, что при этих заболеваниях глюкозурия может появляться при концентрации глюкозы в крови менее пороговой (<10 ммоль/л).

Кетонурия – обнаружение ацетона, ацетоуксусной, бета-оксимасляной кислоты в моче. Свидетельствует о нарушении обмена углеводов, белков и жиров, которое приводит к увеличению кетогенеза (сахарный диабет, голодание, лихорадка

при инфекционном процессе, отравления, алкогольная интоксикация, повышенный катаболизм). Кетонурия не является непосредственным поражением почек.

Протеинурия (обнаружение белка в моче) является важным и практически значимым симптомом поражения почек и мочевыводящих путей. Проникновение белка через почечный фильтр в просвет канальцев почек зависит от состояния базальной мембраны капсулы клубочка, формы и размеров белковой молекулы, количества белка в плазме. В норме через почечный фильтр проходят белки с молекулярной массой до 70 кД (альбумин, легкие цепи иммуноглобулинов, многие ферменты). В норме концентрация белка в разовой порции не должна превышать 0,033 г/л. В суточной допускается до 0,15 г/сутки. В моче здоровых людей обнаружено более двухсот белков, имеющих различное происхождение. Одни фильтруются из плазмы крови, другие имеют почечное происхождение или секретируются эпителием мочевого тракта.

Протенурия может быть функциональной и органической. Функциональная протеинурия связана с гемодинамическим стрессом и может наблюдаться на фоне лихорадки, эмоциональном стрессе, после физической нагрузки или охлаждения. Увеличение экскреции белка с мочой при смене положения тела (из горизонтального в вертикальное), наблюдаемое чаще у подростков, называется ортостатической протеинурией.

Органическая (патологическая) протеинурия может быть преренальной, ренальной и постренальной. Преренальная (перегрузочная) не связана с поражением почек. Она возникает в результате заболеваний, сопровождающихся повышенным синтезом низкомолекулярных белков (миеломная болезнь). Ренальная протеинурия обусловлена поражением клубочков и канальцев почек. При этом страдает процесс фильтрации (гломерулярный тип протеинурии) или нарушается реабсорбция белков в проксимальных канальцах (тубулярный тип протеинурии). При повреждении клубочкового барьера (гломерулярный тип протеинурии) выделяют высокоселективную, селективную и неселективную протеинурию. При высокоселективном типе в моче обнаруживаются низкомолекулярные белки до 70 кД (альбумины). При селективной протеинурии в

моче выявляют белки до 150 кД. При неселективной протеинурии в моче обнаруживаются белки с высокой молекулярной массой 830 – 930 кД (иммуноглобулины). Постренальная протеинурия обусловлена попаданием воспалительного экссудата, богатого белком, в мочу (цистит, простатит).

При микроскопическом исследовании мочевого осадка различают органическую и неорганическую часть.

Органическая часть представлена эритроцитами, лейкоцитами, цилиндрами и эпителием. *Эритроцитурия* – патологический мочевого синдром.

Причины эритроцитурии

| Преренальные | |
|---|--|
| Передозировка антикоагулянтов Гемофилия Гипо- и афибриногенемии Тромбоцитопении и тромбоцитопатии Тяжелые заболевания печени с нарушением синтеза факторов свертывания ДВС-синдром | |
| Почечные | |
| Клубочковые | Пролиферативные (первичные и вторичные гломерулонефриты) Непролиферативные (наследственный нефрит, мембранозная нефропатия, нефросклероз, сосудистые поражения) |
| Неклубочковые | Поликистоз почек, тубулоинтерстициальные поражения почек, опухоли, сосудистые и инфекционные поражения почек |
| Постренальные | |
| Повреждения лоханки и мочеточника | Закупорка, инфекция, камни, опухоль, пороки развития сосудов, туберкулез почки |
| Повреждение мочевого пузыря | Закупорка, инфекция, опухоль, пороки развития сосудов, травма |
| Прочие | |
| Гематурия, вызванная физической нагрузкой Нефроптоз Гипертрофия или аденокарцинома предстательной железы Эндометриоз Псевдогематурия | |

Лейкоцитурия. У здорового человека при микроскопии осадка мочи обнаруживаются единичные лейкоциты в каждом поле зрения. Лейкоцитурия бывает, как правило, при инфекционных процессах в почках и мочеполовом тракте.

Цилиндрурия – цилиндры в моче. Цилиндры представляют собой слепки почечных канальцев, состоящие из белка и гликозаминогликанов (гиалина). В норме гиалин секретируется почечным эпителием дистального канальца и выделяется с мочой в растворенном виде. Увеличение белка в моче, закисление мочи, наличие воспалительного процесса в тубулярной части нефрона, замедление тока мочи по дистальным канальцам способствуют выпадению гиалина в осадок и агрегации белка.

В целях диагностики латентных форм воспалительных заболеваний почек и мочевых путей в нефрологической практике широко пользуются методами количественного подсчета эритроцитов, лейкоцитов и цилиндров. Это метод Аддиса-Каковского (подсчет эритроцитов, лейкоцитов и цилиндров в объеме суточной мочи) и метод Нечипоренко (в 1мл мочи). В норме у взрослых выделяется 1×10^6 /л эритроцитов, $2 - 4 \times 10^6$ /л лейкоцитов и $0,02 \times 10^6$ цилиндров.

Эпителиальные клетки в моче имеют различное происхождение и попадают в мочу по мере ее прохождения по всему мочевому тракту.

Неорганизованный осадок мочи представлен солями разной химической природы.

Физиологическими компонентами мочи является мочевины, креатинин.

Мочевина представляет собой продукт метаболизма белков, в норме экскретируемый почками. Концентрация мочевины в крови от 2,5 до 8,3 ммоль/л считается физиологически допустимой. Увеличение концентрации мочевины в крови, сопровождающееся, выраженным клиническим синдромом интоксикации, именуется уреемией. Сама мочевины мало токсична, но токсичны вещества накапливающиеся вместе с ней. Поэтому мочевины рассматривают как маркер интоксикации. У больных с уреемией отмечается пониженное содержание мочевины в моче.

Креатин образуется в печени и стоком крови доставляется в мышечную ткань, где происходит его фосфорилирование с образованием креатинфосфата. Креатинфосфат является макроэргом, используемым при сокращении мышечными волокнами. В миофибриллах происходит его разрушение с выделением энергии. Образовавшийся в результате реакции креатинин, будучи беспороговым веществом, выделяется с мочой. Уровень его концентрации в крови и моче определяется в основном мышечной массой и выделительной способностью почек. Суточное выделение креатинина с мочой относительно постоянно, поэтому определение его концентрации в крови и моче широко используют для оценки функционального состояния почек.

Как уже говорилось, в основе мочеотделения лежат процессы фильтрации, секреции и реабсорбции – в целом определяющие способность почек к «очищению» от разнообразных веществ. Методы, определяющие очистительную способность почек (клиренс), основываются на сравнении содержания определенных (креатинин) веществ в крови и моче. Клубочковый клиренс представляет клубочковую фильтрацию и соответствует количеству выделенной первичной мочи (мл) за 1 мин. В клинической практике используется метод Реберга о котором говорилось выше.

Мочевая кислота является конечным продуктом метаболизма нуклеопротеинов. При поражении почек нарушается выделение мочевой кислоты с мочой.

С клинической точки зрения процесс диагностики поражения почек целесообразно строить на синдромно-нозологическом принципе. Различают следующие **синдромы поражения почек:**

- мочевой;
- нефротический;
- гипертонический;
- остроснефритический;
- острая почечная недостаточность;
- хроническая почечная недостаточность;
- синдром канальцевой дисфункции.

Мочевой синдром наиболее постоянный признак поражения мочевыделительной системы. В понятие мочевой синдром входят протеинурия, гематурия, лейкоцитурия и цилиндрурия. При отсутствии экстраренальных признаков (отеки, гипертензия) изменения в моче являются единственным диагностическим критерием патологии почек. Например, гломерулонефрит с изолированным мочевым синдромом, хронический пиелонефрит с латентным течением, начальная стадия амилоидоза почек.

Нефротический синдром – состояние, характеризующееся генерализованными отеками, массивной протеинурией (выше 3,5 г/сутки), гипопроteinемией и гипоальбуминемией (менее 20 г/л), гиперлипидемией (холестерин выше 6,5 ммоль/л).

Гипертонический синдром связан с диффузными поражениями почек. Клинически проявляется в повышении артериального давления, лабораторно – в снижении скорости клубочковой фильтрации.

Клинико-лабораторный комплекс остронефритического синдрома складывается из олигурии, протеинурии, гематурии, нарастанием отеков и артериальной гипертонии. Возникновение остронефритического синдрома наиболее характерно для острого нефрита.

Острая почечная недостаточность – синдром, характеризующийся внезапно развивающимися азотемией, изменениями водно-электролитного баланса и кислотно-основного состояния, т. е. быстро возникающими нарушениями основных, прежде всего экскреторных, функций почек. Эти изменения являются результатом острого тяжелого поражения почечного кровотока, клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции, обычно возникающего одновременно. К развитию ОПН могут приводить большое число причин, в первую очередь экзогенного характера (токсические воздействия, инфекции), а также обструкция сосудов почек, закупорка мочевых путей, повреждение интерстициальной ткани.

Хроническая почечная недостаточность – понятие, которое включает в себя постепенное и постоянное ухудшение клубочковых и канальцевых функций почек такой степени, что почка не может больше поддерживать нормальный состав внутренней среды. Совокупность клинических и

лабораторных симптомов, развивающихся при ХПН, называется уремией. ХПН представляет собой конечную фазу любого прогрессирующего почечного поражения. В числе наиболее частых причин ХПН различают: хронический гломерулонефрит, хронический пиелонефрит, амилоидоз, поликистоз.

Канальцевые дисфункции (тубулопатии) составляют группу нефропатий, течение которых характеризуется ранним частичным или генерализованным повреждением канальцевых функций при нормальной или несколько сниженной клубочковой фильтрации. Тубулярные изменения первичны, клубочковые повреждения могут развиваться на более поздних стадиях болезни и имеют вторичный характер.

Следует сказать, что понимание патофизиологических процессов, происходящих в почках, позволяют четко определить необходимость того или иного лабораторного исследования. При этом, правильная подготовка пациента перед анализом, соблюдение правил забора биологического материала для исследования являются залогом получения результатов, не вызывающих проблем при интерпретации.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Фильтрация, реабсорбция, клиренс, почечный порог.
2. Физиологических компонентов мочи: мочевины, креатинина, креатина, мочевая кислота и методы их определения.
3. Основные заболевания почек. Этиопатогенез.
4. Нарушения диуреза: полиурия, олигоурия, анурия, никтурия.
5. Патологические компоненты мочи: глюкозурия, протеинурия и ее виды.
6. Синдромы поражения почек.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, основных параметров общего анализа мочи.
2. Записать способы проведения пробы Реберга.
3. Записать основные синдромы при заболеваниях почек.

10. Тема занятия: Диагностика заболеваний печени.

Цель занятия: Освоить основные лабораторные методы диагностики заболеваний печени, изучить основные функции печени, клинические и биохимические синдромы поражения печени, диагностическое значение определения ферментов.

Перечень знаний и практических навыков:

- Знать основные функции печени.
- Охарактеризовать клинические и биохимические синдромы поражения печени.
- Изучить методы лабораторной диагностики заболеваний печени.
- Уметь оценить правильность выбора лабораторного метода исследования функции печени.
- Овладеть навыком определения характера заболевания печени, основываясь на лабораторных данных.

Печень играет важную роль в обмене белков, углеводов, липидов. Клетки печени метаболизируют, детоксицируют и экскретируют экзо- и эндогенные вещества. Важной функцией печени является синтез белков плазмы. В печени также синтезируются желчные кислоты, необходимые для переваривания и всасывания жиров. Гликолиз, цикл Кребса, синтез и распад аминокислот, реакции окислительного фосфорилирования – все эти процессы представлены в гепатоцитах, богатых митохондриями. В печени представлены 2 основных типа клеток: гепатоциты или паренхиматозные клетки, составляющие около 60% всей клеточной массы, и Купферовы клетки, входящие в состав ретикуло-эндотелиальной системы и составляющие 30% от всех клеток печени.

Функции печени

Обмен углеводов

Выход глюкозы из печени поддерживает уровень сахара крови в промежутках между приемами пищи; основными источниками глюкозы при

этом является гликоген (гликогенолиз и глюконеогенез). Печень также превращает в глюкозу галактозу и фруктозу.

Обмен аминокислот и белков

Аминокислоты, получаемые из пищи и образующиеся при катаболизме белков тканей, поступают в печень. В печени некоторые из них дезаминируются или трансаминируются до кетокислот, другие метаболизируются до мочевины и аммиака. В печени также синтезируется большинство белков плазмы (за исключением иммуноглобулинов, синтезируемых лимфоидной тканью).

Обмен липидов

Печень извлекает из сосудистого русла остатки хиломикрон и синтезирует липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), которые превращаются печеночной липазой в липопротеины низкой плотности (ЛПНП). На поверхности гепатоцитов находится большое количество ЛПНП-рецепторов. В печени синтезируются предшественники ЛПНП, также как и фермент лецитин-холестерин ацилтрансфераза (ЛХАТ), превращающий предшественники в функциональные ЛПНП-частицы. Роль печени в обмене липидов включает также продукцию кетоновых тел из неэтерифицированных жирных кислот, секрецию холестерина в желчь.

Обмен желчных кислот

Основными желчными кислотами являются холевая и хенодезоксихолевая кислоты, синтезируемые из холестерина только в печени. Они секретируются в желчь, и большая их часть вновь возвращается по кровотоку из кишечника в печень. Синтез новых желчных кислот регулируется количеством «реутилизированных» кислот. Кишечная микрофлора дегидроксилирует первичные желчные кислоты до вторичных кислот – дезоксихолевой и литохолевой.

Конъюгация и детоксикация

Конъюгации и детоксикации подвергаются стероидные гормоны и лекарственные препараты.

Лабораторные тесты диагностики заболеваний печени

Под тестами оценки функций печени обычно подразумеваются измерения компонентов крови, свидетельствующих о наличии и типе поражения печени (табл. 3).

Функции печени и методы их оценки

| | Функции | Методы оценки |
|----------------------------|----------------------------|--|
| Обмен углеводов | Глюконеогенез | Уровень глюкозы в крови, продукция глюкозы печенью |
| | Утилизация лактата | Уровень лактата в крови |
| | Обмен галактозы | Способность к элиминации галактозы |
| Обмен белков и аминокислот | Синтез белков плазмы | Концентрация белков плазмы |
| | Мочевина | Уровень мочевины сыворотки |
| | Метаболизм аммиака | Уровень аммиака крови |
| Обмен липидов | Метаболизм липопротеинов | Уровень липидов и липопротеинов сыворотки |
| | Гидроксирование витамина D | Уровень 25-гидроксихолекальциферола |
| | Синтез желчных кислот | Уровень желчных кислот в сыворотке, тесты на мальабсорбцию жиров |
| Детоксикация и экскреция | Обмен билирубина | Уровень билирубина в сыворотке, билирубин в уробилиноген в моче |
| | Экскреция ксенобиотиков | Экскреция аминопирина, экскреция бромсульфалеина |
| | Метаболизм гормонов | Определение гормонов, оценка электролитного баланса |

В повседневной клинической практике для этого используется определение уровня билирубина, активности ферментов (трансаминаз и щелочной фосфатазы) в образцах сыворотки. Определение концентрации сывороточного альбумина также может быть одним из показателей заболеваний печени. Эти биохимические определения могут помочь в дифференциации следующих состояний:

- Обструкция билиарного тракта.
- Острое гепатоцеллюлярное повреждение.
- Хронические заболевания печени.

Концентрация общего билирубина сыворотки и активность сывороточной фосфатазы свидетельствует о холестазае, блокаде оттока желчи.

Концентрация альбумина сыворотки является одним из существенных показателей синтетической способности печени, хотя на уровень альбумина влияют и многие другие факторы.

Клинические и биохимические синдромы

Болезни печени сопровождаются рядом лабораторных синдромов (табл. 4).

Таблица 4

Лабораторные синдромы патологии печени

| | |
|---|--|
| Синдром цитолиза (цитолитический синдром или синдром нарушения целостности гепатоцитов) | ↑ АсАТ, АлАТ, ЛДГ и ее изоферментов – ЛДГ4 и ЛДГ3, фруктозо-1-фосфатаальдозы, сорбит-дегидрогеназы, а концентрации ферритина, сывороточного железа, витамина В12 и билирубина за счет повышения прямой фракции |
| Синдром холестаза (экскреторно-билиарный синдром, холестатический синдром) | ↑ ЩФ, ЛАП, ГГТФ, холестерина, Р-липопротеинов, конъюгированной фракции билирубина, желчных кислот, фосфолипидов |
| Синдром печеночно-клеточной недостаточности (синдром синтетической недостаточности) | ↓ общего белка (особенно альбумина), трансферрина, холестерина, II, V, VII факторов свертывания крови, холинэстеразы, альфа-липопротеинов; ↑ билирубина за счет неконъюгированной фракции |
| Мезенхимально-воспалительный синдром | ↑ СОЭ, появление в крови С-реактивного белка, ревматоидного фактора, антител к субклеточным фракциям гепатоцита, антимиохондриальных и антиядерных антител, изменение количества и функциональной активности Т- и В-лимфоцитов, повышение уровня иммуноглобулинов. |

При анализе результатов биохимического исследования у больных с заболеваниями печени целесообразно выделять четыре лабораторных синдрома, каждый из которых в известной степени соответствует определенным морфологическим и функциональным изменениям в органе: цитолитический синдром, мезенхимально-воспалительный синдром, холестатический синдром (синдромхолестаза), синдром малой печеночно-

клеточной недостаточности. Обычно, в каждом конкретном случае, заболевания имеет место сочетание нескольких биохимических синдромов.

Синдром нарушения целостности гепатоцитов (синдром цитолиза или цитолитический синдром). Характеризуется повышением в плазме крови активности индикаторных ферментов – АсАТ (аспартатаминотрансферазы), АлАТ (аланинаминотрансферазы), ЛДГ (лактатдегидрогеназы) и ее изоферментов – ЛДГ4 и ЛДГ3; специфических печеночных ферментов: фруктозо-1-фосфатаальдозазы, сорбитдегидрогеназы, а также концентрации ферритина, сывороточного железа, витамина В₁₂ и билирубина главным образом за счет повышения прямой фракции.

В оценке степени выраженности патологического процесса основное значение придается активности АлАТ и АсАТ. Повышение их уровня в сыворотке крови менее чем в 5 раз по сравнению с верхней границей нормы рассматривается как умеренная, от 5 до 10 раз – как средняя степень и свыше 10 раз – как высокая степень выраженности.

Морфологической основой этого синдрома являются гидропическая и ацидофильная дистрофия и некроз гепатоцитов с повреждением и повышением проницаемости клеточных мембран.

Синдром холестаза (эксреторно-билиарный синдром, холестатический синдром – нарушение эксреторной функции печени). Сопровождается повышением уровня в сыворотке крови ЩФ (щелочная фосфатаза), ЛАП (лейцинаминопептидаза), ГГТФ (γ-глутамилтранспептидаза), холестерина, Р-липопротеинов, конъюгированной фракции билирубина, желчных кислот, фосфолипидов, снижается экскреция бромсульфалеина (вофавердина) и радиофармакологических препаратов. Морфологической основой внутриклеточного холестаза являются ультраструктурные изменения гепатоцита – гиперплазия гладкой цитоплазматической сети, изменения билиарного полюса гепатоцита, накопление компонентов желчи в гепатоците, которые нередко сочетаются с цитолизом гепатоцитов. При внутривнутрипеченочном холестазе выявляют накопление желчи в желчных ходах, а при внепеченочном – расширение междольковых желчных протоков.

Синдром печеночно-клеточной недостаточности (синдром синтетической недостаточности). Проявляется уменьшением содержания в сыворотке крови общего белка и особенно альбумина, трансферрина, холестерина, II, V, VII факторов свертывания крови, холинэстеразы, альфа-липопротеинов, но в то же время повышением билирубина за счет неконъюгированной фракции. Морфологическим субстратом синдрома являются выраженные дистрофические изменения гепатоцитов и/или значительное уменьшение функционирующей паренхимы печени вследствие ее некротических изменений.

Нарушенная функция гепатоцитов может приводить к нарушению синтеза альбумина, что наблюдается при хронических заболеваниях печени. Наиболее выраженные гипоальбуминемии выявляются при портальном циррозе, жировой дистрофии печени.

Мезенхимально-воспалительный синдром. Характеризуется гипергаммаглобулинемией, повышением показателей белково-осадочных проб, увеличением СОЭ, появлением в крови продуктов деградации соединительной ткани (С-реактивный белок, серомукоид и др.). Наблюдаются изменения показателей клеточных и гуморальных иммунных реакций: появляются антитела к субклеточным фракциям гепатоцита, ревматоидный фактор, антимитохондриальные и антиядерные антитела, изменения количества и функциональной активности Т- и В-лимфоцитов, а также повышение уровня иммуноглобулинов.

При морфологических исследованиях печени характерна активация и пролиферация лимфоидных и ретикулогистиоцитарных клеток, усиление фиброгенеза, формирование активных септ с некрозами гепатоцитов, внутрипеченочная миграция лейкоцитов, васкулиты.

Энзимодиагностика заболеваний печени

Печень продуцирует большое число ферментов, поступающих непосредственно в кровь. При поражениях печени количество одних ферментов в сыворотке крови понижается, а других – повышается.

Ферменты, которые обнаруживаются в норме в плазме или сыворотке крови, условно можно разделить на 3 группы.

Секреторные ферменты, синтезируясь в печени, в норме выделяются в плазму крови, где играют определенную физиологическую роль, например ферменты, участвующие в процессе свертывания крови (протромбиназа), холинэстераза. При поражении печени их синтез снижается, и активность этих ферментов падает.

Индикаторные ферменты попадают в кровь из тканей, где они выполняют определенные внутриклеточные функции. Одни из них находятся в цитозоле клеток (ЛДГ, АлАТ, АсАТ), другие – в митохондриях (ГДГ, АсАТ) и т.д. При поражении печени ферменты из клеток вымываются в кровь, и активность их возрастает. Наибольшее диагностическое значение имеет определение активности АлАТ и АсАТ. Активность трансаминаз в сыворотке крови: АсАТ – 5 – 40 Е/л, АлАТ – 5 – 43 Е/л. При остром паренхиматозном гепатите АлАТ увеличивается в 20 – 30, а иногда в 100 раз и более. Несколько меньше повышается активность АсАТ.

Экскреторные ферменты синтезируются главным образом в печени (щелочная фосфатаза). В физиологических условиях эти ферменты в основном выделяются с желчью. При многих патологических процессах выделение эксcretорных ферментов с желчью нарушается, а активность их в плазме крови повышается.

Щелочная фосфатаза

Увеличение активности щелочной фосфатазы (ЩФ) при заболеваниях печени является результатом увеличенного синтеза фермента клетками, расположенными в желчных канальцах, обычно в ответ на холестаз, который может быть интра- и внепеченочным. Холестаз, даже непродолжительный, приводит к увеличенной активности фермента, по крайней мере, вдвое превышающий нормальный уровень. Высокая активность ЩФ может также наблюдаться при инфильтративных заболеваниях печени (например, опухолях). Это также характерно для цирроза.

Печень не является единственным источником активности ЩФ. Умеренные количества ЩФ представлены в костях, тонком кишечнике, плаценте, почках.

Лактатдегидрогеназа

Уровень ЛДГ часто возрастает при гепатоцеллюлярной дисфункции, хотя на практике определение активности этого фермента редко используют в диагностике заболеваний печени из-за низкой специфичности показателя (фермент широко распространен в организме).

γ -глутамилтранспептидаза

γ -глутамилтранспептидаза (ГГТП) – это микросомальный фермент, широко представленный в тканях, особенно таких, как печень и почечные каналцы.

Активность γ -глутамилтранспептидазы в плазме резко повышается (иногда более, чем в 50 раз) при холестазах и является показателем печеночной недостаточности. Увеличение активности ГГТП наблюдается также у лиц, употребляющих алкоголь, даже в отсутствии явной патологии печени. При остром поражении печени изменение активности ГГТП параллельны изменениям активности трансаминаз.

Глутаматдегидрогеназа (ГДГ) катализирует превращение глутаминовой кислоты в альфа-кетоглутаровую и аммиак; фермент сосредоточен в митохондриях клеток, преимущественно в гепатоцитах. Он также обнаружен в незначительном количестве в нервной ткани, скелетных мышцах, миокарде и молочной железе.

Глутаматдегидрогеназа – один из органоспецифических ферментов, определяется в сыворотке крови при заболеваниях печени.

Поскольку фермент является митохондриальным, то степень повышения его активности отражает глубину цитолиза при заболеваниях печени, по её уровню можно судить о тяжести патологического процесса.

Сорбитолдегидрогеназа (СДГ) – органоспецифический фермент печени, катализирующий обратимое превращение сорбитола во фруктозу с участием НАД в качестве кофермента. Фермент локализован в цитоплазме гепатоцитов. Сывороточная активность энзима повышается при вирусных гепатитах. Как правило повышение активности СДГ наблюдается в дожелтушный период вирусного гепатита, предшествует увеличению активности других (ферментов, отражающих поражение печени. Однако высокие цифры активности СДГ

выявляются в разгар болезни, иными словами, тест уступает по чувствительности другим органоспецифическим ферментам и определению активности аминотрансфераз. Кроме того, активность СДГ нормализуется быстрее, чем активность аминотрансфераз, что также является недостатком теста. Другие заболевания печени (токсические гепатиты, циррозы, гипоксические поражения печени) сопровождаются незначительным увеличением активности энзима.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Функции печени.
2. Лабораторные методы диагностики заболеваний печени.
3. Клинические и биохимические синдромы при заболеваниях печени.
4. Нарушение целостности гепатоцита: синдром цитолиза.
5. Синдром повышенной проницаемости.
6. Экскреторно-билиарный синдром: соотношение активности ферментов и фракций билирубина.
7. Воспалительный синдром: общий белок сыворотки крови и белковые фракции.
8. Энзимодиагностика заболеваний печени.
9. Значение аланин- и аспаратаминотрансфераз, лактатдегидрогеназы, γ -глутамилтранспептидазы, щелочной фосфатазы, глутаматдегидрогеназы, сорбитолдегидрогеназы.
10. Гипер- и гипоферментемия.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, перечислить основные функции печени.
2. Записать виды клинических и биохимических синдромов при заболеваниях печени. Дать характеристику каждому из синдромов с описанием основных биохимических показателей.
3. Записать основные ферменты, используемые для лабораторной диагностики заболеваний печени.

11. Тема занятия: Цитологические исследования в лабораторной диагностике.

Цель занятия: Знакомство с основными особенностями цитологической диагностики и основными методами исследования.

Перечень знаний и практических навыков:

- Знать определение и основные задачи цитологии.
- Владеть методикой приготовления цитологических препаратов.
- Уметь дифференцировать клетки влагалищного эпителия в различные фазы цикла.
- Овладеть методикой подсчета спермограммы.
- Знать особенности цитологического исследования экссудатов и трансудатов.

Цитология – наука, изучающая общие черты строения и функционирования клеток и их производных. Она исследует отдельные клеточные структуры, их участие в общеклеточных физиологических процессах, пути регуляции этих процессов, воспроизведение клеток и их компонентов, приспособление клеток к условиям среды, реакции на действие различных факторов, патологические изменения клеток.

Цитологическое исследование – это оценка характеристик морфологической структуры клеточных элементов в цитологическом препарате (мазке) с целью установления диагноза доброкачественной или злокачественной опухоли, а также неопухолевых поражений. Оно основано на изучении с помощью микроскопа особенностей строения клеток, клеточного состава органов, тканей, жидкостей организма человека в норме и при патологических процессах. Отличие цитологического исследования от гистологического заключается в том, что изучаются не срезы тканей, а клетки; заключение основывается на особенностях изменения ядра, цитоплазмы, ядерно-цитоплазменного соотношения, образования структур и комплексов клеток.

Диагностическое цитологическое исследование сходно с гистологическим исследованием биопсийного материала по цели (прижизненное распознавание

патологического процесса), методической основе (морфологический анализ), объекту исследования (компоненты патологических участков органа и ткани), методам окраски ядра, цитоплазмы и других структурных элементов клетки. Однако при цитологическом исследовании, в отличие от гистологического, требуется значительно меньшее количество материала (отдельные клетки, их комплексы), из которого можно в течение нескольких минут приготовить цитологический препарат (мазок, отпечаток), как правило, без длительной предварительной обработки не прибегая к помощи специальной аппаратуры. Вместе с тем материал, подвергаемый цитологическому исследованию, позволяет оценивать изменения лишь на ограниченном участке. Кроме того, в процессе приготовления мазка нарушаются пространственные взаимоотношения компонентов ткани, сохраняющиеся в гистологическом срезе (лишь изредка в цитологическом препарате обнаруживаются небольшие фрагменты ткани). Таким образом, в тех случаях, когда требуется выявить взаимное расположение клеток и межклеточного вещества в исследуемых тканях, цитологическое исследование уступает гистологическому. Цитологическое исследование предпочтительнее в тех случаях, когда невозможна или нежелательна биопсия, при необходимости детального изучения особенностей структуры клеток, быстрого получения результата (например, при обследовании больного в условиях поликлиники, массовых профилактических осмотрах населения).

Различают цитологические исследования так называемого *эксфолиативного материала* (мокрота, моча, сок предстательной железы, смывы из различных органов во время эндоскопии, а также из шейки и полости матки, выделения из молочных желез, соскобы и отпечатки с эрозированных или язвенных поверхностей, свищей, ран, жидкость из суставных и серозных полостей, цереброспинальная и амниотическая жидкость); *пунктатов* (материала, полученного при аспирационной диагностической пункции, преимущественно тонкой иглой) и *отпечатков* с удаленных тканей, например поверхности свежего разреза оперативно удаленной или взятой для гистологического исследования ткани.

С помощью цитологического исследования оценивают состояние эпителия, мезотелия и степень его пролиферации; гормональную активность у женщин; контролируют степень повреждения опухолевых клеток при лечении злокачественных опухолей, изменения гормонального статуса под влиянием гормональной терапии, следят за динамикой заживления ран и др. Цитологические методы широко применяют во время операций для срочного решения диагностических задач (установления природы патологического процесса, выявления метастазов опухоли или ее прорастания в окружающие ткани, наличия клеток опухоли в краях операционного разреза и др.). Значение такого исследования особенно велико при необходимости анализа рыхлых, крошащихся масс, костных и обызвествленных тканей или очень мелких очагов, не пригодных для срочного гистологического исследования.

Ожидаемый результат исследования зависит от того, насколько правильно получен материал (непосредственно из участка поражения или вблизи него, из участка некроза, кровоизлияния и т. д.). Во многих случаях врач-цитолог лично участвует в проведении пункций и других манипуляций, направленных на получение материала.

Методы обработки материала и окраски цитологических препаратов разнообразны и зависят от цели исследования. Поскольку результат исследования часто основывается на выявлении тонких повреждений ядерных и цитоплазматических структур, необходима уверенность, что эти изменения не являются артефактами, связанными с нарушением методики обработки и окраски материала. На основании исследования адекватного и репрезентативного материала устанавливают цитологический диагноз. При этом учитывают общую картину, обнаруженную в цитологическом препарате, а не только изменения отдельных клеток, принимают во внимание анамнестические, рентгенологические, эндоскопические и другие данные.

Исследование мокроты – одно из первых диагностических мероприятий, применяемых у больных с легочной патологией. Это исследование позволяет выявить даже carcinoma in situ. Успех цитологической диагностики зависит от

правильного сбора мокроты и ее обработки, а также правильной интерпретации цитологической картины.

Высокая эффективность цитологического исследования мокроты при выявлении рака может быть достигнута только путем ее последовательного четырех- или пятикратного исследования (ежедневно или через 1 – 2 дня).

Для анализа следует брать утреннюю порцию мокроты, откашливаемой больным натощак. В лабораторию мокроту доставляют не позднее 1ч после откашливания. Если кашель отсутствует, то его вызывают искусственно с помощью специального аэрозоля – смеси 15% раствора хлорида натрия и 15% раствора пропиленгликоля. Мокроту так же можно получить при бронхоскопии.

При цитологическом исследовании мокроты возможно обнаружение следующих клеток:

1. Эпителиальные клетки, или клетки цилиндрического мерцательного эпителия (при бронхитах, бронхиальной астме или злокачественных новообразованиях легких); бокаловидные клетки (при усиленной секреции); базальные или промежуточные клетки; альвеолярные макрофаги из нижних респираторных отделов. Плоский эпителий попадает в мокроту из полости рта и не имеет диагностического значения. Наличие в мокроте более 25 клеток плоского эпителия указывает на то, что данный образец мокроты загрязнён отделяемым из ротовой полости.

2. Альвеолярные макрофаги – локализуются в основном в межальвеолярных перегородках. Поэтому анализ мокроты, где присутствует хотя бы 1 макрофаг, указывает на то, что поражены нижние отделы дыхательной системы. При инфаркте легкого, застое в малом кругу кровообращения обнаруживаются «клетки сердечных пороков», т.е. альвеолярные макрофаги с включениями гемосидерина. Встречаются также и макрофаги с липидными включениями (липофаги) при туберкулезе, хроническом заболевании легких.

3. Отмечают повышение в мазке мокроты количества нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов, моноцитов, «гигантских» клеток Пирогова-Лангерганса. Обнаружение более 25 нейтрофилов в поле зрения свидетельствует об инфекции (пневмония, бронхит). Единичные эозинофилы

могут встречаться в любой мокроте; в большом количестве (до 50 – 90% всех лейкоцитов) обнаруживаются при бронхиальной астме, эозинофильных инфильтратах, глистных инвазиях лёгких и т.п.

4. Эритроциты появляются в мокроте при разрушении ткани лёгкого, пневмонии, застое в малом круге кровообращения, инфаркте лёгкого и т.д.

5. Клетки злокачественных опухолей, особенно если опухоль растёт эндобронхиально или распадается. Определять клетки как опухолевые можно только в случае нахождения комплекса атипичных полиморфных клеток, особенно если они располагаются вместе с эластическими волокнами.

6. Волокнистые образования: эластические волокна, фибриновые волокна и спирали Куршмана (при туберкулезе, абсцессе легкого, раке). Эластические волокна имеют вид тонких двухконтурных волокон одинаковой на всём протяжении толщины, дихотомически ветвящихся. Эластичные волокна исходят из лёгочной паренхимы. Выявление в мокроте эластичных волокон свидетельствует о разрушении лёгочной паренхимы (туберкулёз, рак, абсцесс). Иногда их присутствие в мокроте используют для подтверждения диагноза абсцедирующей пневмонии.

7. Кристаллические образования – это кристаллы Шарко-Лейдена – бесцветные октаэдры различной величины, напоминающие по форме стрелку компаса, состоящие из белка, освобождающегося при распаде эозинофилов (при бронхиальной астме, эмфиземе, глистных инвазиях); кристаллы гематоидина – ромбы, иголки, звезды от желтого до оранжевого цвета (при некрозе ткани, кровоизлияниях при инфаркте легкого); кристаллы холестерина (при распаде ткани – туберкулез, абсцесс легкого, рак).

Бронхоальвеолярный лаваж – бронхоскопический способ получения смыва с поверхности мельчайших бронхов (бронхиол) и альвеолярных структур легких для цитологического, микробиологического, биохимического и иммунологического исследований.

Исследование бронхоальвеолярного смыва с помощью цитологических методов позволяет установить определенные изменения жизнеспособности клеток, их функциональной активности и соотношений между отдельными

клеточными элементами, что дает возможность судить об этиологии и активности патологического процесса в легких. При заболеваниях, характеризующихся образованием специфических клеток и телец (например, злокачественные опухоли легких, асбестоз, гемосидероз, гистиоцитоз), информативность цитологического исследования бронхоальвеолярных смывов может быть приравнена к информативности биопсии.

Бронхоальвеолярный лаваж выполняют как при использовании жесткого бронхоскопа под общей анестезией, так и при фибробронхоскопии под местной анестезией, после визуального исследования трахеи и бронхов. Промывную жидкость вводят в выбранный сегментарный бронх с последующей ее вакуум-аспирацией в стерильную градуированную емкость.

Полученный бронхоальвеолярный смыв необходимо быстро доставить в соответствующие лаборатории для проведения исследований. Если это невозможно, то допускается хранение смыва в течение нескольких часов в холодильнике при температуре от -6° до $+6^{\circ}\text{C}$.

Для проведения цитологического исследования 10 мл бронхоальвеолярного смыва сразу после его получения фильтруют через 4 слоя стерильной марли или мелкую сетку в центрифужную пробирку. Затем 10 капель профильтрованного смыва смешивают на часовом стекле с 1 каплей реактива Самсона и заполняют счетную камеру. Подсчитывая клеточные элементы по всей камере, устанавливают их число в 1 мл смыва.

Клеточный состав бронхоальвеолярного смыва (эндопальмональная цитограмма) определяется при микроскопическом исследовании осадка лаважной жидкости, полученного при центрифугировании, на основании подсчета не менее 500 клеток с использованием иммерсионного объектива. При этом учитывают альвеолярные макрофаги, лимфоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы. Клетки бронхиального эпителия в связи с их незначительным количеством в смывах не подсчитывают.

В бронхоальвеолярном смыве у здоровых некурящих лиц в среднем содержится 85 – 98% альвеолярных макрофагов, 7 – 12% лимфоцитов, 1 – 2% нейтрофилов и менее 1% эозинофилов и базофилов; общее количество клеток

варьирует от $0,2 \times 10^6$ до $15,6 \times 10^6$ в 1 мл. У курящих значительно увеличены общее количество клеток и процентное содержание лейкоцитов, альвеолярные макрофаги находятся в активированном (фагоцитирующем) состоянии,

Изменения эндопульмональной цитограммы имеют определенную направленность в зависимости от этиологии и активности заболевания легких.

При злокачественных опухолях легких: гемосидерозе, гистиоцитозе, асбестозе, ксантоматозе в бронхоальвеолярных смывах при цитологическом исследовании могут быть обнаружены специфичные для указанных заболеваний клетки: комплексы опухолевых клеток, гемосидерофаги, гистиоциты, асбестовые тельца, ксантомные клетки.

Цитологическое исследование семенной жидкости

Исследование эякулята проводят после полового воздержания обследуемого в течение, как минимум, 3 – 5 дней. В этот период не рекомендуют пребывание в сауне и прием лекарственных препаратов.

Спермограммой называется результат исследования физических свойств эякулята, представляющего собой совокупность сперматозоидов, клеток сперматогенеза, лейкоцитов и секрета половых желез (табл. 5).

Таблица 5

Спермограмма

| Параметр | Показатель нормы |
|--------------------------------------|------------------------|
| Объем | Не менее 2 мл |
| Цвет | Бело-сероватый |
| Время разжижения | 10 – 40 мин. |
| рН | 7,2 – 7,8 |
| Количество сперматозоидов в 1 мл | 20 – 120 млн |
| Количество сперматозоидов в эякуляте | 40 – 500 млн |
| Активно подвижные сперматозоиды | Более 60% |
| Слабоподвижные сперматозоиды | 10 – 20% |
| Неподвижные сперматозоиды | До 10% |
| «Живые» сперматозоиды | 90 – 95% |
| Патологические сперматозоиды | Не более 50 % |
| Количество округлых клеток | Не более 5 млн |
| Спермагглютинация | Нет |
| Лейкоциты | До 3 – 5 в поле зрения |

Кроме того, учитываются морфология и подвижность сперматозоидов. Основная цель данного исследования - выявление мужского бесплодия.

Виды заключений:

- 1) нормоспермия – все характеристики спермы соответствуют норме;
- 2) нормозооспермия – фертильность (способность к оплодотворению) эякулята в норме, но могут присутствовать не приводящие к бесплодию отклонения;
- 3) повышенное содержание округлых клеток, изменения кислотно-щелочной реакции и консистенции (очень вязкая или очень жидкая сперма);
- 4) олигоспермия – малый объем единичной порции эякулята (менее 2 мл);
- 5) олигозооспермия – недостаточное число сперматозоидов в единице объема эякулята (концентрация сперматозоидов в сперме менее 20 млн/мл);
- 6) астенозооспермия – малая подвижность сперматозоидов;
- 7) акинозооспермия – абсолютная неподвижность сперматозоидов;
- 8) тератозооспермия – большое количество аномальных сперматозоидов (более 50 % при исследовании нативного эякулята или более 85 % при исследовании окрашенного мазка спермы);
- 9) некрозооспермия – не обнаруживается живых сперматозоидов в эякуляте;
- 10) лейкоцитоспермия – увеличенное содержание лейкоцитов в сперме (более 1 млн/мл);
- 11) гемоспермия – наличие эритроцитов в эякуляте;
- 12) азооспермия – нет сперматозоидов в порции эякулята.

Кольпоцитология – это цитологическое исследование отделяемого влагалища. Метод кольпоцитологического исследования позволяет своевременно диагностировать нарушения репродуктивной системы женщины и провести оценку эффективности гормональной терапии. Кольпоцитологическое исследование клеточного состава влагалищных мазков основано на циклических изменениях эпителия влагалища (влагалищные циклы). Они характеризуются степенью созревания эпителия, в результате чего в мазке определяются парабазальные (овальные с крупным ядром) и промежуточные клетки (веретенообразные с прозрачной цитоплазмой и везикулярным ядром, имеющим четкий хроматиновый

рисунок). В самых верхних слоях эпителия образуются поверхностные клетки. Это крупные полигональные (многоугольные) клетки с бесструктурным ядром. Они появляются при максимальном разрастании эпителия, которое наблюдается при повышенном содержании эстрогена в организме. Количественное соотношение клеток в мазке и их морфологическая характеристика являются основой гормональной клеточной диагностики. Для количественной оценки кольпоцитологических данных вычисляют следующие индексы:

1. Индекс созревания (ИС, числовой индекс) – процентное соотношение поверхностных, промежуточных и парабазальных клеток. Записывается как 5/85/8, что означает, что в исследуемой мазке, к примеру, 5% парабазальных, 85% промежуточных и 8% поверхностных клеток.

2. Кариопикнотический индекс (КИ) – представляет собой процентное отношение всех поверхностных клеток с пикнотическим ядром к общему числу клеток в мазке. Характеризует эстрогенную насыщенность организма.

3. Эозинофильный индекс (ЭИ) – представляет собой процентное отношение всех зрелых поверхностных клеток с эозинофильной окраской цитоплазмы к общему числу клеток в мазке. Характеризует эстрогенное воздействие на эпителий влагалища.

Цитологическое исследование спинномозговой жидкости

При люмбальной пункции первые 3 капли ликвора спускаются на ватный тампон, затем ликвор набирается в 3, в исключительных случаях в 2 стерильные пробирки, на которых указываются ФИО больного, время пункции и перечень исследований. В лабораторию ликвор доставляется немедленно. При обнаружении в 1-й, иногда во 2-й пробирках путевой крови для цитологического исследования используется ликвор соответственно из 2-й или 3-й пробирки.

Цитологическое исследование ликвора складывается из:

- 1) подсчета общего количества клеток в камере Фукса-Розенталя (цитоз);
- 2) дифференцирования клеточных элементов (цитогаммы ликвора) в камере или в препаратах, приготовленных после седиментации или центрифугирования и окраски азур-эозином по Нохту, Паппенгейму-Крюкову или по Романовскому-Гимза.

Цитоз. Для получения правильного результата необходимо приготовить препарат для микроскопии в течение 30 мин после получения ликвора. Установлено, что распад эритроцитов и лейкоцитов происходит не вследствие литических свойств и не из-за разницы осмотического давления, а вследствие низкой концентрации белков в ликворе, т. к. белки оказывают стабилизирующее действие на клеточные мембраны. Подсчет клеток производится после предварительного окрашивания лейкоцитов и тканевых клеточных элементов, разрушения эритроцитов, попавших в ликвор, и консервирования в течение 2 – 3 ч клеточных элементов в реактиве Самсона.

У взрослых в норме в люмбальном ликворе содержится $3-4 \times 10^6$, в вентрикулярном и цистернальном $0-2 \times 10^6$ клеток/л.

Плеоцитоз – увеличение количества клеток в ликворе – наблюдается при остром бактериальном менингите, актиномикозе ЦНС, аденовирусном менингоэнцефалите, туберкулезном менингите, энцефалите, нейросифилисе, герпетическом менингите, инфекционном мононуклеозе, серозном менингите, рассеянном склерозе, миелите, субдуральной гематоме, опухолях ЦНС, белом и красном инфаркте мозга. Наиболее выраженный плеоцитоз отмечается при бактериальной инфекции, грибковых поражениях мозга и туберкулезном менингите.

В камере Фукса-Розенталя в препаратах, окрашенных реактивом Самсона, ядра клеток прокрашиваются в вишневый цвет. Необходимо обращать внимание на форму ядер, их структуру, наличие ядрышек, ядерно-цитоплазматическое соотношение, окраску цитоплазмы и включения в ней. Важно дифференцировать клеточные элементы, так как они имеют разное происхождение и реактивность при разной патологии. Происхождение клеточных элементов в ликворе двояко. Это гематогенный путь для лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов, плазматических клеток и бластов и гистиогенный. Гистиоидные элементы – моноциты, макрофаги, мастоциты (тканевые базофилы), арахноидальные клетки, клетки эпендимы, клетки злокачественных новообразований собственно ЦНС и метастазирующих из других органов и тканей. В тех случаях, когда клеточные элементы в камере не поддаются достоверной дифференцировке, необходимо исследовать их в фиксированном и окрашенном препарате.

Лимфоциты. В количестве $2-3 \times 10^6$ клеток/л они входят в состав нормального цитоза ликвора. При патологических процессах со стороны ЦНС отмечается полиморфизм лимфоцитов, что побудило называть их лимфоидными клетками, активированными лимфоцитами или трансформированными лимфоцитами (рис. 9).

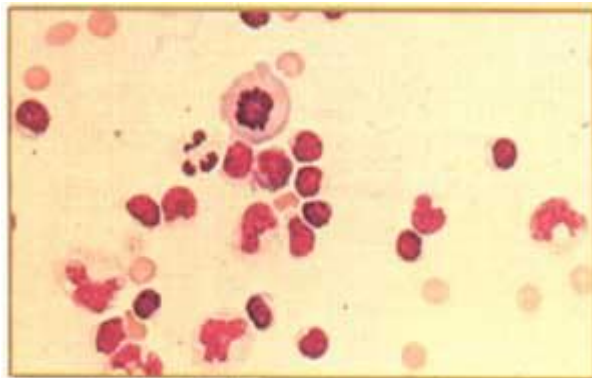


Рис.9. Лимфоидная реакция в ликворе (характерна для хронической инфекции, острой вирусной инфекции и фазы выздоровления острого бактериального менингита)

У этих лимфоцитов в препаратах, окрашенных азур-эозином, зона цитоплазмы большая, обычно бледно-базофильная, может содержать единичные азурофильные гранулы, встречаются клетки с фрагментозом ядер и явлениями отшнуровывания фрагментов цитоплазмы (клязматоз или цитоклазия). Степень реактивности лимфоцитов зависит от типа поражения (бактериальное, паразитарное, вирусное), а также от стадии развития опухоли, кровоизлияния в мозг. Резко выраженный лимфоцитоз наблюдается при вирусном (лимфоцитарном) менингите, нейросифилисе, рассеянном склерозе, хронической стадии туберкулезного менингита, после операций на оболочках мозга.

Нейтрофилы. Наиболее трудно дифференцируемые клетки в камере, особенно, если ликвор был поздно доставлен в лабораторию. Если в нативных или окрашенных реактивом Самсона препаратах обнаруживается мелкозернистая масса детрита, продукты распада клеток, тогда осадок надо окрасить на пероксидазу. Желто-коричневая окраска зернистых масс указывает, что у больного нейтрофильный плеоцитоз. Активные нейтрофилы схожи по морфологии с нейтрофилами периферической крови, имеют четкие контуры ядра и цитоплазмы.

Соотношение в ликворной формуле сохраненных и дегенерированных нейтрофилов зависит от затихания или обострения воспалительного процесса. Нейтрофильный плеоцитоз характерен для острой экссудативной фазы бактериального менингита. В препаратах, окрашенных азур-эозином, различаются дегенерированные нейтрофилы с лизированными ядрами, с нарушенным контуром цитоплазмы (рис.10), их фагоцитарная активность существенно подавлена.

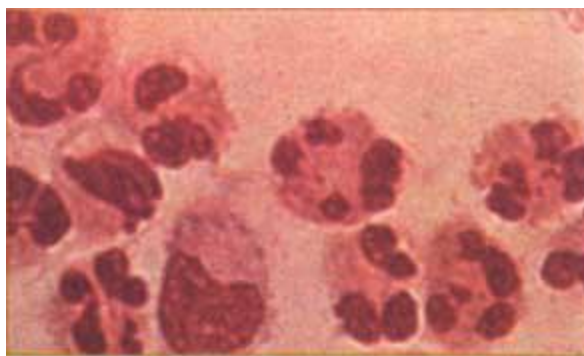


Рис. 10. Нейтрофилия при бактериальном менингите

Нейтрофилия характерна для ликвора при локальных и диффузных лептоменингитах, острой фазы туберкулезного менингита. При абсцессах мозга, микозе, церебральном и спинальном сифилисе нейтрофильная реакция может быть разной, при вирусных менингитах она кратковременна и слабо выражена.

Эозинофилы в нормальном ликворе не встречаются. В ликворе больных разрушаются при хранении более 2 – 3 ч при комнатной температуре. В препаратах, окрашенных азур-эозином, выглядят так же, как в мазках периферической крови (рис.11).

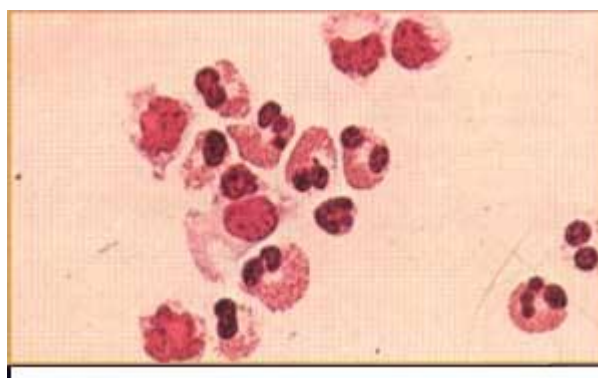


Рис. 11. Эозинофильная реакция при паразитарной инфекции (эхинококкоз)

Эозинофилы фагоцитируют бактерии, грибы и комплексы антиген-антитело. Процессы, ведущие к увеличению продукции антител, сопровождаются эозинофилией. Эозинофилия ликвора, наблюдается при цистицеркозе, ехинококкозе мозга, при эозинофильных менингитах. В небольшом количестве (2 – 3 %) они входят в состав ликворной формулы при туберкулезном менингите, кровоизлиянии в мозг, могут накапливаться при опухолях мозга (нейробластома, инфильтрирующая менингеома, эозинофильная аденома), при гидроцефалии, лекарственных интоксикациях. Эозинофилия в ликворе не сопровождается эозинофилией в крови и наоборот, может наблюдаться при нормальном цитозе.

Базофилы. В камере при окраске реактивом Самсона не обнаруживаются, при окраске азур-эозином их морфология в ликворе такая же, как в мазках крови. Базофильные гранулоциты и мастоциты (тканевые базофилы) – клетки одной генерации. Базофилы участвуют в воспалительных процессах аллергической этиологии, обнаруживаются в ликворе при тяжело протекающих нейроинфекциях, особенно у детей.

Плазматические клетки в нормальном ликворе не обнаруживаются. При патологии наблюдаемый полиморфизм плазматических клеток в ликворе отражает различные стадии созревания. При усиленной активации появляется вакуолизация цитоплазмы, которая может достигь таких размеров, что цитоплазма становится пенистой. Плазматические клетки с двумя ядрами характерны для вирусного менингита. При бактериальных менингитах на фоне плеоцитоза встречаются плазматические клетки разной степени зрелости (рис. 12).

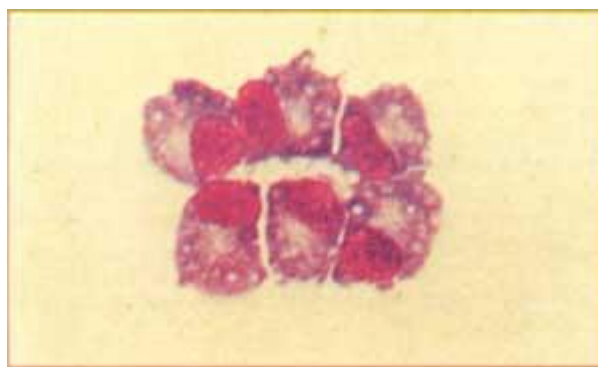


Рис. 12. Группа плазматических клеток в ликворе при рассеянном склерозе

Плазматические клетки входят в ликворную формулу при хронических вялотекущих воспалительных процессах ЦНС, наблюдаются в ликворе в период выздоровления при нейросифилисе, туберкулезном менингите, саркоидозе, коллагенозах с вовлечением в процесс ЦНС, зоонозах, кровоизлияниях в мозг. Особенно характерно появление плазматических клеток в ликворе больных рассеянным склерозом, гиперкинетическим прогрессирующим панэнцефалитом. При некоторых формах хронического нейросифилиса плазматические клетки входят в состав нормального цитоза.

Моноциты – это вторая основная популяция клеток в нормальном ликворе $0-2 \times 10^6$ клеток/л (рис. 13).

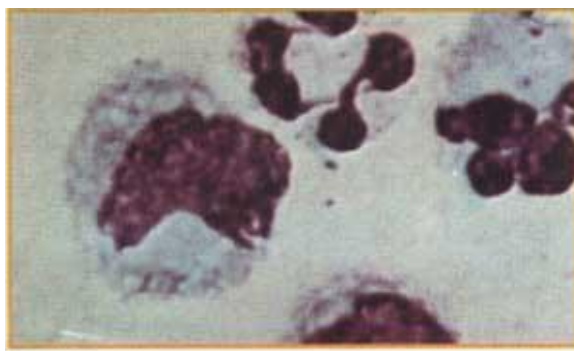
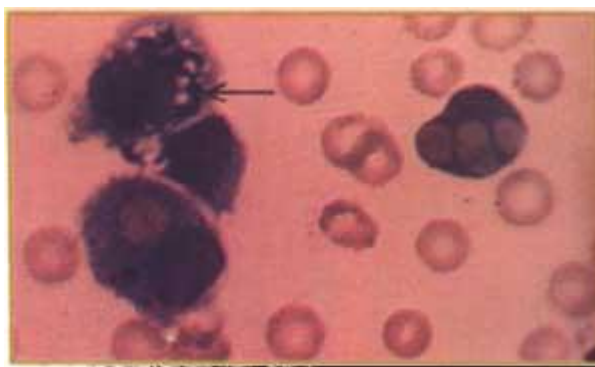


Рис. 13. Моноцитоз в фазе выздоровления после бактериального менингита

Моноциты подвергаются дегенеративным изменениям быстрее лимфоцитов. Моноцитоз наблюдается при нейросифилисе, рассеянном склерозе, гиперкинетическом прогрессирующем панэнцефалите, хронических вялотекущих воспалительных процессах ЦНС.

Макрофаги в нормальном ликворе не встречаются. Это санитары ликвора, в вакуолях цитоплазмы четко прокрашиваются клеточные элементы или остатки фагоцитированных клеток в виде грануляций (рис. 14).



**Рис. 14. Моноцитоз в фазе выздоровления
после бактериального менингита**

В зависимости от фагоцитированных элементов среди макрофагов выделяют эритрофаги или гемофаги, бактериофаги, лейкофаги, гемосидеринфаги, гематоидинфаги, липофаги. Одновременное присутствие в ликворе гемосидеробластов, эритрофагов и гематоидинфагов свидетельствует о продолжающемся или повторном кровоизлиянии. Количество макрофагов нарастает при любом воспалительном процессе в ЦНС. Макрофаги могут присутствовать в ликворном пространстве до 6 месяцев. Липофаги встречаются в содержимом мозговых кист, появление их в ликворе – показатель травматического или ишемического некроза.

Таким образом, цитологический анализ ликвора позволяет предположить, а в некоторых случаях поставить диагноз патологии ЦНС.

Цитологическое исследование экссудатов и транссудатов применяется для диагностики патологических изменений в биологических жидкостях, таких как плевральная жидкость, спинномозговая жидкость, асцитическая жидкость, моча, выделения из молочной железы. С помощью этого метода можно диагностировать воспалительные и опухолевые процессы в тех органах, откуда получен материал.

Показания к цитологическому исследованию:

- Жидкость в серозной полости.
- Сцерирующая молочная железа.
- Опухоль в мочевом тракте.

- Подтверждение, уточнение клинического диагноза.
- Установление диагноза в неясных случаях.
- Диагностика неопухолевых, предопухолевых и опухолевых заболеваний.

Выпотные жидкости – транссудаты и экссудаты – добывают для исследования с помощью пункции серозных полостей (плевральной, брюшной, полости перикарда и др.). Лабораторная дифференциация транссудата и экссудата представлена в таблице 6.

Таблица 6

Отличие транссудата от экссудата

| Показатель | Транссудат | Экссудат |
|--|---|---------------|
| Причина образования | повышенное гидростатическое давление, пониженное коллоидно-осмотическое давление | воспаление |
| Относительная плотность | 1005 – 1015 | выше 1015 |
| Белок, г/л | 5 – 25 | выше 30 |
| Соотношение: белок выпота/белок сыворотки | менее 0,5 | более 0,5 |
| Проба Ривальта | отрицательная | положительная |
| Лейкоциты в 1 мкл | менее 1000 | более 1000 |

Примечание: Проба Ривальта – биохимический тест для дифференцирования транссудата и экссудата. Методика заключается в том, что экссудаты содержат серомуцин (соединение глобулиновой природы), дающий положительную пробу (денатурацию) со слабым раствором уксусной кислоты. Экссудат образует помутнение в виде белого облачка, транссудат не образует помутнения.

Полученный выпотный материал собирают в чистую сухую посуду (колба, цилиндр) и все количество тотчас направляют на исследование. Не рекомендуется доставлять в лабораторию часть жидкости (например, одну пробирку из всего взятого пунктата).

Для цитологического исследования рекомендуют тотчас после откачивания добавлять в сосуд с жидкостью лимоннокислый натрий (из расчета 1 г лимоннокислого натрия на 1 л выпотной жидкости), тщательно размешать порошок стеклянной палочкой. Это предотвращает свертывание и захват в сгусток клеточных элементов. Для исследования используют отстоявшуюся на дне посуды часть.

Материал для исследования экссудатов и трансудатов:

- мазки, приготовленные в лаборатории, из осадка трансудатов, экссудатов, секретов, экскретов и мочи;
- мазки, приготовленные из отпечатков сцернирующей молочной железы.

Микроскопическое исследование выпотных жидкостей производят после центрифугирования и приготовления препаратов из осадка.

Экссудат, доставленный в лабораторию в свернувшемся виде, подвергают дефибринированию путем взбалтывания со стеклянными бусами. Исследование такой жидкости дает только ориентировочное представление о клеточном составе, так как часть клеток разрушается при дефибринировании или остается в сгустках фибрина.

Микроскопическое исследование жидкостей следует производить в нативных и окрашенных препаратах.

Исследование нативных препаратов (каплю осадка наносят на предметное стекло и накрывают покровным стеклом) дает возможность ориентировочно судить о характере патологического процесса (количество клеточных элементов, преобладание различных элементов, наличие клеток опухолевой природы и пр.). Предварительно производят обзор препаратов с малым, а затем с большим увеличением. Микроскопически в нативных препаратах можно обнаружить следующие элементы:

- Эритроциты являются постоянными клетками жидкостей. В трансудатах и серозных экссудатах эритроциты находятся в небольшом количестве и связаны с травматической примесью крови (в момент прокола). Геморрагические экссудаты обычно содержат очень много эритроцитов, что значительно затрудняет исследование нативных препаратов. В этих случаях следует готовить тонкие препараты или добавлять каплю слабого раствора уксусной кислоты (для гемолиза эритроцитов), но такой препарат в дальнейшем красить нельзя.
- Лейкоциты содержатся в небольшом количестве (до 15 – 20 в поле зрения) в трансудатах и в большем количестве в жидкостях воспалительного происхождения (особенно много их в гнойных экссудатах). Соотношение отдельных видов лейкоцитов исследуют в окрашенных препаратах.

- Клетки мезотелия – крупные клетки размером до 25 мкм. Обнаруживаются, в большом количестве в трансудатах, в экссудатах при злокачественных новообразованиях, а иногда при туберкулезе. В трансудатах большой давности клетки мезотелия могут быть в виде скоплений с выраженными дегенеративными изменениями (с вакуолизацией цитоплазмы и эксцентрично расположенным ядром – так называемые перстневидные клетки).
- Опухолевые клетки с выраженным полиморфизмом расположены обычно конгломератами.

Другие клеточные элементы в нативных препаратах не распознаются. Помимо различных клеток, в нативных препаратах могут встречаться и неклеточные элементы.

- Детрит в виде мелкозернистой сероватой массы. Характерен для гнойных экссудатов.
- Жировые капли в виде резко преломляющих свет круглых капель, окрашивающихся Суданом III. Их находят при гнойных экссудатах с большим клеточным распадом, при хилезных и хилусоподобных экссудатах.
- Кристаллы холестерина – тонкие бесцветные, таблички с обломанными углами. Обнаруживаются при старых осумкованных выпотах, чаще туберкулезного происхождения (холестериновые экссудаты).
- Слизь обнаруживается крайне редко и является указанием на наличие бронхопульмонального свища.
- Друзы актиномицетов можно найти в плевральном экссудате при актиномикозе.

Фазово-контрастное исследование нативных препаратов позволяет значительно точнее выявить морфологию различных клеточных элементов и лейкоцитарный состав выпотных жидкостей, чем исследование в обычном оптическом.

Для исследования окрашенных препаратов небольшую каплю осадка помещают на предметное стекло. Препарат готовят как мазок крови, высушивают на воздухе и окрашивают обычными гематологическими методами. В случае геморрагического экссудата мазки следует готовить из

верхнего слоя осадка, содержащего лейкоциты и другие клеточные элементы. Клеточные элементы экссудатов окрашиваются более интенсивно, чем клетки крови, поэтому красить препарат следует не дольше 8 – 10 мин. Окрашенный препарат просматривают с малым увеличением, затем с иммерсионной системой. В мазках подсчитывают процентное соотношение отдельных видов лейкоцитов, исследуют морфологию других клеточных элементов.

В окрашенных препаратах обнаруживают следующие элементы:

1. Нейтрофильные лейкоциты – преобладающие клетки гнойного экссудата. По морфологии нейтрофилов можно судить о тяжести воспалительной реакции. Дегенеративные изменения нейтрофилов (токсигенная зернистость и вакуолизация цитоплазмы, гиперсегментация и пикиоз ядер и др.) с явлениями клеточного распада наблюдаются при наиболее тяжелых случаях гнойного воспаления. Нейтрофилы с явлениями фагоцитоза встречаются при более доброкачественных процессах.

2. Лимфоциты являются преобладающими элементами серозного выпота (до 80 – 90% всех лейкоцитов). При экссудативном плеврите любой этиологии лимфоцитарный характер экссудата проявляется обычно на 2-й неделе заболевания. В небольшом количестве встречаются и в трансудате.

3. Эозинофилы нередко находят в серозном экссудате и рассматривают как проявление аллергического процесса. Преобладание эозинофилов (30 – 80% всех лейкоцитов – эозинофильный плеврит) наблюдается при ревматических выпотах, туберкулезе, травматическом плеврите, опухолях, паразитарных заболеваниях.

4. Плазматические клетки могут обнаруживаться в серозном или гнойном экссудате при затяжных воспалительных процессах и при травматических плевритах.

5. Полибласты – тканевые клетки различного размера с нежной структурой ядра моноцитоподобной формы и базофильной или серовато-голубой цитоплазмой. Иногда в клетках выражены дегенеративные изменения (стертая структура ядра, вакуолизация цитоплазмы). Полибласты обнаруживают в значительном количестве в гнойных экссудатах, особенно в случаях высоковирулентной флоры.

6. Макрофаги – крупные клетки, сходные с полибластамн, с включениями в цитоплазме и неправильной формы ядром. Обнаруживают при кровоизлияниях в плевральную полость, опухолях, гнойных плевритах.

7. Клетки мезотелия крупных размеров (до 30 мкм), правильной формы, с центрально расположенным круглым ядром и широкой зоной цитоплазмы (от сероватого до темно-голубого цвета), иногда двухъядерные и многоядерные. Клетки мезотелия постоянно обнаруживаются в транссудатах, в экссудатах в начальной стадии воспалительного процесса, при реактивном раздражении плевры, а также при опухолях. В жидкостях большой давности отмечаются выраженные дегенеративные изменения этих клеток (вакуолизация цитоплазмы и эксцентрично расположенное ядро – так называемые перстневидные клетки, жировая дистрофия цитоплазмы).

8. Клетки опухоли резко варьирующих размеров, с выраженным клеточным полиморфизмом (различная величина, структура и окраска ядра, крупные ядрышки, анизохромия клеток и т. д.). Достоверными для диагноза злокачественных новообразований являются находки комплексов (конгломераты) опухолевых клеток.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Цитологические исследования. Определение. Общие понятия.
2. Цитологическое исследование мокроты.
3. Цитологическое исследование бронхоальвеолярного смыва.
4. Кольпоцитология.
5. Цитологическое исследование семенной жидкости.
6. Цитологическое исследование спинномозговой жидкости.
7. Цитологическое исследование экссудатов и транссудатов.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, особенностей цитологического исследования.
2. Записать цитологические особенности клеточных элементов вагинального содержимого, мокроты, спинномозговой жидкости, экссудатов, транссудатов.

12. Тема занятия: Иммунологические серологические методы в лабораторной диагностике.

Цель занятия: Освоить методы постановки реакций агглютинации и преципитации.

Перечень знаний и практических навыков:

- Знать современные представления об иммунной системы.
- Усвоить теоретические основы методов преципитации и агглютинации.
- Знать порядок подготовки оборудования, материала и реактивов для проведения реакций преципитации и агглютинации.
- Освоить техническое выполнение методов реакции антиген-антитело..
- Уметь интерпретировать результаты, получаемые при реакции антиген-антитело.

Иммунная система – подсистема, существующая у позвоночных животных и объединяющая органы и ткани, которые защищают организм от заболеваний, идентифицируя и уничтожая опухолевые клетки и патогены. Иммунная система распознает множество разнообразных возбудителей – от вирусов до паразитических червей – и отличает их от биомолекул собственных клеток. Распознавание возбудителей усложняется их адаптацией и эволюционным развитием новых методов успешного инфицирования организма-хозяина.

Конечной целью иммунной системы является уничтожение чужеродного агента, которым может оказаться болезнетворный микроорганизм, инородное тело, ядовитое вещество или переродившаяся клетка самого организма. Этим достигается биологическая индивидуальность организма. В иммунной системе развитых организмов существует множество способов обнаружения и удаления чужеродных агентов: этот процесс называется иммунным ответом. Все формы иммунного ответа можно разделить на врождённые и приобретённые реакции. Основное различие между ними в том, что приобретённый иммунитет высокоспецифичен по отношению к конкретному типу антигенов и позволяет быстрее и эффективнее уничтожать их при повторном столкновении.

Антигенами называют молекулы, воспринимаемые как чужеродные агенты и вызывающие специфические реакции организма. Например, у перенёсших ветрянку, корь, дифтерию людей часто возникает пожизненный иммунитет к этим заболеваниям. В случае аутоиммунных реакций антигеном может служить молекула, произведённая самим организмом.

Иммунная система человека и других позвоночных представляет из себя комплекс органов и клеток, способных выполнять иммунологические функции. Прежде всего иммунный ответ осуществляют лейкоциты. Большая часть клеток иммунной системы происходит из кроветворных тканей. У взрослых людей развитие этих клеток начинается в костном мозге. Лишь Т-лимфоциты дифференцируются внутри тимуса (вилочковой железы). Зрелые клетки расселяются в лимфоидных органах и на границах с окружающей средой, около кожи или на слизистых оболочках.

Организм животных, обладающих механизмами приобретённого иммунитета, производит множество разновидностей специфических иммунных клеток, каждая из которых отвечает за какой-то определённый антиген. Наличие большого количества разновидностей иммунных клеток необходимо для того, чтобы отражать атаки микроорганизмов, способных мутировать и изменять свой антигенный состав. Значительная часть этих клеток завершает свой жизненный цикл, так и не приняв участие в защите организма, например, не встретив подходящих антигенов.

Иммунная система защищает организм от инфекции в несколько этапов, при этом с каждым этапом повышается специфичность защиты. Самая простая линия защиты представляет собой физические барьеры, которые предотвращают попадание инфекции – бактерий и вирусов – в организм. Если возбудитель проникает через эти барьеры, промежуточную неспецифическую реакцию на него осуществляет врождённая иммунная система. Врождённая иммунная система обнаруживается у всех растений и животных. На случай, когда возбудители успешно преодолевают воздействие врождённых иммунных механизмов, у позвоночных существует третий уровень защиты – приобретённая иммунная

защита. Эта часть иммунной системы адаптирует свою реакцию во время инфекционного процесса, чтобы улучшить распознавание чужеродного биологического материала. Такой улучшенный ответ сохраняется после уничтожения возбудителя в виде иммунологической памяти. Она позволяет механизмам приобретённого иммунитета развивать более быструю и более сильную ответную реакцию при каждом появлении такого же возбудителя (табл. 7).

Таблица 7

Характеристика видов иммунитета

| Врождённый иммунитет | Приобретённый иммунитет |
|--|--|
| Реакция неспецифична | Специфическая реакция, привязанная к чужеродному антигену |
| Столкновение с инфекцией приводит к немедленной максимальной реакции | Между контактом с инфекцией и максимальным ответом латентный период |
| Клеточные и гуморальные звенья | Клеточные и гуморальные звенья |
| Не обладает иммунологической памятью | Столкновение с чужеродным агентом приводит к иммунологической памяти |
| Обнаруживается практически у всех форм жизни | Обнаружена только у некоторых организмов |

Как врождённый, так и приобретённый иммунитет, зависят от способности иммунной системы отличать свои молекулы от чужих. Один из классов "чужих" молекул называют антигенами (термин произошёл от сокращения англ. Antibody generators – «вызывающие антитела») и определяют как вещества, связываемые со специфическими иммунными рецепторами и вызывающие иммунный ответ.

Приобретённый иммунитет подразделяют на клеточный (обусловлен Т-лимфоцитами) и гуморальный (обусловлен В-лимфоцитами). В-лимфоциты продуцируют специфические гликопротеины – антитела или иммуноглобулины. Эти молекулы способны специфически распознавать антигены в сыворотке крови и связывать их, образуя комплекс антиген-антитело.

Для определения наличия комплексов антиген-антитело в биологических средах используются методы иммунохимического анализа, которые можно разделить на следующие группы:

1. Прямые методы определения реакции антиген-антитело. Образующийся при этом комплекс антиген-антитело идентифицируется визуально либо с помощью оптических устройств. К методам определения растворимых антигенов относятся преципитация в растворе (реакция турбодиметрии и нефелометрии), в геле, на полимерной пленке. К методам определения корпускулярных антигенов (клеточных) относятся агглютинация бактериальных клеток, прямая реакция агглютинации эритроцитов специфическими антителами к этим антигенам.

2. Реакции пассивной агглютинации, т. е. агглютинации частиц, поверхность которых сенсibilизирована антигенами или антителами. К этим методам относятся реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) и непрямой гемагглютинации (РНГА), латекс-агглютинации, реакция связывания комплемента (РСК).

3. Методы, основанные на использовании различного рода меток для выявления реакции антиген-антитело. К ним относятся иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммунологический анализ (РИА), иммунофлюоресцентный (ИФ) метод.

Принцип реакции агглютинации (РА)

Реакция используется для полуколичественного определения антигенов или антител в образце сыворотки, плазмы и других биологических жидкостях. Реакция проходит в две стадии:

первая специфическая – связывание антигена с антителом, невидимая;
вторая неспецифическая – агрегация комплексов «АГ+АТ» – образование агглютината и выпадение в осадок, видимая стадия.

Частицами-носителями антигена могут быть естественные клетки: клетки крови – эритроциты, лейкоциты, реже тромбоциты, бактериальные клетки.

Реакция агглютинации, где в качестве субстрата используются эритроциты, называется *гемагглютинация*.

Различают два варианта РА: прямую и непрямую.

Примером реакции прямой агглютинации является определение групп крови. Реакция относится в данном случае к качественным, поскольку определяется только факт наличия или отсутствия тех или иных антигенов эритроцитов. РА применяется также для определения антиэритроцитарных антител (антиглобулиновая проба Кумбса). Избыток антигена или антител в системе приводит к торможению образования агглютинационной решетки, а значит и РА.

Для повышения чувствительности РА антигены связывают с инертными частицами (латекс, эритроциты, бентонит, парамагнитные частицы). Реакция носит название «Реакция пассивной гемагглютинации, или Реакция непрямой гемагглютинации» (РПГА, или РНГА). Методика постановки РПГА аналогична таковой при РА.

Чувствительность РА и РПГА определяется тем максимальным разведением сыворотки, при котором еще наблюдается агглютинация эритроцитов (или других частиц). Контроль качества метода требует постановки положительных и отрицательных контролей.

Принцип реакции преципитации (РП)

Реакция используется в случаях определения растворимых антигенов. Реакция преципитации, происходящая в растворах, может учитываться с помощью нефелометрии.

Антиген, внесенный в лунку агарового слоя, содержащего специфические антитела, диффузируясь в агаре, образует кольца преципитации. Диаметр колец увеличивается до тех пор, пока весь вынесенный антиген не будет связан с содержащимися в геле антителами. Величина преципитата отражает количество антител в геле, эквивалентное концентрации внесенного антигена. *Чувствительность* метода составляет до 5 мкг/мл.

Определение групп крови

Существуют разные виды классификации крови на группы. В основе разделения крови людей на группы в системе АВО лежит наличие в эритроцитах агглютиногенов (А,В), а в плазме крови агглютининов (α , β). При взаимодействии одноименных агглютиногенов и агглютининов происходит реакция гемагглютинации, то есть склеивание эритроцитов.

Агглютиногены возникают у человека и животных еще в эмбриональном периоде развития. Агглютинины появляются позже, и титр их в сыворотке крови у детей первых недель после рождения очень низок.

В зависимости от наличия в эритроцитах агглютиногенов А и В, а в сыворотке соответствующих им агглютининов α и β , все люди разделены на четыре группы:

Группа О (I) – в эритроцитах агглютиногенов нет, в сыворотке агглютинины α и β .

Группа А (II) – в эритроцитах агглютиноген А, в сыворотке агглютинин β .

Группа В (III) – в эритроцитах агглютиноген В, в сыворотке агглютинин α .

Группа АВ (IV) – в эритроцитах агглютиногены А и В, агглютининов в сыворотке нет.

Антиген А не является однородным, существует два основных его подтипа. В соответствии с этим группа А (II) имеет две подгруппы $A_1(II)$ и $A_2(II)$, а группа АВ(IV) – $AB_1(IV)$ и $AB_2(IV)$.

Групповой антиген В отличается большей однородностью, хотя описаны редкие его варианты. Однако существенного клинического значения это не имеет.

Под термином «совместимость» понимают сочетание крови донора и реципиента по антигенам и антителам, не вызывающее иммунологических взаимодействий.

Групповая принадлежность крови по системе АВО определяется с помощью реакции агглютинации. В настоящее время используют три способа определения групп крови по системе АВО:

1. По стандартным изогемагглютинирующим сывороткам. Суть метода сводится к обнаружению в испытуемой крови групповых антигенов А и В с помощью стандартных изогемагглютинирующих сывороток.

2. По стандартным изогемагглютинирующим сывороткам и стандартным эритроцитам (перекрестный способ). Суть метода состоит в определении наличия или отсутствия в исследуемой крови групповых антигенов А и В с помощью стандартных изогемагглютинирующих сывороток, а также групповых антител α и β с помощью стандартных эритроцитов.

3. С помощью моноклональных антител (целиклонов анти-А и анти-В). Для определения группы крови используются моноклональные антитела, для получения которых применяется гибридная биотехнология.

При плановом исследовании врач стационара определяет группу крови по стандартным изогемагглютинирующим сывороткам или с помощью целиклонов, после чего посылает кровь в серологическую лабораторию для проверки группы перекрестным методом.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Современные представления об иммунной системы человека.
2. Виды иммунитета.
3. Серологические методы исследования.
4. Реакция преципитации. Определение. Виды. Принцип постановки.
5. Реакция агглютинации. Определение. Виды. Принцип постановки.
6. Определение групп крови.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, роль иммунологических исследований в лабораторной диагностике.
2. Записать основные компоненты иммунной системы и виды иммунитета.
3. Интерпретировать результаты определения группы крови на плоскости с использованием целиклонов.

13. Тема занятия: Иммуноферментные методы в лабораторной диагностике.

Цель занятия: Ознакомиться с принципом проведения иммуноферментного анализа. Освоить проведение твердофазного неконкурентного иммуноферментного анализа.

Перечень знаний и практических навыков:

- Знать методы диагностики основанные на использовании меченных компонентов реакции.
- Освоить порядок подготовки оборудования, материала и реактивов для проведения иммуноферментного метода исследования.
- Освоить техническое выполнение метода.
- Уметь интерпретировать результаты, получаемые после проведения иммуноферментного анализа.

Общим признаком методов иммуноанализа является использование иммунных агентов – антител и антигенов. В основе иммуноферментного анализа (ИФА) лежит известная иммунная реакция антигена и антитела. Один из этих реагентов является определяемым веществом, а другой – узнающим.

Для выявления образовавшихся иммунных комплексов [антиген-антитело] используется фермент, которым предварительно метится узнающий компонент (антиген или антитело). Сам фермент, естественно, не виден, поэтому визуализация присутствия вещества, определяемого методом ИФА, достигается применением посредника – хромогена. Это особое химическое соединение, которое хорошо растворимо в воде, и раствор которого бесцветен. Превращение бесцветного хромогена в цветное вещество (хромофор) происходит под действием фермента, для которого хромоген является субстратом. Меченный ферментом специфический компонент в конце проведения иммунной реакции находится в двух состояниях:

- связанном в составе комплекса «антиген-антитело»;
- свободном за счет не вступивших в реакцию избыточных антигенов или антител.

Количество образовавшихся комплексов [антиген-антитело], а тем самым и содержание определяемого вещества, оценивают по содержанию ферментной метки в составе специфического иммунного комплекса. Количество метки определяют по ее каталитической активности. Перед проведением ферментативной реакции необходимо разделить свободную и связанную фракции ферментной метки. С этой целью применяют иммуносорбент, состоящий из двух компонентов: специфического реагента, выполняющего роль «ловушки», и нерастворимого вещества, которое именуется термином «твердая фаза», и на поверхности которого образуются иммунные комплексы.

Кроме специфического реагента, сорбированного на твердой фазе, все остальные компоненты, используемые на всех этапах иммуноферментного анализа и привносимые последовательно на твердую фазу, в том числе исследуемый образец (сыворотка), находятся в растворенном виде, то есть в жидкой фазе. После образования на твердой фазе специфического комплекса антиген–антитело жидкая фаза удаляется. Вместе с другими веществами и реагентами, содержащимися в растворе, удаляется и не вступивший в специфическую связь реагент, меченный ферментом. В итоге на твердой фазе остается только ферментная метка, входящая в состав комплекса [антиген-антитело]. С внесением на твердую фазу хромоген-субстратного раствора начинается ферментативная реакция, результаты которой определенным образом регистрируются (рис. 15).



Рис. 15. Твердофазный иммуноферментный анализ

Таким образом в иммуноферментном анализе используются следующие реагенты: антигены, антитела, твердая фаза, ферментная метка, субстрат и хромоген.

Рассмотрим количественное определение иммуноглобулина Е методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Иммуноглобулин Е, содержащийся в пробе специфически связывается с сорбированными на твердой фазе (лунки полистироловых планшетов) моноклональными антителами к IgE, а далее с моноклональными антителами той же антигенной специфичности, конъюгированными с ферментом-пероксидазой хрена. После отмывания лунок планшетов от несвязавшихся реагентов определяется активность пероксидазы конъюгата, связавшегося с определяемым иммуноглобулином с помощью фотометрирования при длине волны 450 нм. Интенсивность окраски хромогена пропорциональна концентрации IgE в анализируемом образце. Концентрацию IgE в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания IgE в калибровочных пробах.

Иммунолюминесценция

Иммунофлюорисценция – это процесс, при котором комплексы антиген/антитело можно сделать видимыми под микроскопом. Таким образом, антитело или антиген можно локализовать и идентифицировать в ткани, или любой вид патологического вещества, зафиксированного на стекле. Микроорганизмы или антиядерные факторы, и т.д., можно обнаружить в тканях. Для визуализации комплексов Ag-At используют антитела или антигены конъюгированные с флюорисцентными красками – флюоресцин (зеленовато-желтый цвет) и родамин (оранжево-красный цвет).

Препараты рассматриваются под микроскопом при ультрафиолетовом излучении на темном фоне. Ультрафиолет приводит к активации флюоресценции красителя. Эта техника, хотя очень деликатная, широко используется, особенно с моноклональными антителами.

Основные части люминесцентного микроскопа:

1. Источник света. Как правило, используются ртутные лампы, излучающие видимый и ультрафиолетовый свет.

2. Система светофильтров:

- первичный фильтр (фильтр возбуждения) пропускает только коротковолновые лучи, которые поглощаются красителем и возбуждают его флуоресценцию;

- вторичный фильтр (запирающий фильтр) пропускает свет, излучаемый флуорохромом и не пропускает коротковолновые лучи;

- светоделительная пластина направляет возбуждающий свет от возбуждающего фильтра на объект и пропускает люминисцирующий свет от объекта на запирающий светофильтр.

3. Люминесцентный объектив формирует изображение объекта и одновременно является оптической системой освещения.

4. Оптическая система тубусных линз формирует изображение объекта на сетчатке глаза.

Можно выделить несколько видов проведения анализа с помощью люминесцентной микроскопии:

1. Прямой метод (для выявления антигенов): антитела, к искомому антигену, помечены красителем.

2. Непрямой метод (для выявления антигенов): Добавляются немаркированные антитела к искомому антигену. Комплекс антиген-антитело обрабатывается антииммуноглобулиновой сывороткой, помеченной красителем. В сравнении с прямым методом, непрямая техника позволяет получить большую интенсивность флуоресценции.

Техника «бутерброда» (применяется для определения антител): Немаркированный раствор антигена наслаивается на препарат с искомыми антителами для образования комплекса антиген-антитело. Затем наслаивают меченые антитела к антигену. Благодаря своей поливалентной структуре (несколько эпитопов), антиген может одновременно фиксировать искомые и

помеченные краской антитела. Флюоресценция появляется только тогда, когда маркированное антитело прикрепилось к какому-нибудь комплексу антиген-антитело, то есть, если существуют искомые антитела.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Методы, основанные на использовании меченных компонентов реакции.
2. Иммуноферментный анализ. Принцип метода.
3. Иммунофлуоресцентный анализ. Принцип метода.
4. Диагностика и мониторинг инфекционных заболеваний.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, видов иммунологической диагностики с использованием меченных компонентов реакции.
2. Записать принципиальную схему иммуноферментного анализа.
3. Интерпретировать результаты иммуноферментного анализа.

Рекомендуемая литература

Основная литература:

1. Кишкун А. А. Клиническая лабораторная диагностика [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Кишкун А. А. - М. : ГЭОТАР-Медиа , 2009 . – Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru>

2. Кишкун А. А. Клиническая лабораторная диагностика [Текст] : учеб. пособие / Кишкун А. А. - М. : ГЭОТАР-Медиа , 2010 . - 971 с. : ил.

3. Кишкун А. А. Руководство по лабораторным методам диагностики [Электронный ресурс] : [учеб. пособие] для врачей и фельдш., оказывающих первич. мед.-сан. помощь / Кишкун А. А.; Ассоц. мед. о-в по качеству . - М. : ГЭОТАР-Медиа , 2009. – 780 с. : ил. – Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru>

4. Биохимия [Электронный ресурс] : учебник / под ред. Е.С.Северина; [авт. кол.: Л.В.Авдеева и др.] . - 5-е изд. . - М. : ГЭОТАР-Медиа , 2009 . - 759с.:ил. . - Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru>

5. Клиническая биохимия [Электронный ресурс] : учеб. пособие / под ред. В. А. Ткачука; [авт.: В. Н.Бочков, А. Б. Добровольский, Н. Е. Кушлинский и др.]. - 3-е изд., испр. и доп. . - М. : ГЭОТАР-Медиа , 2008 . - 454 с.: ил. . - Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru>

Дополнительная литература:

1. Цыганенко А. Я. Клиническая биохимия [Текст] : учеб. пособие / Цыганенко А. Я., Жуков В. И., Мясоедов В. В. и др. . - М. : Триада-Х , 2002 . - 500 с.: ил.

2. Маршалл В. Дж. Клиническая биохимия [Текст] / Маршалл В. Дж. ; Пер. с англ. под ред. Н. И. Новикова . - 2-е изд., перераб. и доп. . - М. : БИНОМ; СПб.: Нев. Диалект , 2002 . - 383 с.: ил.

3. Вебер В. Р. Лабораторные методы исследования. Диагностическое значение [Текст] : учеб. пособие / Вебер В. Р., Швецова Т. П. . - М. : МИА , 2008 . - 496 с. : ил.

4. Никулин Б. А. Пособие по клинической биохимии [Текст] : для системы послевуз. проф. образования / Никулин Б. А. ; [под ред. Л. В. Акуленко] . - М. : ГЭОТАР-Медиа , 2007 . - 250 с. : ил.

5. Новиков Д. А. Статистические методы в медико-биологическом эксперименте (типовые случаи) [Текст] / Новиков Д. А., Новочадов В. В. ; РАМН, Волг. науч. центр РАМН и Адм. Волг. обл. . - Волгоград : Изд-во ВолГМУ , 2005 . - 84 с.: ил.

Тестовые задания для самоконтроля

Выберите один правильный ответ

01. ВЕНТИЛЯЦИЯ ВО ВСЕХ ПОМЕЩЕНИЯХ ЛАБОРАТОРИИ ДОЛЖНА ВКЛЮЧАТЬСЯ:

- 1) перед началом работы
- 2) во время работы
- 3) после работы
- 4) в строго регламентированное время

02. В СЛУЧАЕ ТРАНСПОРТИРОВКИ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА СОПРОВОДИТЕЛЬНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ ТРАНСПОРТИРУЕТСЯ:

- 1) вместе с материалом в одной емкости
- 2) отдельно от материала (в другой емкости)
- 3) отдельно от материала (другим сотрудником)
- 4) не транспортируется

03. ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ – ЭТО:

- 1) условия производства реагентов
- 2) условия хранения реагентов
- 3) документ, устанавливающий технические требования, которым должны удовлетворять конкретное изделие
- 4) условия эксплуатации продукта

04. МЕДИЦИНСКАЯ ЭТИКА ЭТО:

- 1) специфическое проявление общей этики
- 2) наука, рассматривающая вопросы врачебного гуманизма, долга, чести, совести и достоинства медицинских работников
- 3) наука, формирующая поведенческую модель в критических ситуациях
- 4) наука, регламентирующая отношения врача и пациента

05. В РАЙОНЕ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ НОРМЫ НУЖНО ОРИЕНТИРОВАТЬСЯ НА ЗНАЧЕНИЯ АНАЛИТОВ:

- 1) приведенные в справочной литературе
- 2) приведенные в инструкциях к использованным наборам
- 3) референтные значения контрольных сывороток
- 4) выведенные для данной местности и приведенные в бланке лаборатории

06. СХОДИМОСТЬ ИЗМЕРЕНИЯ – ЭТО КАЧЕСТВО ИЗМЕРЕНИЯ, ОТРАЖАЮЩЕЕ:

- 1) близость результатов к истинному значению измеряемой величины
- 2) близость результатов измерений, выполняемых в одинаковых условиях
- 3) близость результатов измерений, выполняемых в разных условиях
- 4) близость к нулю систематических ошибок в их результатах

07. ПЛАЗМУ КРОВИ ПОЛУЧАЮТ ПУТЕМ:

- 1) спонтанно свернувшейся цельной крови с последующим центрифугированием
- 2) центрифугирования крови с антикоагулянтом
- 3) центрифугирования нативной крови

08. В СЫВОРОТКЕ КРОВИ, В ОТЛИЧИЕ ОТ ПЛАЗМЫ, ОТСУТСТВУЕТ:

- 1) альбумин
- 2) комплемент
- 3) калликреин
- 4) фибриноген

09. НОРМАЛЬНОЕ КОЛИЧЕСТВО ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ СОСТАВЛЯЕТ:

- 1) $2-5 \times 10^9$ /л
- 2) $4-9 \times 10^9$ /л
- 3) $8-12 \times 10^9$ /л
- 4) $3-4 \times 10^9$ /л

10. ПОКАЗАТЕЛЬ RDW, РЕГИСТРИРУЕМЫЙ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ АНАЛИЗАТОРАМИ, ОТРАЖАЕТ ИЗМЕНЕНИЕ:

- 1) радиуса эритроцитов
- 2) количества эритроцитов
- 3) насыщения эритроцитов гемоглобином
- 4) различия эритроцитов по объему (анизоцитоз)
- 2) количества лейкоцитов в крови

11. ПОДСЧИТАНО 80 ТРОМБОЦИТОВ НА 1000 ЭРИТРОЦИТОВ, КОЛИЧЕСТВО ЭРИТРОЦИТОВ В КРОВИ РАВНО $4,0 \cdot 10^{12}/л$, ЧИСЛО ТРОМБОЦИТОВ В КРОВИ СОСТАВЛЯЕТ:

- 1) $240 \cdot 10^9/л$
- 2) $280 \cdot 10^9/л$
- 3) $300 \cdot 10^9/л$
- 4) $320 \cdot 10^9/л$
- 5) $340 \cdot 10^9/л$

12. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ЭОЗИНОФИЛОВ СЛЕДУЮЩИЕ:

- 1) сегментированное ядро и полихроматофильная цитоплазма
- 2) крупное базофильное ядро и обильная нежносетчатая цитоплазма
- 3) крупное округлое базофильное ядро и узкий ободок базофильной цитоплазмы
- 4) двулопастное ядро и гранулы в виде кетовой икры

13. ОСНОВНЫМ ТИПОМ ГЕМОГЛОБИНА ВЗРОСЛОГО ЧЕЛОВЕКА ЯВЛЯЕТСЯ:

- 1) HbP
- 2) HbF
- 3) HbA
- 4) HbS
- 5) HbD

14. ОБЪЕМ ЭРИТРОЦИТА В НОРМЕ СОСТАВЛЯЕТ:

- 1) 150 фл
- 2) 33 фл
- 3) 70 фл
- 4) 80-95 фл

15. ПОНЯТИЕ «АБСОРБЦИЯ» В ФОТОМЕТРИИ ИДЕНТИЧНО ПОНЯТИЮ:

- 1) отражение
- 2) пропускание
- 3) рассеивание
- 4) оптическая плотность
- 5) тушение

16. СОДЕРЖАНИЕ КРЕАТИНИНА В КРОВИ УВЕЛИЧИВАЕТСЯ ПРИ:

- 1) хронической почечной недостаточности
- 2) гепатите
- 3) гастрите
- 4) язвенном колите

17. ПРОТЕИНУРИЯ МОЖЕТ БЫТЬ ПОКАЗАТЕЛЕМ ПОРАЖЕНИЯ:

- 1) поджелудочной железы
- 2) печени
- 3) мочевыводящих путей
- 4) тонкого кишечника

18. РОЗОВЫЙ ИЛИ КРАСНЫЙ ЦВЕТ МОЧИ МОЖЕТ СВИДЕТЕЛЬСТВОВАТЬ О НАЛИЧИИ:

- 1) эритроцитов
- 2) липидов
- 3) лейкоцитов
- 4) уробилина

19. НЕКОНЬЮГИРОВАННЫЙ БИЛИРУБИН В ГЕПАТОЦИТАХ ПОДВЕРГАЕТСЯ:

- 1) соединению с серной кислотой
- 2) декарбоксилированию
- 3) соединению с глюкуроновой кислотой
- 4) дезаминированию

20. АКТИВНОСТЬ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ ВАЖНА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ:

- 1) вирусного гепатита
- 2) обтурационной желтухи
- 3) токсического гепатита
- 4) рака печени

21. СКРИНИНГ ОПУХОЛЕЙ ВКЛЮЧАЕТ:

- 1) массовое обследование и уточняющую диагностику
- 2) обследование людей, не входящих в группу риска
- 3) обследование малой группы населения

22. ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ ОСНАЩЕНА:

- 1) микроскопом
- 2) гематологическим анализатором
- 3) проточным цитофлюориметром
- 4) биохимическим анализатором

23. ПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ ПРОИСХОДЯТ ИЗ:

- 1) В-лимфоцитов
- 2) Т-лимфоцитов
- 3) макрофагов
- 4) фибробластов

24. ЦИТОКИНЫ - ЭТО:

- 1) белки, выделяемые покоящимися лейкоцитами
- 2) белки, относящиеся к разряду антител, выделяемые активированными лимфоцитами
- 3) низкомолекулярные белки, выделяемые активированными лимфоцитами и макрофагами, являющиеся медиаторами воспаления и иммунного ответа

25. ПРИ ПЕРВИЧНОМ ОТВЕТЕ СНАЧАЛА ОБРАЗУЮТСЯ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ КЛАССА:

- 1) IgG, IgD
- 2) IgM
- 3) IgA
- 4) IgE
- 5) IgD

26. НАИБОЛЕЕ ЧАСТОЙ ПРИЧИНОЙ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ НОВОРОЖДЕННЫХ ЯВЛЯЮТСЯ АНТИТЕЛА К:

- 1) антигенам системы АВО
- 2) антигенам системы - резус
- 3) антигенам М, Даффи
- 4) антигенам Келл

ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

| № тестового задания | № ответа |
|---------------------|----------|
| 01 | 1 |
| 02 | 2 |
| 03 | 3 |
| 04 | 2 |
| 05 | 4 |
| 06 | 2 |
| 07 | 2 |
| 08 | 4 |
| 09 | 2 |
| 10 | 4 |
| 11 | 4 |
| 12 | 4 |
| 13 | 3 |
| 14 | 4 |
| 15 | 4 |
| 16 | 1 |
| 17 | 3 |
| 18 | 1 |
| 19 | 3 |
| 20 | 2 |
| 21 | 1 |
| 22 | 1 |
| 23 | 1 |
| 24 | 3 |
| 25 | 2 |
| 26 | 2 |