

**Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Северо-Осетинская государственная медицинская академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

КАФЕДРА ДЕТСКИХ БОЛЕЗНЕЙ №3

ИНСТИТУТ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВНЦ РАН

СИСТЕМА КРОВЕТВОРЕНИЯ

**«Рекомендовано Учебно-методическим объединением по
медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России в
качестве учебного пособия для системы дополнительного
профессионального образования врачей»**

ВЛАДИКАВКАЗ, 2020

Составители:

Зав. кафедрой, д.м.н., профессор **Касохов Т.Б.**

Доцент кафедры, к.м.н., доцент **Цораева З.А.**

Рецензенты:

С.М. Безроднова – д.м.н., профессор, зав. кафедрой педиатрии ФПДО ФГБОУ ВО СтГМУ Минздрава России

Э.В. Дудникова – д.м.н., профессор, зав. кафедрой детских болезней №1 ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России

В предлагаемом пособии отражены физиология системы крови и методы исследования, использующиеся в гематологической практике. Уделено внимание этиологии, патогенезу, клинической картине, изменениям лабораторных и инструментальных данных. Книга предназначена для клинических ординаторов, врачей КДЛ, интересующихся проблемами гематологии, а также студентов медицинских вузов.

Список сокращений

ЭСК - эмбриональных стволовых клеток

КОЕ-ГЭММ - колониеобразующие единицы гранулоцито-эритро-моноцито-мегакариоцитопоэза

CD - кластер дифференцировки

БОЕ-Э - бурстобразующими единицами эритропоэза

КОЕ-Э - колониеобразующими единицами эритропоэза

НбF - фетальный гемоглобин

СКК - стволовых кроветворных клеток

TGF- β - трансформирующий ростовой фактор β

MIP-1 α - макрофагальный воспалительный белок

ФНО- α - фактор некроза опухоли α

ИЛ - интерлейкины

ЭПО - эритропоэтина

СМФ - систему мононуклеарных фагоцитов

КЛ - клетки Лангерганса

АПК - антигенпредставляющим клеткам

ИФ- α - интерферон альфа

ОКС - открытая канальцевая система

ПМТС - плотную микротубулярную систему

СГТ - синдром геморрагической тромбоцитемии

ГИТ - гепарин-индуцированной тромбоцитопении

Содержание

Введение.....	6
Эмбриональное кроветворение.....	6
Строение костного мозга.....	10
Клетки стромы костного мозга.....	12
Структурная организация кроветворной системы.....	14
Регуляция гемопоэза.....	17
Механизмы апоптоза.....	20
Эритропоэз.....	22
Морфология клеток эритроидного ряда.....	26
Гранулоцитопоэз.....	34
Морфология клеток гранулоцитопоэза.....	36
Нейтрофилы.....	38
Участие нейтрофилов в воспалительной реакции.....	43
Эозинофилы.....	44
Базофилы и тучные клетки.....	46
Моноцитопоэз.....	48
Морфология клеток моноцитопоэза.....	49
Мегакариоцитопоэз.....	59
Морфология клеток мегакариоцитопоэза.....	59
Мембрана и цитоскелет тромбоцитов.....	61
Рецепторы мембраны тромбоцитов.....	63
Интегрины.....	64
Тромбоцитарные факторы.....	67
Агрегация тромбоцитов.....	73
Лимфоцитопоэз.....	75
Реактивные изменения крови.....	90
Лейкоцитоз.....	91
Лейкопения.....	96
Наследственные нарушения морфологии лейкоцитов.....	101
Эозинофилия.....	102
Эозинопения.....	104
Базофилия.....	104
Лимфоцитоз.....	105
Лимфоцитопения.....	108
Моноцитоз.....	108
Эритроцитоз.....	108

Эритроцитопения.....	109
Тромбоцитоз.....	111
Тромбоцитопения.....	113
Тромбоцитопения, вызванная гепарином.....	115
Тромбоцитопатии	117
Лабораторные методы исследования клеток крови.....	117
Антикоагулянты.....	124
Доставка, хранение и подготовка проб к исследованию.....	128
Влияние преаналитических факторов, зависящих от пациента.....	130
Исследование содержания гемоглобина.....	131
Исследование эритроцитарных показателей подсчет количества эритроцитов в счетной камере.....	137
Определение размеров эритроцитов.....	138
Гематокрит (показатель гематокрита).....	140
Резистентность эритроцитов.....	142
Скорость оседания эритроцитов (СОЭ).....	144
Подсчет количества ретикулоцитов.....	149
Подсчет количества лейкоцитов.....	150
Подсчет количества тромбоцитов.....	151
Морфологическое исследование мазков крови.....	154
Современные технологии гематологического анализа.....	158
Проточные гематологические анализаторы.....	161
Основные показатели гематологических анализаторов и факторы, влияющие на их значение.....	167
Тестовые задания.....	176
Эталоны ответов к тестовым заданиям.....	185
Рекомендуемая литература.....	186

Введение

Кроветворение (гемопоз) - многостадийный процесс дифференцировки клеточных элементов, в результате которого образуются эритроциты, лейкоциты, тромбоциты, составляющие в норме около 40% объема крови. Образование и дифференцировка этих клеток осуществляется в кроветворных органах: костном мозге, тимусе, селезенке и лимфатических узлах, представляющих единую кроветворную систему. Развитие кроветворения происходит сменой преимущественной локализации его в различные периоды жизни человека, а каждый из кроветворных органов играет особую роль в размножении и созревании гемопозитических клеток.

ЭМБРИОНАЛЬНОЕ КРОВЕТВОРЕНИЕ

В результате дробления оплодотворенной яйцеклетки образуется бластоциста, затем бластула и гастрюла. Внутренняя клеточная масса бластоцисты держит 30-150 эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Эти клетки обладают тотипотентностью, т. е. способностью давать начало всем без исключения клеткам и тканям организма. На стадии гастрюлы (в результате сложных перемещений клеток) образуется 3 зародышевых листка - экто-, мезо- и энтодерма. Мезодерма - средний зародышевый листок - дает начало костному мозгу, крови, сердечно-сосудистой системе. Мезенхима является производной мезодермы, из нее формируется соединительная ткань организма. Образование органов из ЭСК, включая гемопозитические - костный мозг, тимус, селезенку, лимфатические узлы, лимфоидную ткань, ассоциированную со слизистыми оболочками, и другие - осуществляется благодаря функционированию генов, реализующих генетическую программу в клетке.

Закладка кроветворной системы осуществляется при взаимодействии трех клеточных пулов - производных мезодермы - гемопозитического, стромального и сосудистого. Выделяют 4 критических периода становления гемопоза: 1 период - возникновение первых кроветворных клеток-

предшественников в желточном мешке эмбриона (внеэмбриональное кроветворение) - 4-5-я неделя развития плода; II период - заселение печени плода кроветворными клетками-предшественниками и начало внутриэмбрионального печеночного кроветворения (5-я неделя внутриутробного развития); III период - проникновение ранних Т-лимфоцитов в тимус и формирование Т-клеточной иммунной системы (9-10-я неделя); IV период - смена печеночного кроветворения на костномозговое (15-18-я неделя).

В течение I периода происходит зарождение кроветворных клеток во внеэмбриональной мезенхиме и становление начального гемопоэза в желточном мешке, хорионе в виде кровяных островков, окруженных клетками эндотелия. Эндотелиальные клетки, сливаясь в капилляры, соединяют желточный мешок с эмбрионом. Процесс возникновения кроветворения тесно связан и идет параллельно с формированием сосудистой сети, к 4-5-й неделе развития эмбриона создаются возможности для миграции примитивных кроветворных клеток в печень, а на 8-10-й неделе - в тимус.

Первыми клетками, которые к концу 4-й недели образуются в желточном мешке, являются бласты, примитивные эритробласты-мегалобласты, синтезирующие «примитивный» тип гемоглобина - HbF. На 4-5-й неделе развития эмбриона в желточном мешке возникают полипотентные клетки-предшественники гранулоцито-эритро-моноцито-мегакариоцитопоэза, образующие смешанные колонии в составе этих клеток - КОЕ-ГЭММ (колониеобразующие единицы гранулоцито-эритро-моноцито-мегакариоцитопоэза). Эти клетки экспрессируют рецепторы стволовых клеток CD34 (CD - кластер дифференцировки). Одновременно с ними в желточном мешке появляются бипотентные грануломоноцитарные клетки-предшественники - КОЕ-ГМ. В эти же сроки обнаруживаются эритроидные клетки-предшественники. По способности образовывать в культуре крупные эритроидные колонии из нескольких агрегатов - бурсты или просто эритроидные колонии - их называют соответственно бурстообразующими

единицами эритропоэза (БОЕ-Э) и колониеобразующими единицами эритропоэза (КОЕ-Э). Активный гемопоэз в желточном мешке полностью заканчивается к 10-12-й неделе.

Вторым критическим периодом эмбрионального гемопоэза является формирование печеночного кроветворения. Печень становится центральным органом гемопоэза с 5-й по 22-ю неделю внутриутробного развития плода. Печеночная ткань представлена гепатоцитами - производными энтодермы и кроветворными клетками - производными мезодермы. К 30-му дню эмбриональной печени определяются первые гемопоэтические клетки, несущие маркер ранних клеток-предшественников - CD34. В эмбриональной печени гемопоэз преимущественно эритроидный, изменение морфологии эритробластов сопровождается сменой типов гемоглобина. С 7-й недели эритробласты печени синтезируют фетальный гемоглобин (HbF), одновременно продолжает существовать и примитивный эритропоэз, заканчивающийся к 3-му месяцу развития плода. Печень в этот период является органом преимущественного синтеза гемоглобина. Несколько позже (7-8 неделя) в эмбриональной печени осуществляется гранулоцитопоэз, моноцитопоэз, мегакариоцитопоэз. К 9-й неделе в печени плода наблюдается В-лимфопоэз. Наибольшая интенсивность пролиферативной активности в печени приходится на 8-9 и 16-22-ю неделю, свидетельствуя о том, что процесс миграции стволовых клеток из печени в костный мозг имеет пролонгированный характер. Кроветворение в небольшом объеме в печени остается до 7-го месяца. Тимус, селезенка и кости с костномозговыми полостями начинают формироваться практически сразу после образования печени. Но для всех этих органов существует период, когда они не являются кроветворными. Так, тимус закладывается на 6-й неделе развития плода и только после 8-й недели происходит его заселение лимфоидными клетками-предшественниками и начинается активный лимфопоэз. К концу 3-го месяца тимическая ткань разделена на кору, богатую мелкими лимфоцитами, и мозговую часть,

содержащую лимфоциты на разных стадиях созревания и тимические тельца. Формирование Т-клеточной иммунной системы относится к третьему критическому периоду гемопоэза.

Селезенка формируется с 5-6-й недели. На 12-й неделе в строме селезенки появляются первые островки эритробластов, гранулоцитов. Образование белой пульпы с лимфопоэзом начинается с 15-й недели. Гемопоэз в селезенке достигает своего максимума к 4-му месяцу, а затем идет на убыль и прекращается к 6,5 мес. внутриутробного развития.

Четвертый период кроветворения происходит в костном мозге и его становление идет параллельно с формированием костей скелета (8-11 недель). Костный мозг в течение 2 недель не является гемопоэтическим. В этот период образуется его стромальный матрикс. Костные рудименты окружаются сетью капилляров, а также клетками - предшественниками остеобластов и макрофагов. К 10-й неделе между костными трабекулами образуются большие сосудистые синусы и костномозговые полости. С 15-16-й недели костный мозг становится центральным органом гемопоэза, функционирующим весь период жизни человека. В костном мозге плода представлены клетки всех ростковкроветворения различной степени зрелости. Для костномозгового кроветворения, в отличие от печени, характерна миелоидная направленность. Снова меняется тип гемоглобина: до 20-й недели у плода синтезируется в основном фетальный гемоглобин, с нарастанием синтеза β -цепей глобина увеличивается образование взрослого типа гемоглобина - HbA.

Первые лимфатические узлы появляются примерно на 13-14-й неделе развития эмбриона, они вначале представляют универсальный орган кроветворения. На 7-м месяце миелопоэз в лимфатических узлах быстро сменяется образованием лимфоцитов. К моменту рождения ребенка определяется около 220 лимфатических узлов. Однако окончательное формирование синусов и стромы лимфатических узлов происходит в постнатальном периоде.

Таким образом, эмбриональное кроветворение характеризуется последовательной сменой кроветворных органов. Вначале гемопоэз проходит в желточном мешке, затем в печени, тимусе, селезенке, лимфатических узлах и в костном мозге, который после рождения остается единственным органом миелопоэза. Лимфоциты, имея с миелоидными клетками единую стволовую кроветворную клетку, пройдя определенные стадии дифференцировки в костном мозге и тимусе, в последующем развиваются в лимфоидных органах. До 7-го месяца эмбриональное кроветворение носит универсальный характер. Предполагают, что период изменения территории и типа кроветворения наиболее уязвим для возникновения врожденных заболеваний крови.

Интерес к эмбриональному гемопоэзу в последние годы значительно возрос в связи с возможностью трансплантации гемопоэтических предшественников, полученных из пуповинной крови

У ребенка красный (активный) костный мозг располагается во всех костях скелета, а с 3-4 лет начинается постепенное его замещение на жировой. У взрослого человека красный костный мозг находится в губчатых костях скелета и эпифизах трубчатых костей. Масса красного костного мозга составляет 1400-1500 г.

СТРОЕНИЕ КОСТНОГО МОЗГА

Главным органом гемопоэза является костный мозг. Кроветворная ткань заключена в костный чехол, который выполняет не только защитную, но и регулируемую гемопоэз функцию. Кость, ее балки и трабекулы образуют главную опорную структуру, ограничивающую зоны кроветворения. Клеточными элементами костной ткани являются остеобласты, остеоциты и остеокласты. Костный мозг - высоко васкуляризированный орган, который сообщается с кровотоком посредством капиллярной сети. Различают два типа капилляров: питающие (обычные) и функциональные (синусоиды), которые впадают в общий ствол - центральную вену. Синусоиды располагаются радиально, между ними, в полости или нише, находятся кроветворные клетки.

Стенка синусоидов состоит из трех слоев: базальная мембрана, клетки эндотелия и адвентиции. Эндотелий синусоидов образует поры, через которые клетки покидают костный мозг. Базальная мембрана - это субэндотелиальный матрикс, состоящий из ламинина и коллагена IV типа. Этот слой не является непрерывным и отсутствует, прежде всего, в местах образования пор. Клетки адвентиции - фибробласты - непрерывным слоем покрывают эндотелий и вместе с ним образуют барьер для кроветворных клеток, покидающих костный мозг. По мере созревания клетки перемещаются к стенке синусоидов и поступают в кровоток. Способность гемопоэтических клеток распознавать соответствующие клетки стромы и размещаться в своих определенных зонах называется *хомингом*. Предшественники и развивающиеся кроветворные клетки располагаются следующим образом: в центре - делящиеся и незрелые клетки, на периферии (около стенок синусоидов) - более зрелые клетки. Кроветворение в костном мозге происходит островками, в которых группируются клетки по росткам гемопоэза. Развитие эритроцитов имеет место в эритробластных островках, состоящих из центрально расположенного макрофага и окружающих его эритробластов на разных стадиях созревания (рис. 3). Такие островки концентрируются непосредственно напротив синуса, а к его стенке ближе всего прилегают ретикулоциты. Макрофаги обеспечивают фагоцитоз ядер, передачу железа и цитокинов, необходимых для нормальной дифференцировки и созревания эритрокариоцитов. Мегакариоциты плотно располагаются у стенки синусоидов. Тромбоциты образуются в просвете синусоидов при проникновении цитоплазмы мегакариоцита между эндотелиальными клетками. Иногда клетки могут проходить через мегакариоциты. Это явление называется эмпириопозисом и обусловлено способностью мегакариоцитов к эндоцитозу - захвату других гемопоэтических клеток. Лимфоциты и моноциты располагаются вокруг ветвей артериальных сосудов. Гранулоциты локализуются преимущественно в отдалении от синусоидов и лишь на стадии метамиелоцитов приближаются к их стенке.

Созревая, клетки продвигаются ближе к стенке венозного синуса и проникают между слоями стенки. Для этого в цитоплазме эндотелиальных клеток имеются поры в 1-2 мкм, через которые клетки могут проходить при условии, что они обладают достаточной эластичностью. В противном случае клетки гибнут. Способность зрелых клеток перемещаться в направлении венозного синуса называется *хемотаксисом*. Этот процесс опосредован влиянием на клетку специальных веществ - хемоаттрактантов, продуцируемых пристеночными клетками.

Жировые клетки заполняют у взрослых пространство костномозговой полости, не занятое миелоидной тканью. Они являются энергетическим депо костного мозга, лабильным матриксом, легко теряющим липиды для обеспечения плацдарма развития кроветворных клеток в условиях повышенного запроса при различных патологических состояниях. Способность жировых клеток адсорбировать на своей поверхности достаточно большой спектр физиологически активных субстанций позволяет им участвовать в регуляции процессов пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток-предшественников.

КЛЕТКИ СТРОМЫ КОСТНОГО МОЗГА

Строма является производной мезенхимы и состоит из большого числа высокоспециализированных клеток - фибробластов, жировых клеток (адипоцитов), макрофагов, остеобластов, эндотелиальных клеток и внеклеточного матрикса. Строму также образуют кровеносные сосуды, нервные окончания. Внеклеточный (экстрацеллюлярный) матрикс включает продукты секреции стромальных клеток (коллагеновые или ретикулиновые волокна, фибронектин, ламинин, гликозаминогликаны, тенасцин и другие белковые компоненты). Клетки стромы и соединительнотканые волокна образуют сеть, в которой располагаются собственно кроветворные элементы, составляющие паренхиму костного мозга. Гемопоэтические клетки находятся в тесном контакте с клетками стромы. В регуляции процессов пролиферации и

дифференцировки гемопоэтических клеток большую роль играет стромальное микроокружение. Строма костного мозга является источником сигналов, которые воспринимаются рецепторами мембран клеток, преобразуются при участии сложных взаимодействий клеточных органелл и поступают в ядро, где происходит запуск экспрессии генов, необходимых для клеточной пролиферации и дифференцировки. В результате этого начинают реализовываться генетические программы, ответственные за формирование тканеспецифических и стадийспецифических клеточных фенотипов с соответствующими морфологическими и функциональными особенностями клеток гемопоэза.

Функциональные и структурные изменения элементов микроокружения могут быть причиной нарушений кроветворной функции костного мозга. В связи с этим ключевым является вопрос об участии стромы костного мозга в развитии патологических состояний гемопоэза.

Фибробласты - крупные веретенообразные или вытянутые клетки с ядром овальной формы, несколькими ядрышками и базофильной цитоплазмой.

Остеобласты - клетки до 25 мкм в диаметре, удлинённой или неправильной формы. Ядро круглое или овальное с маленьким ядрышком, эксцентрично расположено, цитоплазма серо-голубая. Они выстилают костномозговые полости, разграничивая костный мозг и кровь, участвуют в образовании кости.

Остеокласты - гигантские клетки до 80 мкм в диаметре, содержат 8-12 и более ядер с нежной структурой хроматина, в них могут встречаться нуклеолы. Цитоплазма обильная, слабобазофильных оттенков с азурофильной зернистостью. Клетки участвуют в резорбции костной ткани.

Жировые клетки (адипоциты) - до 40 мкм в диаметре с небольшим ядром, расположенным эксцентрично, бесцветной цитоплазмой, в которой жир в цитоплазме определяется при окраске суданом. В мазке костного мозга при обычной окраске жировые включения вымываются, остаются вакуоли.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КРОВЕТВОРНОЙ СИСТЕМЫ

Все клетки крови происходят из единой родоначальной клетки, морфологически напоминающей лимфоцит. Подтверждение этой гипотезы было получено лишь в 60-е годы при введении смертельно облученным мышам донорского костного мозга. Клетки, способные восстанавливать гемопоэз после облучения или токсических воздействий, носят название «стволовых клеток».

Нормальное кроветворение поликлональное, т.е. осуществляется одновременно многими клонами. Размер индивидуального клона обычно меньше 0,5-1 млн. зрелых клеток, а продолжительность жизни клона не превышает 1 месяц, около 10% клонов существуют до полугода. Как правило, клональный состав кроветворной ткани полностью меняется в течение 1-4 месяцев. Постоянная замена клонов объясняется истощением пролиферативного потенциала стволовой кроветворной клетки, поэтому исчезнувшие клоны никогда не появляются вновь. Различные гемопоэтические органы заселены разными клонами и только некоторые из них достигают такой величины, что оккупируют более чем одну кроветворную территорию.

Клетки гемопоэза условно подразделены на 5-6 отделов, границы между которыми весьма размыты, а между отделами содержится много переходных, промежуточных форм. В процессе дифференцировки происходит постепенное снижение пролиферативной активности клеток и способности развиваться сначала во все кроветворные линии, а затем во все более ограниченное количество линий.

Пул поли- или мультипотентных стволовых кроветворных клеток (СКК) (Потдел) образуется из тотипотентной ЭСК, находящейся на самом вершине иерархической лестницы (I отдел).

Стволовые кроветворные клетки обладают уникальным свойством *полипотентностью*, т. е. способностью к дифференцировке во все без исключения линии гемопоэза. В клеточной культуре можно создать условия,

когда возникающая из одной клетки колония содержит до 6 различных клеточных линий дифференцировки.

СКК закладываются в период эмбриогенеза и расходуются последовательно, образуя, сменяющие друг друга клоны более зрелых кроветворных клеток. Большинство (90%) клонов являются короткоживущими, тогда как около 10% клонов может функционировать в течение длительного времени. В целом СКК обладают высоким, но ограниченным пролиферативным потенциалом способны к ограниченному самоподдержанию, т. е. они не бессмертны. Считают, что они могут проделать приблизительно 50 клеточных делений, тем не менее, именно СКК поддерживают продукцию кроветворных клеток в течение всей жизни человека.

Отдел стволовых кроветворных клеток гетерогенен и представлен двумя категориями предшественников, обладающих различным пролиферативным потенциалом. Основная масса СКК находится в фазе покоя G_0 клеточного цикла, обладая при этом огромным пролиферативным потенциалом. При выходе из состояния покоя клетка вступает на путь дифференцировки, постепенно снижая пролиферативный потенциал и ограничивая набор возможных дифференцировочных программ. После нескольких циклов деления.

СКК может вернуться вновь в состояние покоя. При этом вернувшиеся в резервный пул СКК неравноценны исходным, их состояние покоя менее глубоко и при наличии запроса они отвечают быстрее, приобретая маркеры определенных линий дифференцировок в культуре клеток за 1-2 дня, тогда как исходным СКК требуется 10-14 дней. Такое устройство отдела СКК имеет большой биологический смысл. Длительное поддержание кроветворения обеспечивается СКК, находящимися в глубоком резерве, тогда как необходимость срочного ответа на запрос удовлетворяется за счет СКК, уже прошедших основную дистанцию на пути от G_0 к G_1 фазе клеточного цикла и находящихся в состоянии быстро мобилизуемого резерва.

Гетерогенность пула СКК и степень их дифференцировки может быть установлена на основе экспрессии ряда дифференцировочных мембранных антигенов. Среди СКК выделены примитивные мультипотентные предшественники (CD34+Thyl+) и более дифференцированные предшественники, характеризующиеся экспрессией антигена гистосовместимости II класса (HLA-DR), CD38. Истинные СКК не экспрессируют линейно специфические маркеры и дают рост всем линиям гемопоэтических клеток. Количество СКК в костном мозге невелико - около 0,01 %, а вместе с клетками-предшественниками - 0,05%.

Одним из основных методов изучения СКК является метод колониеобразования *in vivo* или *in vitro*, поэтому иначе СКК называют «колониеобразующими единицами» (КОЕ). Истинные СКК способны к формированию колоний из бластных клеток (КОЕ-бластные). Сюда же относят клетки, формирующие селезеночные колонии (КОЕс). Эти клетки способны полностью восстанавливать гемопоэз.

По мере снижения пролиферативного потенциала СКК дифференцируются в полиолигопотентные коммитированные клетки-предшественники (*III отдел*). Клетки этого отдела имеют уже ограниченную потентность, так как коммитированы (commit - принятие на себя обязательств) к дифференцировке в направлении 2-5 гемопоэтических клеточных линий. Полиолигопотентные коммитированные предшественники КОЕ-ГЭММ (гранулоцитарно-эритроцитарно-макрофагально-мегакариоцитарные) дают начало 4 росткам гемопоэза, КОЕ-ГМ - двум росткам. КОЕ-ГЭММ являются общим предшественником миелопоэза. Они имеют маркер CD34, маркер миелоидной линии - CD33, детерминанты гистосовместимости HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR.

Клетки IV отдела - монопотентные коммитированные предшественники являются родоначальными для одного ростка гемопоэза: например, КОЕ-Г- для гранулоцитарного, КОЕ-М - для моноцитарно-макрофагального, КОЕ-Э и БОЕ-

Э - предшественники эритроидных клеток, КОЕ-Мгкц - предшественники мегакариоцитов и т. д. Все коммитированные клетки-предшественники имеют ограниченный жизненный цикл и не способны к возвращению в состояние клеточного покоя. Монопотентные коммитированные предшественники экспрессируют маркеры соответствующей клеточной линии дифференцировки.

СКК и клетки-предшественники обладают способностью к миграции-выходу в кровь и возвращению в костный мозг, что получило название «homing-effect» (инстинкт дома). Именно это их свойство обеспечивает обмен кроветворных клеток между разобщенными кроветворными территориями, позволяет использовать их для трансплантации в клинике.

V отдел морфологически распознаваемых клеток включает дифференцирующиеся, созревающие и зрелые клетки всех 8 клеточных линий, начиная с бластов, большинство из которых имеют характерные морфоцитохимические особенности.

РЕГУЛЯЦИЯ ГЕМОПОЭЗА

Кроветворная ткань относится к динамичной, постоянно обновляющейся клеточной системе организма. Более 30 млн. клеток в минуту образуется в кроветворных органах, а в течение жизни человека это составляет около 7 тонн. Образующиеся в костном мозге клетки по мере созревания равномерно поступают в кровеносное русло, при этом время циркуляции их также постоянно - эритроциты циркулируют 110-130 суток, тромбоциты - около 10 суток, нейтрофилы – менее 10 ч. Каждый день теряется 1×10^{11} клеток крови, но эти потери постоянно восполняются клеточной фабрикой - костным мозгом - В течение всей жизни человека.

При повышении запроса на зрелые клетки, например, после кровопотери, остром гемолизе или воспалении, производство соответствующих клеток может быть увеличено в течение нескольких часов в 10-12 раз. Увеличение клеточной продукции обеспечивается гемопоэтическими факторами роста, действия которых очень разнообразны.

Необходимость постоянного поддержания клеточного равновесия, адекватно отвечать на запросы организма, обеспечивать в достаточном количестве специализированными клетками предполагает существование сложного процесса регуляции гемопоэза. Гемопоэз инициируется ростовыми факторами, цитокинами и непрерывно поддерживается благодаря пулу СКК. Стволовые кроветворные клетки стромозависимы и воспринимают короткодистантные стимулы, получаемые ими при межклеточном контакте с клетками стромального микроокружения. По мере дифференцировки клетка начинает реагировать на дальнедействующие гуморальные факторы. Эндогенная регуляция всех этапов гемопоэза осуществляется цитокинами через рецепторы на клеточной мембране, посредством которых проводится сигнал в ядро клетки, где происходит активация соответствующих генов. Основными продуцентами цитокинов являются моноциты, макрофаги, активированные Т-лимфоциты, стромальные элементы - фибробласты, эндотелиальные клетки и др.

Самообновление СКК происходит медленно и при готовности к дифференцировке (процесс коммитирования) они выходят из состояния покоя (G_0 - фаза клеточного цикла) и становятся коммитированными. Это означает, что процесс стал необратимым и такие клетки, управляемые цитокинами, пройдут все стадии развития вплоть до конечных зрелых элементов крови.

Выделяют позитивные и негативные регуляторы гемопоэза. Позитивные регуляторы необходимы для выживания СКК и их пролиферации, а также для дифференцировки и созревания более поздних стадий гемопоэтических клеток. Наличие в организме активаторов гемопоэза предполагает присутствие системы негативной регуляции. К ингибиторам пролиферативной активности СКК и всех видов ранних гемопоэтических предшественников относят трансформирующий ростовой фактор β (TGF- β), макрофагальный воспалительный белок (MIP-1 α), фактор некроза опухоли α (ФНО- α),

интерферон α и интерферон- γ , кислые изоферритины, лактоферрин и другие факторы.

Факторы регуляции гемопоэза подразделяются на короткодистантные (для СКК) и дальнедействующие для коммитированных предшественников и созревающих клеток.

Факторы, влияющие на ранние СКК - фактор стволовых клеток (ФСК), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), интерлейкины (ИЛ-6, ИЛ-11, ИЛ-12), а также ингибиторы, которые тормозят выход СКК в клеточный цикл из состояния покоя (MIP-1 α , TGF- β , ФНО- α , кислые изоферритины и др.). Эта фаза регуляции СКК не зависит от запросов организма. Линейно-неспецифические факторы - ИЛ-3, ИЛ-4, ГМ-КСФ (для гранулоцитомонопоэза).

Позднедействующие линейно-специфические факторы, которые поддерживают пролиферацию и созревание коммитированных предшественников и их потомков. К ним относятся эритропоэтин, тромбопоэтин, колониестимулирующие факторы (Г-КСФ, М-КСФ, ГМ-КСФ), ИЛ-5. Один и тот же ростовой фактор может действовать на разнообразные клетки-мишени на различных этапах дифференцировки, что обеспечивает взаимозаменяемость молекул, регулирующих гемопоэз.

От многих цитокинов зависит активация и функционирование клеток. Клетка начинает дифференцировку только после взаимодействия с факторами роста, но в выборе направления дифференцировки ростовые факторы не участвуют. Содержание этих факторов определяет количество продуцируемых клеток, число прорываемых клеткой митозов. Так, после кровопотери снижение парциального давления кислорода в почках приводит к усилению продукции эритропоэтина, под действием которого эритропоэтинчувствительные эритроидные клетки - предшественники костного мозга (БОЕ-Э), увеличивают на 3-5 число митозов, что повышает образование эритроцитов в 10-30 раз. Число тромбоцитов в крови регулирует выработку

фактора роста и развитие клеточных элементов мегакариоцитопоэза. Еще одним регулятором гемопоэза является апоптоз - запрограммированная клеточная смерть.

Механизмы апоптоза

Регуляция клеточной пролиферации и дифференцировки, поддержание клеточного равновесия, элиминация дефектных клеток и клеток, достигших стадию терминальной дифференцировки, осуществляются способностью кроветворных клеток к программируемой смерти (апоптозу). Термин «апоптоз» предложил в 1972 г. J.K. Kerr (греч. Аро – полное, ptosis - падение), заимствовав его у Гиппократата, использовавшего его для обозначения «осеннего листопада». Основной закон клеточной кинетики состоит в том, что в единицу времени рождается и умирает одно и то же количество клеток. Различают два вида клеточной смерти: некроз и апоптоз. Для первого необходимо прямое воздействие разрушающих (токсических) факторов, реализация второго требует слаженного участия целого комплекса внутриклеточных взаимодействий на уровне генов и кодируемых ими белков.

Морфологическими признаками апоптоза являются: конденсация хроматина, фрагментация ядра, буллезное (пузырчатое) выпячивание цитоплазматической мембраны. Наибольшие изменения при апоптозе претерпевает ядро. Оно уменьшается в размере (пикноз), хроматин конденсируется, сжимаясь в глыбки неправильной формы, уплотняется и подвергается фрагментации (кариорексис). Эндонуклеазами расщепляются двойные цепочки ДНК на фрагменты, которые хорошо выявляются с помощью гель-электрофореза в виде дискретных полос, что используется для идентификации апоптоза. Сами клетки разрушаются до апоптозных телец различного размера, сохраняющих целостность своей мембраны. В некоторых таких тельцах нет ядерного компонента, в других есть, причем хроматин всегда плотный, четко ограничен и сконденсирован у ядерной мембраны. Процесс конденсации цитоплазмы и ее распад на апоптозные тельца осуществляется в

течение нескольких минут. Апоптозные тельца быстро поглощаются расположенными вблизи макрофагами. Фагоцитоз протекает также быстро, из-за чего процесс апоптоза часто остается гистологически незаметным. При апоптозе удаление умирающих клеток происходит безболезненно для окружающей ткани, которая не пропитывается внутриклеточным содержимым и, таким образом, не создаются условия для развития воспаления.

Апоптоз играет биологически полезную роль в элиминации тех клеток, необходимость в которых отпала или выживание которых вредно для организма в целом, например, клеток-мутантов или вирусинфицированных клеток. Апоптоз стимулируется при лечении опухоли химиопрепаратами. Уничтожение пораженных вирусом клеток путем апоптоза обеспечивает минимальное повреждение ткани по сравнению с другими механизмами смерти. Биологический смысл фрагментации ДНК - предупреждение переноса генетического материала при фагоцитировании апоптозных телец.

Множество генов участвуют в регуляции апоптоза. Ведущую роль в осуществлении апоптоза играют ферменты - каспазы. Ключевым фактором в его реализации является индуктор - белок p53, относящийся к группе генов-супрессоров опухоли. Кроме того, p53 участвует в управлении клеточным циклом, вызывая блок в делении клеток при повреждении ДНК. Генетические дефекты, связанные с мутацией гена p53, приводят к образованию злокачественных опухолей с пониженной способностью к апоптозу. Одним из основных ингибиторов апоптоза считается продукт гена bcl-2. В то же время сверхпродукция белка гена bcl-2 тормозит апоптоз в клетке, что наблюдается, например, при В-клеточной фолликулярной лимфоме.

Пролиферация и дифференцировка стволовых и коммитированных клеток-предшественников в нормальном кроветворении способна осуществляться только в условиях их выживания, для чего необходимо воздействие антиапоптотических факторов. Среди последних наиболее значимыми являются ростовые факторы, большинство из которых

препятствуют апоптозу (фактор стволовых клеток, тромбопоэтин, эритропоэтин, колониестимулирующие факторы, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-6 и др.). Ростовые факторы действуют не только на клетки-предшественники, но и на зрелые клетки, обеспечивая их выживание и нормальное функционирование. Воздействие ростовых факторов происходит через специфические рецепторы - FAS-R (CD95/APO-1) - это поверхностные рецепторы клетки, передающие сигнал апоптоза, под действием которого активируются каспазы (семейство цистеиновых протеаз), эндонуклеазы, другие ядерные белки, приводящие к апоптозу. Уровень экспрессии FAS/APO-1 наиболее выражен в зрелых гранулоцитах, моноцитах и минимален в бластных клетках, что, по-видимому, имеет свой биологический смысл: для клетки в конечной стадии дифференцировки облегчаются условия запуска апоптоза, в то время как для бластов вероятность программированной гибели оказывается низкой. Обратная зависимость наблюдается в экспрессии Bcl-2. Изучение механизмов апоптоза и его регуляции имеет большое значение в изучении онкогенеза, поиске новых путей ингибиции опухолевого роста.

При некрозе гибель клеток происходит в результате физической или химической травмы, ишемии, гипертермии и других факторов. В клетке рано возникают изменения формы, функции митохондрий, сморщивание органелл, дезинтеграция цитоплазмы, повреждается большая часть цитоплазматической мембраны, что приводит к высвобождению лизосомных ферментов. На поздней стадии ядерный хроматин исчезает, т. е. имеет место кариолизис. Некроз сопровождается экссудативным воспалением, и, если в процесс вовлечено большое количество клеток, образованием рубца.

ЭРИТРОПОЭЗ

Дифференцировка и созревание клеток эритропоэза происходит в костном мозге. Эритрон - система, объединяющая самые ранние предшественники эритроидного ряда, морфологически идентифицируемые пролиферирующие и непролиферирующие ядро содержащие клетки,

ретикулоциты и эритроциты. Родоначальными клетками красного ростка являются коммитированные предшественники эритропоэза. Они образуются из стволовой полипотентной клетки, претерпевая 5-10 делений. Наиболее ранние клетки-предшественники, бурстобразующие единицы эритропоэза (БОЕ-Э), гетерогенны по своему составу. Ранние предшественники характеризуются низкой чувствительностью к действию эритропоэтина (ЭПО) и требуют для своего роста присутствия специального стимулятора эритропоэза - бурстстимулирующей активности. Другой субпопуляцией БОЕ-Э являются более зрелые предшественники, приобретающие чувствительность к ЭПО. Наиболее дифференцированные клетки-предшественники - колониеобразующие единицы эритропоэза (КОЕ-Э) - отличаются максимальной чувствительностью к ЭПО. Образование эритробластов происходит только в присутствии достаточной концентрации эндогенного ЭПО, в противном случае клетки подвергаются гибели (апоптозу).

Воздействие ЭПО осуществляется через эритропоэтинчувствительные клеточные рецепторы, количество которых максимально на клетках КОЕ-Э, проэритробластах и базофильных эритробластах. Связывание ЭПО с соответствующим рецептором предотвращает апоптоз клеток. В регуляции эритропоэза принимают участие также витамин В₁₂, фолиевая кислота, микроэлементы (железо, медь).

Начальные этапы эритропоэза характеризуются появлением на мембране клеток HLA 1 и II классов, CD34, рецептора к трансферрину - CD71, раннего миелоидного антигена CD33, групповых и Rh-антигенов, а также небольшим количеством рецепторов к ЭПО. Более зрелые предшественники - колониеобразующие единицы эритропоэза (КОЕ-Э) - отличаются высокой чувствительностью к ЭПО и экспрессией максимального количества эритроидных маркеров: рецепторов к ЭПО, специфического протеина - гликофорина А и рецепторов к трансферрину. Гликофорин А является гликопротеином эритроцитарной мембраны, который предотвращает агрегацию

эритроцитов.

Из морфологически идентифицируемых костномозговых предшественников эритроцитов к пролиферации способны проэритробласты, базофильные эритробласты и полихроматофильные эритробласты ранних стадий развития. На этом этапе функционирования эритрона клетки проходят 3-7 делений. Однако в зависимости от функциональных состояний число делений может сокращаться, что сопровождается уменьшением числа эритроцитов. Этот процесс называется *«перескок деления»*. Иммунологически эритробласты характеризуются наличием антигена гликофорина А. В целом дифференцировка и созревание эритроидных клеток, начиная с проэритробласта до эритроцита, осуществляется в течение 9-14 дней.

Синтез гемоглобина в клетках эритроидного ряда начинается на стадии проэритробласта. Скорость синтеза гемоглобина в про- и базофильных эритробластах составляет 0,5 пг в час в 1 клетке. В делящихся клетках после митоза количество гемоглобина уменьшается наполовину, в течение интерфазы приближается к исходному уровню. К концу второго митотического цикла (перед делением) клетки содержат 21,6 пг гемоглобина, а в разделившихся дочерних клетках, которые по своей морфологии являются базофильными эритробластами, по 10,8 пг. В конце митоза количество гемоглобина в базофильном эритробласте составляет 25,2 пг, а у образовавшихся из него ранних полихроматофильных эритробластов - 13 пг. После деления раннего полихроматофильного эритробласта образуются средние полихроматофильные эритробласты с критической величиной концентрации гемоглобина - 13,5 пг. При этом полностью прекращается синтез ДНК и клетка выключается из митотического цикла. Скорость синтеза гемоглобина также замедляется. Дальнейшее созревание клеток красного ряда происходит без деления. При нормальном эритропоэзе эритрокариоциты проходят в среднем 5 митозов, в результате чего из 1 эритробласта получается 32 эритроцита.

В небольшой популяции эритроидных клеток синтез гемоглобина

осуществляется быстрее, и на стадии раннего полихроматофильного эритробласта клетка подходит к митозу с количеством гемоглобина более 27 пг, при котором она теряет способность к делению. Дальнейшее развитие этой тетраплоидной клетки происходит без деления. Из нее образуется крупный ретикулоцит и затем макроэритроцит, содержащий более 30 пг гемоглобина. Этот тип деления эритрокариоцитов получил название *терминального деления*. В норме терминальный эритропоэз составляет не более 5%. Наличие его дает возможность быстро регулировать количество эритроцитов в зависимости от различных физиологических состояний.

У 5-10% эритрокариоцитов концентрация гемоглобина более 27 пг достигается уже на стадии базофильного эритробласта, что приводит к завершению их дифференцировки. Эти незрелые клетки гибнут в костном мозге, подчиняясь законам апоптоза. Такой вид эритропоэза называется *неэффективным эритропоэзом*. Он является одним из факторов регуляции эритрона, поддержания необходимого количества эритроцитов в крови. Для оценки величины неэффективного эритропоэза может быть использован цитохимический метод определения количества PAS-положительных эритрокариоцитов. В костном мозге здорового человека их число не превышает 3-8%. Усиление неэффективного эритропоэза, возможно, свидетельствует о накоплении или увеличении клеток с ошибочной дифференцировочной или пролиферативной программами. Эти клетки подлежат элиминации посредством физиологической гибели, поэтому уровень неэффективного эритропоэза отражает интенсивность апоптоза. В норме на долю эритрокариоцитов костного мозга приходится 20-30% всех ядросодержащих клеток.

Стадия созревания после потери ядра (энуклеации) оксифильного эритробласта перед зрелым эритроцитом называется ретикулоцитом. Продукция ретикулоцитов в костном мозге составляет 3×10^9 клеток в сутки. Образовавшиеся ретикулоциты созревают в костном мозге в течение 36-44 ч, после чего поступают в кровь, где дозревают в течение 24-30 ч в эритроциты.

МОРФОЛОГИЯ КЛЕТОК ЭРИТРОИДНОГО РЯДА

Проэритробласт (эритробласт) - диаметр 20-25 мкм, характеризуется высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, округлой формой ядра, нежно сетчатой структурой хроматина. Эта клетка содержит в ядре 1-3 нуклеолы, имеет узкий ободок резко базофильной цитоплазмы.

Пронормобласт отличается от эритробласта меньшим размером, отсутствием нуклеол в ядре и наличием перинуклеарной зоны просветления.

Эритробласт (нормобласт) базофильный - диаметр 16-18 мкм, имеет высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение. Ядро округлой формы, насыщенно фиолетового цвета, расположено центрально, не содержит ядрышек. Хроматин имеет тенденцию к радиальному расположению. Цитоплазма синего цвета небольшим ободком окружает ядро.

Эритробласт (нормобласт) полихроматофильный - диаметр 8-12 мкм. Ядро темно-фиолетового цвета, расположено центрально или эксцентрично, с колесовидной структурой хроматина. Цитоплазма широкая, серовато-голубого цвета.

Эритробласт (нормобласт) оксифильный - диаметр 8-11 мкм. Ядро бесструктурное, темно-фиолетового цвета, пикнотичное, расположено немного эксцентрично («вишневая косточка»). Цитоплазма бледно-розового цвета.

Ретикулоцит - диаметр 7,7-8,5 мкм. Характерной морфологической особенностью является наличие в цитоплазме зернисто-сетчатой субстанции, представляющей собой остатки рибосом и митохондрий, выявляемой при суправитальном методе окраски. В различных ретикулоцитах она отличается полиморфизмом; чем клетка моложе, тем субстанция более обильная. По мере созревания ретикулоцитов включения определяются в виде клубков, зернистости, сеточки или отдельных пылинок.

Эритроцит (нормоцит) - безъядерная клетка диаметром 7,5-8,0 мкм. В окрашенных мазках крови эритроциты розового цвета, имеют форму двояковогнутого диска с кольцеобразным утолщением по краям.

Обнаруживаемые при световой микроскопии морфологические аномалии эритроцитов, возникающие в условиях патологии, выражаются в изменении их размера, формы, интенсивности и характера окрашивания, появлении патологических включений. По интенсивности окраски эритроцита судят о его насыщенности гемоглобином. В норме эритроциты *нормохромные*, имеют равномерную окраску с просветлением в центре.

Ретикулоциты. Средний объем ретикулоцитов на 24-35% больше эритроцитов (101-128 фл), а концентрация гемоглобина в них ниже, чем в зрелом эритроците, что объясняет появление гипохромных макроцитов в периферической крови при состояниях, сопровождающихся ретикулоцитозом. Незрелые ретикулоциты имеют большое количество РНК-содержащих структур (рибосом), митохондрий, аппарат Гольджи и, несмотря на отсутствие ДНК, способны синтезировать гемоглобин, липиды, пурины. В митохондриях синтез АТФ осуществляется за счет использования кислорода. Одновременно в ретикулоцитах существует анаэробный гликолиз. Ретикулоцит имеет на поверхности те же молекулы, что и зрелый эритроцит, включая гликофорин А, антигены группы крови и системы резус, абсорбирует молекулы железа, благодаря рецепторам к трансферрину (CD71), плотность которых более выражена у менее зрелых ретикулоцитов. Многие ферменты (пируваткиназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, каталаза, ангидраза), а также другие компоненты (миофиламенты) содержатся в ретикулоцитах в более высоких концентрациях, чем в зрелых эритроцитах. В процессе дальнейшего созревания клеток происходит исчезновение полирибосом и экзоцитоз митохондрий, что проявляется уменьшением количества ретикулофиламентозного материала. На конечной стадии ретикулоцит теряет способность утилизировать кислород для синтеза АТФ и синтезировать гемоглобин.

Количество ретикулоцитов отражает скорость продукции эритроцитов в костном мозге, поэтому их подсчет имеет значение для оценки степени активности эритропоэза. Центральная роль в регуляции эритропоэза

принадлежит ЭПО. Помимо влияния его на пролиферацию эритроидных клеток, ЭПО увеличивает скорость созревания ретикулоцитов и стимулирует их выход в периферическую кровь.

В зависимости от степени зрелости в соответствии с классификацией Гейльмейера, предложенной более 60 лет назад, выделяют 5 групп ретикулоцитов: 0 группа-ядросодержащие эритроидные клетки с густой ретикулофиламентозной сетью в центре; I группа-ретикулоциты с грубой шарообразной сетью в центре; II группа-ретикулоциты с менее густой сетью, распространенной по всей цитоплазме; III группа-клетки с обрывками ретикулофиламентозной сети в разных участках цитоплазмы; IV группа-ретикулоциты с единичными нитями или гранулами ретикулофиламентозной сети в отдельных участках цитоплазмы.

В норме в периферической крови обнаруживаются ретикулоциты III-IV групп (около 61 % ретикулоцитов относится к IV группе, 32% - к III, 7%- ко II и только около 0,1% - к I группе). Левый сдвиг ретикулоцитов в сторону незрелых клеток (0-I-II группы) на фоне ретикулоцитоза имеет место при активации эритропоэза. Нормальное количество ретикулоцитов в периферической крови здорового взрослого человека колеблется в пределах 0,2-1,2%.

Эритроциты – представляют собой самую многочисленную популяцию клеток крови. У взрослого человека в физиологических условиях число циркулирующих эритроцитов составляет $25-30 \times 10^{12}$ клеток (около 2 кг). При средней продолжительности жизни эритроцита 110-130 дней костный мозг должен продуцировать в течение часа порядка 10^{10} клеток. Число эритроцитов в организме регулируется скоростью их образования и разрушения. Тканевая гипоксия приводит к избыточному синтезу ЭПО, который стимулирует активную пролиферацией БОЕ-Э, увеличение общего содержания эритрокариоцитов в костном мозге и ретикулоцитов в периферической крови. Наибольшее число эритроцитов имеет диаметр - 7,2-7,5 мкм, площадь

поверхности - 140 мкм^3 , объем 90 мкм^3 (фл). Благодаря дискоидной двояковогнутой форме, клетка имеет избыточную поверхность, которая совместно с высокой пластичностью и деформируемостью мембраны позволяет ей проходить через капилляры диаметром 2-4 мкм, проникать через стенки синусоидов (диаметр отверстия синусоидов в селезенке 0,5-0,7 мкм), возвращаясь к исходным параметрам. Способность к деформации обусловлена особенностями клеточного скелета и структуры мембраны. Мембрана эритроцитов полупроницаемая, имеет сложный двойной слой фосфолипидов, в который встроены белки гликопротеины, углеводная часть их образует надмембранный слой - гликокаликс. Гликопротеиновые комплексы мембраны организованы таким образом, что отрицательно заряженные участки (чаще всего сиаловые группы полисахаридов) обращены наружу, придавая поверхности эритроцитов отрицательный заряд. Внутренняя сторона мембраны эритроцитов связана с сетью миофиламентных белков, формирующих спектрин-актиновый цитоскелет, придающий эритроциту специфическую двояковогнутую форму. Метаболизм эритроцита характеризуется прежде всего гликолизом (анаэробное окисление), посредством которого и осуществляется энергетическое обеспечение клетки. Конечными продуктами гликолиза являются молочная кислота и АТФ. Прекращение гликолиза приводит эритроцит к «метаболической смерти» - процессу, конечный результат которого - гемолиз. Кроме того, до 30% глюкозы эритроцита используется в пентозофосфатном цикле, результатом которого является синтез НАДФН2 - основного метаболита, обеспечивающего функционирование антиоксидантных систем в эритроците. Это очень важная система в эритроците, так как она предупреждает чрезмерное накопление свободных радикалов двухвалентного железа (Fe^{2+}) и кислорода (O^{2-}) способных вызвать активацию перекисного окисления липидов эритроцитарной мембраны и гемолиз.

Эритроцитарная мембрана выполняет разные функции: барьерную, транспортную, сорбционную, метаболическую, благодаря наличию

ферментативных систем, регулирующих энергетические и окислительные процессы, транспорт ионов, перекисное окисление липидов, генерирующих и утилизирующих активные формы кислорода.

Основная функция эритроцита - участие в газообмене, благодаря его способности связывать кислород и углекислый газ за счет высокого содержания в эритроците гемоглобина. Гемоглобин - дыхательный пигмент, хромопротеид. Его небелковая часть, включающая железо, называется гемом, белковый компонент - глобином. Гемоглобин переносит кислород от легочных альвеол к тканям, транспортирует углекислый газ от тканей к легким и участвует в поддержании буферного кислотно-основного равновесия крови.

Кроме того, эритроциты определяют реологию крови, участвуют в гемостазе, иммунных процессах, взаимодействуя с циркулирующими иммунными комплексами, так как на мембране эритроцитов имеются Fc-рецепторы к иммуноглобулинам. На мембране эритроцита адсорбируются токсины, липиды, аминокислоты. Клеточная мембрана эритроцита имеет более 250 поверхностных антигенов. Благодаря своим многочисленным функциям эритроциты участвуют в поддержании гомеостаза организма.

Кислородтранспортная функция эритроцитов, интенсивность перекисного окисления липидов, состояние антиоксидантной системы влияют на *деформируемость мембраны эритроцитов*. Способность эритроцитов к деформации определяется внутренней (цитоплазматической) вязкостью, вязкостно-эластичными свойствами мембраны и отношением площади клетки к ее объему.

Цитоплазматическая вязкость эритроцита существенно зависит от концентрации гемоглобина. При физиологических концентрациях это влияние невелико, однако при высокой концентрации гемоглобина (предельная концентрация Hb в эритроците 380 г/л), величина цитоплазматической вязкости эритроцита возрастает, при этом существенно ухудшается деформируемость эритроцита. Сниженная деформируемость эритроцитов новорожденных, в

сравнении с эритроцитами взрослых, связана с более высоким содержанием гемоглобина. Внутриэритроцитарная вязкость зависит также и от вида гемоглобина. Классическим примером является HbS при серповидноклеточной анемии. Для восстановленной формы HbS характерно снижение растворимости в десятки раз, что ведет к образованию геля, имеющего более высокую вязкость. Снижение деформируемости эритроцитов отмечается и при других гемоглобинопатиях.

Эритроциты обмениваются с внешней средой липидами и холестерином, что важно для поддержания определенного состава мембраны и деформируемости клеток. Показано, что деформируемость эритроцитов уменьшается при увеличении в составе их мембраны холестерина, что наблюдается при дис- и гиперлипидемиях.

На способность эритроцитов к деформации существенное влияние оказывают физико-химические факторы (рН, осмолярность, газовый состав, температура). Поэтому при задержке в синусоидах селезенки и закислении окружающего пространства деформируемость их уменьшается, они теряют способность проникать через выходные отверстия синусоидов и фагируются макрофагальными элементами. Деформируемость эритроцитов оптимальна при рН-7,4.

Чем больше отношение площади поверхности эритроцита к его объему, тем более выражена способность эритроцита менять форму и проходить через узкие капилляры. Эритроциты с аномальной формой характеризуются повышенной резистентностью к деформации. Появление шипов на мембране эритроцита, его трансформация в эхиноцит ассоциируется со снижением способности эритроцита к деформации. Образование эхиноцита связано с увеличением проницаемости мембран для ионов Ca^{2+} .

Решающее значение для поддержания эритроцитов во взвешенном состоянии имеют электростатические силы отталкивания эритроцитов. Эритроциты заряжены отрицательно. В сосудистом русле они перемещаются в

плазме крови не хаотично, а в постоянном вращательном движении, совершая вокруг своей оси до 90 об/сек. Во время движения крови эритроциты постоянно находятся в деформированном состоянии. Наиболее выраженные изменения формы эритроцитов наблюдаются в микроциркуляторном русле, капилляры которого могут иметь диаметр менее 2 мкм.

В физиологических условиях эритроциты способны значительно деформироваться. Эта особенность движения эритроцитов в потоке имеет значение для поддержания оптимальной диффузии газов. При повышении деформируемости эритроцитов увеличивается контакт их мембраны с стенкой капилляров и перенос кислорода между альвеолами и эритроцитами в легких и между эритроцитами и тканями на периферии, а при ухудшении деформируемости мембраны эритроцитов обмен кислорода ухудшается.

Деформируемость эритроцитов меняется при многих патологических состояниях, что свидетельствует в пользу неспецифического характера этих изменений. Проявлением этого может быть изменение такого интегрального показателя как скорость оседания эритроцитов (СОЭ).

Эритроциты обладают способностью образовывать агрегаты. Физиологическая агрегация эритроцитов характеризуется образованием линейных цепочек в виде монетных столбиков и носит обратимый характер. В здоровом организме непрерывно происходит процесс «агрегации-деагрегации», что поддерживает нормальную текучесть крови. В образовании агрегатов участвуют плазменные, электростатические, механические и другие факторы. Существует несколько объяснений механизма агрегации эритроцитов, в частности возникновение мостиков между клетками с участием крупномолекулярных белков. Увеличение концентрации фибриногена, α -1, α -2, β -глобулинов, криоглобулинов, иммуноглобулинов, соотношения альбумины/глобулины в плазме крови приводит к усилению агрегации эритроцитов. Препятствует агрегации отрицательный заряд эритроцитов и альбумин, конкурирующий за сорбционные центры с высокомолекулярными

белками, но не создающий мостики между эритроцитами. Особое значение агрегация эритроцитов и их способность к деформации приобретают в микроциркуляторном звене кровообращения, где имеются функциональные и анатомические предпосылки к стазу крови. Об усиленной агрегации эритроцитов может свидетельствовать ускоренная СОЭ. Эритроциты составляют около 45% объема крови, поэтому изменение их количества влияет на реологию крови.

В течение жизни эритроцита имеет место необратимое уменьшение его поверхности в результате процесса микровезикуляции (экзовезикуляции), обеспечивающего удаление поврежденных участков цитоплазматической мембраны. Обновление фосфолипидного состава бислоя происходит в результате направленного выпячивания наружу мембраны с образованием микровезикулы и ее слияния. Повреждение мембран в результате активации процессов перекисного окисления липидов при различных патологических состояниях приводит к усилению процесса микровезикуляции, который становится патологическим. На внешнюю поверхность мембран выходят внутриэритроцитарные фосфолипиды, обладающие тромбопластиновой активностью, эритроциты с разрушенными мембранами образуют в микрососудах эритроцитарные агрегаты, вокруг которых появляется большое количество тромбоцитов и нитей фибрина; появление в кровотоке гемолизированных форм и фрагментов эритроцитарных мембран вызывает усиление процессов скрытого внутрисосудистого свертывания крови. Лабораторными критериями патологической микровезикуляции можно считать трансформацию эритроцитов из дискоцитов в эхиноциты и снижение их деформируемости.

Деформируемость эритроцитов претерпевает значительные изменения по мере старения клетки. С течением времени клетки теряют поверхность и их объем уменьшается. Содержание гемоглобина в клетке практически не меняется, а его концентрация, соответственно, растет и составляет в старых

эритроцитах в среднем 375 г/л. У старых эритроцитов отмечается модификация биохимических свойств мембран, что наряду с другими факторами может вести к повышению активности фагоцитоза эритроцитов макрофагами селезенки, печени и костного мозга, в цитоплазме которых эритроцит гемолизируется или дезинтегрируется без предварительного гемолиза.

ГРАНУЛОЦИТОПОЭЗ

Дифференцировка и созревание клеток гранулоцитопоэза происходит в костном мозге, где из коммитированных, морфологически неидентифицируемых клеток-предшественников - КОЕ-ГМ (колониобразующая единица грануломоноцитопоэза) и КОЕ-Г (колониобразующая единица гранулоцитопоэза) формируется пул пролиферирующих гранулоцитов, состоящий из миелобластов, промиелоцитов и миелоцитов. Пролиферация и созревание этих клеток приводит к образованию созревающих клеток - метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных гранулоцитов. Процесс созревания сопровождается изменением морфологии клеток: уменьшением ядра, конденсацией хроматина, исчезновением ядрышек, сегментацией ядра, появлением специфической зернистости, утратой базофилии и увеличением объема цитоплазмы.

Процесс формирования зрелого гранулоцита из миелобласта осуществляется в костном мозге в течение 10-13 дней. Регуляция гранулоцитопоэза обеспечивается колониестимулирующими факторами: ГМ - КСФ (гранулоцитарно-макрофагальный) и Г-КСФ (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор), действующих до конечной стадии созревания гранулоцитов. Клетки, коммитированные в сторону миелопоэза, характеризуются экспрессией ранних линейных миелоидных маркеров - CD33, CD117, CD13, миелопероксидаза. Основными маркерами зрелых клеток крови гранулоцитарного ряда являются CD45, CD10, CD11c, CD13, CD 15, CD16, CD18, CD32, CD33, CD50, CD65w, CD117, лактоферрин.

На стадии поздних миелобластов и промиелоцитов происходит первичный гранулогенез. *Первичные гранулы* окрашиваются азуром, их маркерным ферментом является миелопероксидаза, в связи с чем их называют азурофильными, пероксидазопозитивными. Форма гранул полиморфная, размеры 200-500 нм, располагаются главным образом на внутренней стороне аппарата Гольджи, в меньшей степени в эндоплазматическом ретикулуме и наружной стороне аппарата Гольджи. Первичные гранулы содержат бактерицидные ферменты (лизоцим, катепсин, эластаза, миелопероксидаза), антибактериальные катионные белки, нейтральные сериновые протеиназы, кислые гидролазы, гранулофизин (CD63). Эти вещества обладают выраженной антимикробной активностью. В цитоплазме миелоцитов начинается формирование специфической зернистости (*вторичные гранулы*). Они образуются на внешней стороне аппарата Гольджи, локализуются в основном в отделах секреторного аппарата. Маркерами вторичных гранул являются лактоферрин, катионный белок кателицидин, В₁₂-связывающий белок и другие факторы. В состав вторичных гранул также входит лизоцим, коллагеназа, металлопротеиназы. По современным представлениям нейтрофильная зернистость имеет *третичные гранулы*, в состав которых входит желатиназа. Биосинтез желатиназы происходит главным образом в палочкоядерных и сегментоядерных клетках, независимо от специфических гранул. Желатиназа рассматривается как маркер циркулирующих нейтрофилов, несвойственный костномозговым предшественникам. *Четвертый тип гранул* - секреторные пузырьки - эндоплазматические органеллы, содержащие щелочную фосфатазу, белок тетранектин, β₂-микроглобулин, биосинтез которых происходит на уровне миелоцита.

Во взрослом организме в 1 минуту продуцируется до 120 млн. нейтрофилов. Зрелые гранулоциты костного мозга составляют гранулоцитарный костномозговой резерв, насчитывающий около $8,8 \times 10^9$ /кг и мобилизуемый в ответ на специфический сигнал при бактериальных

инфекциях. Процесс выхода лейкоцитов из костного мозга высокоселективен. В норме в кровоток поступают только зрелые клетки. Покидая костный мозг, гранулоциты являются полностью дифференцированными клетками, имеющими полный спектр поверхностных рецепторов и цитоплазматических гранул с набором многочисленных биологически активных веществ.

Морфология клеток гранулоцитопоза

Миелобласт - диаметр 12-20 мкм, имеет высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение. Ядро крупное, расположено в центре клетки, округлой или слегка овальной формы, хроматин нежный, мелкосетчатый, тонкодисперсный. В ядре содержится 2-3 нуклеолы голубоватого цвета. Цитоплазма различных оттенков базофилии, обычно без перинуклеарной зоны. Зернистость в цитоплазме отсутствует или имеются скудные мелкие азурофильные гранулы.

Промиелоцит - диаметр 18-25 мкм. Ядро крупное, располагается в центре или несколько эксцентрично, округлой или овальной формы, вокруг ядра имеется отчетливая перинуклеарная зона. Структура хроматина мелко сетчатая, местами с утолщенными нитями базихроматина, нуклеолы, как правило, нечеткие. Цитоплазма голубовато-синего цвета с азурофильной полиморфной зернистостью красновато-фиолетового цвета, располагающаяся на ядре и в цитоплазме.

Миелоцит нейтрофильный - диаметр 10-18 мкм. Ядро крупное, располагается в центре или несколько эксцентрично, овальной, округлой или почкообразной формы. Структура хроматина грубая, с разделением на окси- и базихроматин, ядрышек нет или видны на стадии раннего миелоцита. Цитоплазма голубовато-розового цвета с обильной мелкой фиолетово-коричневой зернистостью.

Миелоцит эозинофильный имеет специфическую зернистость в виде округлых объемных гранул одинакового размера и формы, оранжевого цвета, встречается незрелая зернистость коричневого или темно-синего цвета.

Миелоцит базофильный имеет переменную по форме и величине специфическую зернистость темно-фиолетового и синего цвета, не очень густо заполняющую цитоплазму, но часто перекрывающую ядро. Цитоплазма голубого цвета.

Метамиелоцит (нейтрофильный, эозинофильный, базофильный) - диаметр 10-12 мкм. Ядро расположено в центре, бобовидной или подковообразной формы, одинаковой толщины по всей длине. Хроматин распределен неравномерно, глыбчатый, ядрышки отсутствуют. Ядро занимает менее половины клетки. Цитоплазма розового цвета с зернистостью, по характеру которой дифференцируют нейтрофильные, эозинофильные, базофильные метамиелоциты.

Палочкоядерные нейтрофил, эозинофил, базофил- диаметр 10-16 мкм. Ядро темно-фиолетового цвета, имеет вытянутую палочковидную форму, изогнутое, может иметь сужения. Структура хроматина неравномерная крупноглыбчатая, характеризуется конденсацией ядерного хроматина, нуклеолы отсутствуют. Цитоплазма окрашена в розовый цвет и содержит пылевидную нейтрофильную, эозинофильную или базофильную зернистость. У базофила контуры ядра плохо различимы вследствие наложения на ядро крупной, размытой темно-фиолетовой зернистости.

Сегментоядерный нейтрофил, эозинофил, базофил - диаметр 10-15 мкм. Ядро темно-фиолетового цвета, занимает центральное положение, состоит из 2-5 сегментов. Отдельные части ядра соединены тонкими перемычками. Ядерный хроматин неравномерный крупноглыбчатый. Цитоплазма оксифильная, заполнена множеством гранул, по характеру которых дифференцируют нейтрофильные, эозинофильные, базофильные гранулоциты. В зрелых нейтрофилах при окраске по Романовскому обнаруживают хроматиновые тельца, имеющие окраску ядра, форму висячей капли и соединенные с ядром тонкой перемычкой. Тельца Барра свидетельствуют о

наличии неактивной X-хромосомы и не встречаются у мужчин. При подсчете на 500 нейтрофилов можно обнаружить 6 или более клеток с тельцами Барра.

Цитохимическими маркерами клеток миелопоэза являются миелопероксидаза, щелочная фосфатаза, липиды, хлорацетатэстераза, PAS-положительная субстанция, концентрация которых увеличивается по мере созревания клеток.

НЕЙТРОФИЛЫ

Нейтрофилы составляют 60-70% общего числа лейкоцитов крови. После выхода нейтрофильных гранулоцитов из костного мозга в периферическую кровь, часть их остается в свободной циркуляции в сосудистом русле (циркулирующий пул), другие занимают пристеночное положение, образуя маргинальный или пристеночный пул. У здоровых людей соотношение циркулирующего и маргинального пулов 1:3. Клетки из пристеночного пула под влиянием различных факторов могут переходить в циркулирующий пул и обратно. Скорость обновления пулов равна $1,6 \times 10^9$ /кг массы тела в сутки. Зрелый нейтрофил пребывает в циркуляции 8-10 часов, затем поступает в ткани, образуя по численности значительный пул клеток. Продолжительность жизни нейтрофильного гранулоцита в тканях составляет в среднем 2-3 дня. При этом клетка «стареет», приобретая пикнотичный вид. У человека за сутки вырабатывается около 10^{11} нейтрофильных гранулоцитов, поэтому, наряду с продукцией, крайне важным для организма является их удаление, что осуществляется по механизму апоптоза. Жизненный цикл нейтрофила выглядит так, как если бы клетка имела внутренние часы, контролирующие программу ее гибели. Эта программа может нарушаться при усиленном апоптозе, что наблюдается при гематологических заболеваниях, сопровождающихся снижением продукции нейтрофилов (апластическая анемия, синдром Чедиака-Хигаси, идиопатическая циклическая нейтропения), воздействии лекарственных препаратов. Дефект любого звена жизненного цикла нейтрофилов приводит к нарушению системы защиты организма, что

отражается в рецидивирующих тяжелых бактериальных и грибковых инфекциях.

Нейтрофилы рассматриваются как первая линия защиты от внешних и внутренних агентов, направленная на поддержание постоянства внутренней среды организма. Быстрая их трансмиграция через клетки эндотелия опосредована действием многих цитокинов, в том числе хемокинов. Основная функция нейтрофилов - участие в борьбе с микроорганизмами путем их фагоцитоза. Содержимое гранул способно разрушить практически любые микробы. В азурофильных и специфических гранулах нейтрофилов содержится более 20 различных протеолитических ферментов, миелопероксидаза, интегрин, бактерицидные белки (лактоферрин, дефенсины, катионный антимикробный белок), лизоцим, лактоферрин, щелочная фосфатаза, вызывающие бактериолиз и переваривание микроорганизмов. В азурофильных гранулах имеется большое количество эластазы, которая может быть фактором, приводящим к деструкции тканей в очаге воспаления. Две металлопротеиназы, коллагеназа, желатиназа могут вызывать деградацию внеклеточного матрикса. На мембране нейтрофилов присутствуют различные группы рецепторов, которые осуществляют связь нейтрофилов с их микроокружением и регулируют функциональную активность нейтрофилов: хемотаксис, адгезию, дегрануляцию, поглощение. Это рецепторы для Fc-фрагмента иммуноглобулинов, компонентов комплемента (C3, C5a, CR1). На поверхности нейтрофилов обнаружены интегрин, селектины, которые обеспечивают взаимодействие нейтрофилов с эндотелиальными клетками и последующую миграцию нейтрофилов из кровеносного русла в ткани. Нейтрофилы способны синтезировать и секретировать ряд цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12), колониестимулирующих факторов (ГМ-КСФ, Г-КСФ, М-КСФ), трансформирующий фактор роста β . Эти биологически активные вещества позволяют нейтрофилам участвовать в реакции воспаления, обеспечивают созревание и функциональную активность, а также определяют влияние

нейтрофилов на эффекторные функции других клеток.

Выделяют несколько стадий фагоцитарной реакции: хемотаксис, адгезия, активация участка мембраны фагоцита, поглощение, формирование фагосомы, переваривание объекта, высвобождение продуктов деградации. Хемотаксис - целенаправленное движение клеток в сторону стимулирующих агентов (хемоаттрактантов), которыми могут быть продукты выделяемые микроорганизмами и активированными клетками в очаге воспаления, ИЛ-8, продукты расщепления компонентов комплемента, С-реактивный белок, нейропептиды, фрагменты иммуноглобулинов, и др. Нейтрофил двигается, образуя псевдоподии, гораздо быстрее других лейкоцитов мобилизуется в очаг воспаления через минуты или часы. Существенно позже сюда поступают макрофаги. Активация клетки сопровождается усилением метаболизма и экспрессии мембранных молекул адгезии (в частности, интегринов) и их рецепторов на клетках эндотелия. Нейтрофилы прилипают к эндотелию, происходит сокращение эндотелиальных клеток, увеличиваются поры между ними и фагоцит проникает через сосудистую стенку в ткань. После трансмиграции нейтрофилов в ткань и их встречи с антигеном начинается сложный процесс фагоцитоза - захват чужеродного объекта нейтрофилом.

На следующем этапе происходит *адгезия* фагоцитирующих клеток к своим мишеням, что является одним из факторов их активации. Нейтрофилы могут захватывать только опсонизированные частицы. Опсонизация осуществляется сывороточными факторами, опсонинами, которые обволакивают бактерии или другие антигены, готовя их к фагоцитозу. Основные опсонины - система комплемента и иммуноглобулины, фибронектин. С недостаточной опсонизирующей активностью сыворотки связана восприимчивость к бактериальным инфекциям при многих заболеваниях. Взаимодействие мембраны нейтрофила с микроорганизмом инициирует образование псевдоподий, которые, окружая микроорганизм, сливаются между собой, по принципу застежки «молнии», в результате чего частица и вместе с

ней часть мембраны погружаются внутрь клетки (*эндоцитоз*), формируя фагосому. В нейтрофилах фагосома через 30 с сливается вначале со вторичными гранулами, несколько позже (через 1-3 мин) - с азурофильными гранулами, образуя фаголизосому. Происходит внутриклеточная дегрануляция и поступление ферментов гранул в фаголизосому. Такая последовательность процессов обеспечивает наибольшую эффективность действия переваривающих ферментов. Внутри образованной фаголизосомы происходит киллинг микроорганизмов протеолитическими ферментами, содержащимися в гранулах, а также за счет образующихся в результате «респираторного взрыва» перекиси водорода и гидроксильных радикалов при кислородзависимом механизме киллинга.

Некоторые бактерии способны угнетать слияние гранул с фагосомой и таким образом избегать киллинга. К ним относятся внутриклеточные микроорганизмы: микобактерии туберкулеза, лепры, сальмонеллы, гонококки, токсоплазмы, грибы. Гонококки, прикрепляясь к нейтрофилам, стимулируют кислородзависимый метаболизм, при этом азурофильные гранулы не выбрасывают свое содержимое в фагосомы и внутриклеточные гонококки сохраняют свою жизнеспособность. Хламидии активно поглощаются нейтрофилами, однако, подавляя процесс дегрануляции, хламидии успешно размножаются в фагосомах. Некоторые бактерии резистентны к действию лизосомальных ферментов, в частности лейшмании, размножаются в фаголизосомах.

Нейтрофилы убивают микроорганизмы с помощью двух механизмов: кислородзависимого и кислороднезависимого. Кислородный или дыхательный взрыв - это процесс образования продуктов, обладающих высокой антимикробной активностью (синглетный кислород, свободные радикалы, перекись водорода). Развитие кислородного взрыва осуществляется в течение нескольких секунд, что и определило название этих процессов как «взрыв». Кислородный взрыв происходит под действием многих активирующих агентов,

некоторых хемоаттрактантов, цитокинов, ряда лекарственных препаратов. Кислородзависимые факторы, генерируемые при участии миелопероксидазы обладают токсичностью в отношении не только бактерий, но и грибов, микоплазм. В случае продукции токсичных метаболитов кислорода вне клетки происходит повреждение тканей.

Цитоплазматические гранулы нейтрофилов содержат антимикробные факторы, которые действуют в фагосоме без участия кислорода. Это протеазы, фосфолипазы, гликозидазы, лизоцим, катионные белки, лактоферрин, эластаза и другие белки и пептиды, которые нарушают функции или структуру микробов. Лизоцим растворяет клеточную стенку бактерий, лактоферрин также повреждает ее, что делает их доступными для лизоцима. Кроме того, лактоферрин связывает железо и обеспечивает бактериостатический эффект, так как большинство бактерий не могут размножаться в отсутствие железа. К активным факторам бактерицидности относятся продукты азотистого обмена, в частности оксид азота и радикал NO^\cdot . Продукты разрушения микроорганизмов вместе с содержимым фаголизосом выбрасываются из клетки в результате процесса, аналогичного дегрануляции. Дегрануляция может быть внутриклеточной и внеклеточной. Внутриклеточная дегрануляция осуществляется при слиянии фагосомы и лизосомы. При внеклеточной дегрануляции имеет место выброс биологически активных веществ из клетки, что приводит к повреждению окружающей ткани. Возможна такая дегрануляция, когда гранулы целиком выталкиваются из клетки (экзоцитоз) или выделяются растворимые компоненты гранул и происходит запустевание гранул (секреторная дегрануляция).

Таким образом, нейтрофилы содержат разнообразные по химическому составу и направленности действия соединения, благодаря которым могут влиять на клетки крови, стромы, эндотелий сосудов и другие системы организма, во взаимодействии с которыми они выступают и как эффекторы, и как мишени. Огромное разнообразие активных веществ, содержащихся в

нейтрофилах, свидетельствует об их участии в киллинге, остром воспалении тканевой деструкции. Нейтрофилы могут оказывать влияние на иммунный ответ, регенерацию и репарацию клеток, гемопоэз, рост опухоли и т.д.

Участие нейтрофилов в воспалительной реакции

В процессе развития воспалительной реакции происходит мобилизация костномозговых и циркулирующих лейкоцитов, активирующихся под действием хемотаксических сигналов, исходящих из очага поражения. Миграция этих клеток осуществляется благодаря повышению адгезивности эндотелиальных клеток мелких сосудов. В местах повреждения сосудов происходит агрегация тромбоцитов, которая сопровождается экспрессией на плазматической мембране тромбоцитов Р-селектина (CD62). Экспрессия на мембране лейкоцитов Р-селектинсвязывающего гликопротеина 1 (PSGL-1) позволяет нейтрофилам присоединяться к тромбоцитам. Связь нейтрофилов с тромбоцитами обеспечивает репаративные и воспалительные реакции, возникающие в ответ на повреждение. Активация лейкоцитов с усилением метаболических процессов приводит к образованию бактерицидных субстанций (продукты метаболизма кислорода, азота, ферментов). Киллинг агрессивных агентов осуществляется в виде внеклеточного, внутриклеточного цитолиза. Внеклеточный цитолиз реализуется за счет секретлируемых бактерицидных продуктов, внутриклеточный - путем фагоцитоза с последующим дыхательным взрывом.

Нейтрофилы способны секретировать адгезивные молекулы и интерлейкины. Некоторые из интерлейкинов, в частности ИЛ-1 и ФНО- α , активируют эндотелиальные клетки. Первичный контакт гранулоцитов приводит к перемещению их вдоль сосудистой стенки с последующей трансэндотелиальной миграцией в субэндотелий. При действии повреждающих факторов, таких как иммунные комплексы, эндотоксин, гранулоциты могут дегранулироваться и освобождать внутри сосудистой стенки ИЛ-1, ФНО- α , протеолитические ферменты, такие как эластаза и катепсин, активные формы

кислорода, что, в свою очередь, ведет к повреждению ткани. Этот процесс доминирует при воспалительных реакциях. Протеолитические ферменты, которые освобождаются из лейкоцитов, в участках воспаления вызывают нарушения структуры и функции эндотелия, это является условием развития петехий.

В последнее время описан феномен агрегации лейкоцитов (нейтрофилов) при ишемии тканей. Этот феномен особенно значим для повреждения легких при шоке и в развитии геморрагического шока, где он имеет ведущее значение.

ЭОЗИНОФИЛЫ

Образование эозинофилов из клеток-предшественников продолжается около 3-4 суток, после чего они в течение 2-5 суток остаются в костном мозге. Ростковым фактором эозинофилов является ИЛ-5. Эозинофилы составляют 0,5-5% от всех лейкоцитов крови, циркулируют в течение 6-12 ч, затем поступают в ткани, срок их жизни - около 12 суток. Тканевой пул эозинофилов значительно превышает их численность в крови. Тканевые эозинофилы распределены неравномерно. Наибольшее их количество выявляется в тканях, соприкасающихся с внешней средой: подслизистый слой дыхательного, пищеварительного и частично мочеполового тракта. Эозинофилы, покинувшие кровеносное русло, повторно в него не возвращаются и разрушаются путем апоптоза в тканях.

На поверхности мембраны эозинофила имеются рецепторы к Fc-фрагменту молекулы иммуноглобулина, рецепторы для компонентов комплемента, молекулы адгезии, CD52, CD69, CD40 и др. В клетках содержится значительное количество гранул, основным компонентом которых является главный щелочной белок (катионный белок), а также перекиси, обладающие бактерицидной активностью. Главный щелочной белок обладает цитотоксичностью, повреждает некоторые личинки гельминтов, нейтрализует гепарин. Гранулы эозинофилов содержат кислую фосфатазу, арилсульфатазу, коллагеназу, эластазу, глюкуронидазу, катепсин, эозинофильную пероксидазу,

простагландины и другие ферменты. Простагландины угнетают дегрануляцию тучных клеток. Арилсульфатаза ингибирует анафилактоидные вещества, тем самым, уменьшая реакцию гиперчувствительности немедленного типа. С помощью различных ферментов гранул (гистаминаза, арилсульфатаза, фосфолипаза) инактивируются гистамин, гепарин, т. е. нейтрализуются продукты секреции тучных клеток. Эозинофилы проявляют свои эффекторные функции посредством кислородзависимых (генерация токсических кислородных радикалов), кислороднезависимых (катионные белки) механизмов. Обладая слабой фагоцитарной активностью по сравнению с нейтрофилами, эозинофилы обуславливают внеклеточный цитолиз, тем самым, участвуя в противогельминтном иммунитете. Соприкосновение эозинофилов с личинками, покрытыми IgG-антителами и активированным С3, приводит к дегрануляции эозинофилов с отложением главного щелочного белка и пероксидазы на поверхности личинки, приводящее к ее гибели. Цитотоксичность эозинофилов могут повышать не только IgG, но и IgE-антитела.

Объектом фагоцитоза эозинофилов могут быть бактерии, грибы продукты распада тканей, иммунные комплексы. Механизм фагоцитоза такой же, как у нейтрофилов, однако переваривающая и бактерицидная способность эозинофилов значительно ниже. Это возможно связано с отсутствием в них лизоцима, фагоцитина и недостаточной активностью пероксидазы.

Основное значение эозинофилов заключается в их участии в механизмах защиты при гельминтозах, паразитозах, в реакциях гиперчувствительности немедленного типа, связанных с острой аллергией.

Положительным хемотаксическим эффектом в отношении эозинофилов обладают иммунные комплексы (преимущественно с антителами класса IgE). В зависимости от соответствующего антигена эозинофилы могут вызывать повреждение эпителия дыхательных путей, отек и деструкцию гранулематозной ткани. Эозинофилы способны быстро проникать из

сосудистого русла в ткани и концентрироваться в большом количестве в очаге поражения. Это приводит сначала к эозинопении, так как эозинофилы не формируют пристеночный пул, но ответное усиление продукции эозинофилов в костном мозге сопровождается нормализацией их уровня в периферической крови и затем эозинофилией.

Секреторная функция эозинофилов состоит в продукции и секреции ИЛ-2, ИЛ-3, ФНО, ИЛ-4, ИЛ-5, интерферона- γ .

БАЗОФИЛЫ И ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ

Базофилы и тучные клетки имеют костномозговое происхождение и дифференцируются из КОЕ-ГМ - гранулоцитарной клетки-предшественника. Предполагают, что предшественники тучных клеток покидают костный мозг и через периферическую кровь попадают в ткани. Дифференцировка базофилов в костном мозге длится 1,5-5 суток. Ростовым фактором базофилов и тучных клеток являются ИЛ-3, ИЛ-4, ГМ-КСФ. Созревшие базофилы поступают в кровоток, где период их полужизни составляет около 6 ч. На долю базофилов приходится всего 0,5% от общего числа лейкоцитов крови. Базофилы мигрируют в ткани, где через 1-2 суток после осуществления основной эффекторной функции погибают. В гранулах этих клеток содержатся гистамин, гистидин, хондроитинсульфаты А и С, гепарин, серотонин, ферменты (трипсин, химотрипсин, пероксидаза, РНКаза, арилсульфатаза, β -глюкуронидаза), лейкотриены, тромбоксаны, простагландины, фактор хемотаксиса эозинофилов, фактор активации тромбоцитов, фактор хемотаксиса нейтрофилов, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ГМ-КСФ, ФНО- α и др. Базофилы подвижны, обладают, как и тучные клетки, слабой способностью к фагоцитозу.

Тучные клетки локализуются в эпителии, подслизистом слое желудочно-кишечного, дыхательного и, урогенитального трактов, в коже, соединительной ткани, окружающей капилляры, серозных оболочках. Микроокружение определяет окончательный фенотип тучных клеток, среди которых выделяют две субпопуляции: соединитель тканые и слизистые тучные клетки, которые

фиксируются на специфических структурах соединительной ткани, таких как фибронектин и ламинин. Белки внеклеточного матрикса влияют на окончательную дифференцировку, состояние активности и выживаемость клеток. В отличие от базофилов, тучные клетки способны к делению и имеют большой срок жизни (месяцы, годы).

Тучные клетки крупнее базофилов, имеют округлое ядро и большое количество полиморфных гранул, которые по составу аналогичны гранулам базофилов.

На поверхности тучных клеток и базофилов имеются рецепторы для комплемента, Fc ϵ -рецепторы, высокой плотности рецепторы к IgE, обеспечивающие не только связывание IgE, но и освобождение гранул, содержимое которых обуславливает развитие аллергических реакций. IgE, секретируемые плазматическими клетками в слизистых оболочках, фиксируется на рецепторах тучных клеток. Такая фиксация может сохраняться очень долго (до года) и не сопровождается активацией клеток. Состояние организма, характеризующееся фиксацией на рецепторах тучных клеток IgE к конкретному аллергену, называется сенсibilизацией к данному аллергену. При фиксации аллергена со специфическими к нему IgE-антителами на поверхности тучных клеток происходит активация клетки, слияние мембран гранул с цитоплазматической мембраной и выброс содержимого гранул наружу. Дегрануляция осуществляется в течение нескольких секунд и не приводит к гибели клетки. В тучных клетках (но не в базофилах) возможен процесс восстановления гранул. Активированные тучные клетки и базофилы в течение нескольких часов секретируют цитокины ИЛ-4, ИЛ-13, ИЛ-5, ИЛ-3, ИЛ-6, ГМ-КСФ, хемотаксические агенты, в частности ИЛ-8. Следствием активации и дегрануляции тучных клеток являются: местная дилатация и повышение проницаемости сосудов, гиперемия и зуд, гиперпродукция слизи, раздражение нервных окончаний, т. е. реакция гиперчувствительности немедленного типа. Наряду с высвобождением биогенных аминов, тучные клетки и базофилы

секретируют эозинофильный хемотаксический фактор, с помощью которого в очаг воспаления мигрируют эозинофилы, поглощающие и нейтрализующие гистамин. ИЛ-8 усиливает миграцию нейтрофилов.

Тучные клетки участвуют в образовании межклеточного вещества путем синтеза сульфатированных гликозаминогликанов. Эта пластическая функция клеток обеспечивает нормальную структуру соединительной ткани. Таким образом, реакции, определяемые базофилами (тучными клетками), необходимы для формирования воспалительного процесса как главной реакции иммунной системы на чужеродные агенты.

МОНОЦИТОПОЭЗ

Клетки, объединенные в систему мононуклеарных фагоцитов (СМФ), включают костномозговые предшественники, пул циркулирующих в сосудистом русле моноцитов и тканевые макрофаги. Ранние предшественники мононуклеарных фагоцитов развиваются из полипотентной стволовой кроветворной клетки и представляют быстро делящийся пул клеток-предшественников грануломоноцитопоэза (КОЕ-ГМ). Коммитированные КОЕ-ГМ дают начало КОЕ-М (колониобразующая единица макрофагальная), дифференцирующихся в пролиферирующий пул монобластов и промоноцитов, которые являются наиболее ранними морфологически идентифицируемыми клетками СМФ в костном мозге. Процесс дифференцировки и созревания клеток моноцитопоэза регулируется колониестимулирующими факторами (ГМ-КСФ, М-КСФ, ИЛ-3).

Дифференцировка моноцитов из монобласта происходит в костном мозге в течение 5 дней, после чего они сразу выходят в кровоток, не создавая (в отличие от гранулоцитов) костномозгового резерва. В костном мозге клетки моноцитарного ряда представлены в основном пролиферирующим пулом. Небольшая часть моноцитов дифференцируется в макрофаги костного мозга, количество которых составляет примерно 30 ± 12 в 1 мм^3 .

В крови моноциты распределяются на циркулирующий и пристеночный

пулы, количественные соотношения которых могут меняться. У человека циркулирующий пул моноцитов насчитывает в норме 18×10^6 клеток/кг массы тела, а маргинальный (пристеночный) в 3,5 раза больше (63×10^6 клеток/кг).

В периферической крови моноциты составляют от 1 до 10% всех лейкоцитов ($80-600 \times 10^9$ /л). Моноциты циркулируют в кровотоке от 36 до 104 ч, а затем покидают сосудистое русло, взаимодействуя со специализированными адгезивными молекулами на эндотелиальных клетках. За сутки в ткани из кровеносного русла уходит $0,4 \times 10^9$ моноцитов. При воспалении увеличивается количество моноцитов, поступающих в кровь и покидающих кровяное русло, время их транзита через кровь при этом сокращается.

Морфология клеток моноцитопоза

Монобласт - диаметр 15-20 мкм. Ядро крупное, расположено в центре клетки, округлой формы, хроматин тонкодисперсный. В ядре содержится 1-2 нуклеолы голубоватого цвета. Цитоплазма голубого цвета.

Промоноцит - диаметр 15-18 мкм. Ядро бобовидной формы светло-фиолетовое. Хроматин нежный, крупносетчатый. В ядре 1-2 нуклеолы. Цитоплазма серо-голубого, дымчатого цвета с мелкой азурофильной зернистостью.

Моноцит - диаметр 14--20 мкм. Ядро светло-фиолетовое, расположено центрально. Характерно разнообразие форм ядра: лопастное, бобовидное, сегментированное, палочковидное. Хроматин рыхлый, светлый, расположен неравномерно. Цитоплазма обильная, сероватого или бледно-голубого цвета, непостоянно присутствуют многочисленные пылевидные азурофильные гранулы.

Макрофаг - диаметр 15-80 мкм. Форма клеток неправильная, ядро овальной или продолговатой формы, хроматин петлистый, распределен неравномерно, цитоплазма обильная, без четких границ, голубоватого цвета с

азурофильными гранулами и вакуолями, придающими клетке пенистый вид. Могут содержаться остатки фагоцитированного материала.

Цитохимические маркеры клеток СМФ: неспецифическая эстераза, подавляемая фторидом натрия, кислая фосфатаза, активность которых наиболее высокая в МФ. По мере созревания клеток моноцитарного ряда снижается активность миелопероксидазы, отмечается незначительное содержание гликогена и липидов. В тканях моноциты дифференцируются в тканевые макрофаги, их очень незначительная часть способна к однократному делению.

В основном обновление макрофагов происходит за счет притока моноцитов из крови. Тканевой пул мононуклеарных фагоцитов в 25 раз превышает их содержание в крови; наибольшее количество макрофагов содержится в печени (56%), легких (15%), селезенке (15%), перитонеальной полости (8%), несколько меньше в центральной нервной системе, костной ткани и других тканях. Продолжительность жизни тканевых макрофагов исчисляется месяцами и годами. Если не происходит их мобилизация в очаг инфекции или воспаления, они погибают, мигрируя в селезенку или лимфатические пути. Макрофаги, в соответствии с их структурно-функциональными параметрами, разделены на 2 класса: антигенперерабатывающие (профессиональные фагоциты) и антигенпредставляющие (дендритные клетки).

Класс профессиональных фагоцитов включает свободные макрофаги соединительной ткани, подкожного жирового слоя, серозных полостей, альвеолярные макрофаги, фиксированные макрофаги печени, центральной нервной системы, костного мозга, селезенки, лимфоузлов и т.д.

К антигенпредставляющим макрофагам относятся фолликулярные дендритные клетки (ФДК), интердигитальные дендритные клетки, клетки Лангерганса, специфической функцией которых является захват, переработка и представление антигенов лимфоцитам.

Фолликулярные дендритные клетки локализуются в В-клеточных

зонах первичных и вторичных лимфоидных фолликулов лимфоузлов, а также в селезенке и мукозо-ассоциированной лимфоидной ткани (MALT) и представляют антиген В-лимфоцитам. Они являются составной частью стромы зародышевых центров и элементами микроокружения В-лимфоцитов. ФДК - немигрирующая популяция клеток, имеют длинные ветвящиеся отростки, образующие плотную сеть в зародышевых центрах. ФДК характеризуются отсутствием молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) II класса, экспрессией Fc-рецепторов (CD32, CD64). Связывание с антигеном осуществляется посредством рецепторов к комплементу (CD21, CD35). Считают, что ФДК имеют местное происхождение, являясь потомками фибробластов. ФДК рассматриваются как «хранилище» антигена, который продолжительное время обнаруживается на их поверхности, что обеспечивает длительное поддержание иммунологической памяти.

Интердигитальные дендритные клетки располагаются в паракортикальных зонах лимфоузлов и соответствующих Т-зависимых зонах селезенки, миндалин, мозговом веществе тимуса. Они соединяются между собой и с другими клетками посредством субмикроскопических отростков. Эти клетки, являющиеся составным элементом микроокружения тимусзависимых зон, играют важную роль в заселении их предшественниками Т-лимфоцитов и в представлении антигенов Т-лимфоцитам, вызывая антигенспецифический иммунный ответ. Большая часть их - потомки клеток Лангерганса. Они не способны обрабатывать антиген, но эффективно представляют его после обработки клетками Лангерганса Т-хелперам, вызывая их активацию, деление и секрецию цитокинов. Интердигитальные дендритные клетки не фагоцитируют, хотя и способны к пиноцитозу.

Клетки Лангерганса (КЛ) локализованы в супрабазальном слое эпидермиса, составляя до 2% всех эпидермальных клеток. В разных участках эпидермиса плотность их варьирует. Срок их пребывания в эпидермисе около 3 недель КЛ также обнаруживаются эпителии слизистой полости рта, пищевода,

легких, влагалища, шейки матки, конъюнктивы. КЛ обладают выраженной способностью связывать антиген и обрабатывать его, однако они не способны представлять антиген Т-хелперам. Для приобретения этой способности КЛ должны мигрировать в Т-зависимые зоны региональных лимфатических узлов и, пройдя определенные этапы развития, превратиться в интердигитальные дендритные клетки.

В цитологических препаратах КЛ имеют диаметр 15-20 мкм, овальное, почковидное или изрезанное ядро, нежный, равномерно распределенный хроматин, 1-2 мелкие нуклеолы. Цитоплазма обильная, бледно окрашенная, часто содержит вакуоли, включения отсутствуют. В КЛ определяется низкая активность β -глюкуронидазы, неспецифической эстеразы, кислой фосфатазы и других гидролитических ферментов, высокая активность АТФ-азы. В отличие от других клеток СМФ, в КЛ не выявляется миелопероксидаза, лизоцим, α -1-антитрипсин и α -1-антихимотрипсин, отмечается низкий уровень 5-нуклеотидазы, дипептидилпептидазы и катепсина В.

В цитоплазме КЛ обнаруживают S-100 протеин, ранее считавшимся специфичным для нервных клеток. Специфический ультраструктурный маркер клеток Лангерганса - гранулы Бирбека, представляют цитоплазматические органеллы, размером 33-42 нм, имеющие форму теннисной ракетки, центральное кристаллическое ядро, функциональное значение которых до настоящего времени не определено. Считают, что они формируются из цитоплазматической мембраны клетки.

Профессиональные фагоциты и антигенпредставляющие клетки имеют сходные рецепторы на клеточной мембране, в том числе рецепторы для компонентов системы комплемента (CD11b, CD11c), Fc-фрагментов иммуноглобулинов, лимфокинов, трансферрина, многих гормонов. Наиболее характерный поверхностный маркер - антиген CD14, выявляется на монобластах, промоноцитах, моноцитах и антигенперерабатывающих макрофагах, но может отсутствовать на антигенпредставляющих макрофагах.

На мембране моноцитов/макрофагов также определяются CD13, CD16, CD31, CD32, CD33, CD35, CD36; HLA-DR, CD64, CD68, CD163 (антитела M130 и D11).

Функции моноцитов/макрофагов. Система мононуклеарных фагоцитов объединяет различные типы клеток, участвующих в защитных реакциях организма. Макрофаги принимают активное участие в неспецифической защите от патогенных микроорганизмов, в процессах репарации, инициации специфического иммунного ответа, в метаболизме липидов и железа, регуляции кроветворения, гемостазе. Мононуклеарные фагоциты секретируют цитокины и другие биологически активные вещества, регулирующие пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность различных клеток.

Основные этапы фагоцитоза у моноцитов/макрофагов аналогичны нейтрофилам. Эти клетки участвуют не только в удалении микроорганизмов, но и обломков собственных клеток, апоптотических телец, циркулирующих иммунных комплексов и других молекул. Моноциты/макрофаги способны захватывать частицы путем фагоцитоза, пиноцитоза (эндоцитоз растворимого антигена), рецепторного эндоцитоза. Процесс фагоцитоза сопровождается выраженными изменениями клеточного метаболизма: возрастает потребление молочной кислоты, усиливается метаболизм глюкозы, синтез липидов мембраны. Через 30-60 мин после захвата большинство микроорганизмов погибает под действием микробицидности макрофага. Выделяют завершённый фагоцитоз, когда микроорганизм полностью переваривается макрофагом, и этого может быть достаточно для предотвращения развития инфекции. Однако многие патогенные микроорганизмы в процессе эволюции приобрели способность избегать захвата и переваривания в макрофагах. Так, полисахаридная капсула пневмококков и клебсиелл предохраняет их от взаимодействия с рецепторами макрофага, возникает устойчивость капсульных бактерий к фагоцитозу. Микобактерии связывают C3b, но их стенка устойчива к комплементопосредованному лизису, они могут быть фагоцитированы, но

такой фагоцитоз не сопровождается активацией дыхательного взрыва. Кроме того, микобактерии ингибируют слияние лизосом с фагосомой, что препятствует их перевариванию в макрофагах (незавершенный фагоцитоз). Доза микроорганизмов может быть слишком велика и макрофаги не справляются с их элиминацией. Взаимодействие микроорганизмов с рецепторами макрофагов приводит к секреции провоспалительных цитокинов, обеспечивающих развитие раннего воспалительного ответа на инфекцию.

Захват и переработка (процессинг) антигена макрофагом является началом индукции специфического иммунного ответа. Макрофаги относят к профессиональным антигенпредставляющим клеткам (АПК), способным взаимодействовать с Т-лимфоцитами. Последовательность событий процесса представления (презентации) антигена Т-лимфоцитам следующая. Попавший в клетку антиген, например бактерии, подвергается переработке с образованием отдельных пептидных фрагментов, часть которых соответствует антигенным эпитопам, т. е. имеют специфичность данного антигена. Эти фрагменты в цитоплазме АПК формируют комплексы с собственными антигенами HLA II класса, которые транспортируются к мембране АПК, где и представляются Т-хелперам (CD4+).

Другой вариант презентации касается представления эндогенно образующихся антигенов, например, при внутриклеточной репликации вируса. В этом случае вирусные белки образуют комплексы с собственными антигенами АПК HLA I класса, которые транспортируются к мембране и представляются Т-киллерам (CD8+). Кроме того, для активации Т-лимфоцитов необходим второй сигнал - взаимодействие, так называемых костимулирующих молекул, экспрессированных на мембране АПК (CD40, CD86, CD80), с соответствующими молекулами на мембране Т-лимфоцита (CD28).

Секреторные факторы. Активированные макрофаги продуцируют огромное количество цитокинов, обладающих эффекторной и регуляторной активностью, способные запускать каскад воспалительных реакций. Среди них

провоспалительные цитокины (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, ИЛ-18, ФНО- α , интерферон- α , моноцитарный хемотаксический протеин, миграцию ингибирующий фактор) и противовоспалительные цитокины (ИЛ-10, трансформирующий ростовой фактор β). С высоким уровнем ИЛ-1 связаны лихорадка, анорексия, нейтрофилез, активация эндотелиальных клеток с повышением экспрессии на них молекул адгезии, активация нейтрофилов, усиленный синтез остро фазных белков, компонентов комплемента, глюкокортикоидов, синтез коллагена и коллагеназ, активация остеокластов, усиление протеолиза в мышечной ткани.

ИЛ-6 - многофункциональный цитокин, продуцируемый многими клетками, регулирует процесс созревания плазматических клеток из В-лимфоцитов и продукцию иммуноглобулинов. ИЛ-6 объединяет функции про- и противовоспалительного цитокина. С одной стороны, ИЛ-6 является главным индуктором биосинтеза острофазных белков в печени, способствует вовлечению в воспалительный процесс мезангиальных клеток почки, В- и Т-лимфоцитов, стимулирует ранние этапы пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток-предшественников, действует на нейроэндокринную систему, способствует развитию лихорадки. С другой стороны, ИЛ-6 подавляет выработку ИЛ-1, ФНО- α , тем самым способствуя завершению воспалительной реакции.

ИЛ-8 (хемокин) обладает высокой селективной для нейтрофилов хемотаксической активностью, усиливая адгезию нейтрофилов к эндотелию, повышает экспрессию интегринов на поверхности нейтрофилов, индуцирует респираторный взрыв и дегрануляцию. В организме ИЛ-8 вызывает массивную инфильтрацию тканей нейтрофилами.

ИЛ-12 активирует пролиферацию и дифференцировку естественных киллеров и Т-лимфоцитов. Главной биологической функцией ИЛ-18 является стимуляция продукции интерферона- γ , основного активатора макрофагов.

Фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α) имеет избирательную цитотоксичность к опухолевым клеткам, активирует липопротеиновую липазу, способствуя расходу жира и развитию кахексии, участвует в регуляции иммунного ответа и воспаления. ФНО- α - основной гуморальный фактор, обуславливающий развитие септического шока. Действие ФНО- α и ИЛ-1 во многом перекрываются. ФНО- α выполняет важнейшие функции в период запуска воспаления: активирует эндотелий, способствует адгезии лейкоцитов к эндотелию за счет усиления экспрессии ряда молекул адгезии на эндотелиальных клетках, активирует лейкоциты, индуцирует продукцию других провоспалительных цитокинов. В сочетании с интерфероном ФНО- α повышает активность NO-синтазы и выработку активных метаболитов азота, что способствует усилению защиты от ряда микроорганизмов, особенно от микобактерий. Имеется две разновидности рецепторов для ФНО- α : форма I (p55), представленная на самых разнообразных клетках, и форма II (p75), содержащаяся на миелоидных клетках. Рецепторы обоих типов гомологичны рецептору Fas, принимающему сигналы к развитию апоптоза. ФНО- α может вызывать апоптоз клеток, особенно опухолевых; этот эффект проявляется и при воспалении. ФНО- α является одним из медиаторов деструкции тканей, которая имеет место при хроническом воспалении. В то же время он стимулирует фибробласты и индуцирует ангиогенез, что делает возможным его участие в репарации тканей. ФНО- α отводится существенная роль в развитии внутрисосудистого свертывания, полиорганной недостаточности.

Интерферон альфа (ИФ- α) вырабатывается макрофагами, обладает противовирусной активностью, подавляя репликацию вирусов в клетке и усиливает экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса, что повышает вероятность распознавания вирусинфицированных клеток Т-киллерами. ИФ- α усиливает активность натуральных киллеров, участвующих в противовирусной защите.

Моноцитарный хемотаксический протеин (MCP-1) - хемокин, обладающий избирательной хемотаксической активностью по отношению к моноцитам, способен усиливать цитотоксическую противоопухолевую активность моноцитов, секрецию лизосомных ферментов и продукцию супероксидных радикалов.

Фактор, ингибирующий миграцию (MIF), тормозит миграцию фагоцитирующих клеток, участвует, наряду с ИЛ-1 и ФНО- α , в каскаде реакций эндотоксического шока, возможно, контролируя уровень ФНО- α .

ИЛ-10 относится к противовоспалительному цитокину, ингибирует продукцию ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- α макрофагами и их окислительный взрыв.

Трансформирующий ростовой фактор бета (TGF- β) - мощный ингибитор клеточного деления Т- и В-лимфоцитов, естественных киллеров, способен ингибировать гемопоэз, синтез провоспалительных цитокинов, угнетать секрецию иммуноглобулинов. В то же время он усиливает синтез коллагена, способствуя репарации тканей.

Макрофаги посредством синтеза и секреции цитокинов участвуют в регуляции гемопоэза. Так, *ГМ-КСФ* регулирует пролиферацию и дифференцировку КОЕ-ГМ в сторону грануло- и/или моноцитопоэза, индуцирует продукцию макрофагами других цитокинов (ФНО- α , М-КСФ, Г-КСФ, ИЛ-1), вызывает активацию зрелых макрофагов, повышая тем самым их фагоцитарную, противоопухолевую активность и микробицидность. Макрофагальный КСФ (М-КСФ) избирательно регулирует пролиферацию и дифференцировку клеток-предшественников моноцитопоэза. *Г-КСФ* - усиливает пролиферацию и дифференцировку костномозговых клеток-предшественников гранулоцитопоэза. ИЛ-6 оказывает регулирующее действие на ранние гемопоэтические клетки-предшественники, стимулирует дифференцировку клеток мегариоцитопоэза. В то же время ряд макрофагальных цитокинов (макрофагальный воспалительный белок - MIP1 α ,

ИФ γ , ФНО- α) являются потенциальными ингибиторами пролиферации гемопоэтических клеток-предшественников.

Биологическая роль СМФ в процессах обмена веществ велика. Наличие мембранных рецепторов к инсулину и способность к синтезу медиатора, усиливающего окисление глюкозы *in vitro* жировой тканью, определяет участие мононуклеарных фагоцитов в углеводном обмене. Благодаря поверхностным рецепторам для липопротеидов низкой плотности на мембране мононуклеарных фагоцитов, осуществляется поглощение липидов, накопление их в цитоплазме клеток и трансформация макрофагов в «пенистые клетки», которым приписывается активная роль в патогенезе атеросклеротического поражения сосудов. Существенную роль играют макрофаги печени, захватывая многие компоненты крови, поступающей из сосудов кишечника.

Большое внимание уделяется изучению роли СМФ в метаболизме металлов: железа, цинка, меди. Так, мононуклеарные фагоциты поддерживают постоянный уровень железа в организме, обеспечивая регуляцию рециркуляции железа, катаболизм состарившихся эритроцитов, освобождение железа из гемоглобина и хранение основных фондов запасного железа в виде ферритина. Кроме того, макрофаги продуцируют железосвязывающие белки - трансферрин и ферритин. Способностью к синтезу трансферрина и ферритина для «внутренних потребностей» обладают практически все клетки организма, тогда как секретировать их во внеклеточное пространство могут только макрофаги и, в значительно меньшей степени, активированные Т-лимфоциты. В соответствии с этим мононуклеарные фагоциты считаются основным источником сывороточных трансферрина и ферритина, кислых изоферритинов, которые *invitro* оказывают прямой супрессорный эффект на пролиферативную активность клеток-предшественников гемопоэза.

Многочисленные функции мононуклеарных фагоцитов дают основание считать их ключевыми клетками в инициации и регуляции иммунного ответа, гемопоэза, в реализации неспецифической резистентности организма.

МЕГАКАРИОЦИТОПОЭЗ

Дифференцировка и созревание клеток мегакариоцитопоэза происходит в костном мозге, где из коммитированных, морфологически неидентифицируемых, клеток-предшественников - КОЕ-мгкц формируются колонии мегакариоцитарных клеточных элементов. При созревании клетки проходят три морфологически дифференцируемые стадии: мегакариобласт, который не превышает 10% всей популяции, промегакариоцит (около 15%) и мегакариоцит, на его долю приходится от 75 до 85%. Мегакариобласт - самая ранняя морфологически распознаваемая клетка мегакариоцитарного ряда.

Регуляция мегакариоцитопоэза осуществляется по принципу обратной связи: избыток тромбоцитов в крови тормозит тромбоцитопоэз, а тромбоцитопения его стимулирует. Основными регуляторами, стимулирующими мегакариоцитопоэз, являются ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-11, фактор стволовых клеток, лейкоз-ингибирующий фактор, ГМ-КСФ, Г-КСФ, эритропоэтин, тромбопоэтин. К факторам, ингибирующим тромбоцитопоэз, относят тромбоцитарный фактор 4, трансформирующий фактор роста $\beta 1$, интерфероны α - и γ -, и другие ингибиторы. Основные маркеры мегакариоцитарного ряда – CD41 и CD61.

Морфология клеток мегакариоцитопоэза

Мегакариобласт- диаметр 18-20 мкм. Ядро округлое, гиперхромное, темно-фиолетового цвета, занимает большую часть клетки. Хроматин в ядре распределен равномерно, определяются несколько неотчетливых нуклеол. Цитоплазма узкая, иногда с отростками, темно-синего цвета, без зернистости.

Промегакариоцит- диаметр 20-25 мкм. Ядро темно-фиолетового цвета, с бухтообразными вдавлениями. Цитоплазма узкая, иногда с отростками, синяя, могут определяться гранулы.

Мегакариоцит - диаметр 30-40 мкм. Ядро темно-фиолетового цвета, лопастное, с бухтообразными вдавлениями, фрагментированное. Хроматин распределен неравномерно. Цитоплазма обильная, светло-синего или

розоватого цвета, содержит обильную зернистость.

Процесс преобразования мегакариобластов в мегакариоциты продолжается около 25 ч. Время созревания мегакариоцита составляет примерно 25 ч, а жизненный цикл его - около 10 суток. Отличительной чертой клеточных элементов мегакариоцитопоэза является их способность к эндомитозу (полиплоидизации) - делению ядра без разделения цитоплазмы, что приводит к появлению гигантского размера клеток (мегакариоцитов). В процессе мегакариоцитопоэза клетки прodelывают от 3 до 6 эндомитозов, что соответствует ploидности мегакариоцита от 8 n до 64 n. Созревание мегакариоцитарных элементов сопровождается накоплением в цитоплазме гранул.

В α -гранулах мегакариоцитов содержится значительное количество белков: фактор Виллебранда, тромбоцитарный фактор 4, тромбоспондин, фибриноген, фибронектин, тромбоцитарный ростовой фактор, трансформирующий ростовой фактор β (оба цитокина усиливают митотическую активность фибробластов), тромбоцитарный ингибитор коллагеназы. Основная масса их синтезируется в мегакариоцитах, некоторые белки, такие как альбумин, фибриноген, IgG поступают в клетку путем эндомитоза. Тромбоцитарная пероксидаза присутствует на всех стадиях созревания клеток мегакариоцитарной линии, включая тромбоциты. Мегакариоциты, синтезируя трансформирующий ростовой фактор β , участвуют в накоплении коллагена и развитии фиброза.

Способность зрелых мегакариоцитов к эндомитозу проявляется в явлении эмпириоплезиса, суть которого заключается в захвате гемопоэтических клеток. Частота его возрастает при злокачественных новообразованиях.

Основная функция мегакариоцитопоэза - репопуляция тромбоцитов, поддержание их количества в кровотоке на постоянном уровне. Мегакариоциты располагаются в костном мозге вблизи костномозговых синусов и по мере созревания внутрь клетки врастают разделительные мембраны, по которым в

дальнейшем происходит деление цитоплазмы на тромбоциты. Существует точка зрения, что цитоплазматические отростки мегакариоцита (в виде лент диаметром 2--4 мкм) через миграционные поры проникают в синусы костного мозга, где и происходит отшнуровка тромбоцитов (тромбоцитообразование).

Тромбоцит - безъядерная сферическая клетка диаметром 2-4 мкм, средний объем $7,5 \text{ мкм}^3$ (от 3 до 10 мкм^3). Популяция тромбоцитов неоднородна. Различают зрелые тромбоциты (87%), юные (незрелые - 3,2%), старые (4,5%), формы раздражения (2,5%). Микроформы тромбоцитов имеют диаметр менее 1,5 мкм, макроформы могут достигать 5 мкм и мегалоформы тромбоцитов до 6-10 мкм. В центре зрелого тромбоцита содержится обильная азурофильная зернистость. Форма тромбоцитов - овальная, круглая, сферическая или дискоидная. В кровотоке в неактивном состоянии тромбоциты имеют дискоидную форму. При активации клетки приобретают сферичность и образуют псевдоподии и нити. Активные (возбужденные) тромбоциты имеют звездчатую форму с нитевидными отростками - псевдоподиями. Период созревания тромбоцитов в среднем составляет 8 дней, продолжительность пребывания в кровотоке от 9 до 11 дней. В циркуляции находится около 67% тромбоцитов. Располагаются тромбоциты в кровеносном русле в двух позициях - в кровотоке и пристеночно.

Мембрана и цитоскелет тромбоцитов

Структура поверхностной мембраны тромбоцита сложна. Наружная поверхность тромбоцита покрыта гликокаликсом, богатым гликопротеинами. В пространствах многослойной мембраны расположены микротрубочки, формирующие цитоскелет тромбоцита. Цитоплазматическая мембрана тромбоцитов внедряется внутрь клетки с образованием многочисленных переплетенных канальцев, связанных с внеклеточным пространством. Эта система называется «связанная с поверхностью канальцевая система», или «открытая канальцевая система» (ОКС). Обнаружено, что на поверхности мембраны ОКС имеются те же гликопротеиды, что и на внешней мембране

тромбоцитов. Таким образом, ОКС значительно увеличивает активную тромбоцитарную поверхность, что важно при изменении формы тромбоцита во время его активации.

Непосредственно в подмембранном пространстве расположены плотные микротрубочки, образующие особую плотную микротубулярную систему (ПМТС), не связанную с внеклеточным пространством. ПМТС развивается из мегакариоцитарного эндоплазматического ретикулума. Эта система является местом депонирования кальция и синтеза простагландинов. Кроме того, образуя концентрические субмембранные структуры, ПМТС является частью цитоскелета тромбоцитов.

Важное свойство мембраны интактных тромбоцитов - это разный фосфолипидный состав наружной и внутренней поверхности. Основные фосфолипиды, входящие в состав тромбоцитов, можно разделить на 2 группы: 1) не обладающие прокоагулянтной активностью - фосфатидилхолин (ФХ) и сфингомиелин (СФ); 2) обладающие прокоагулянтными свойствами - фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилэтаноламин (ФЭ) и фосфатидилинозитол (ФИ). Фосфолипиды первой группы распределены как на наружной, так и на внутренней поверхности клеточной мембраны неактивированных тромбоцитов. Фосфолипиды второй группы в неактивированных тромбоцитах локализованы преимущественно на внутренней поверхности клеточной мембраны. В процессе активации тромбоцита ФС, ФЭ и ФИ равномерно распределяются между внутренней и наружной поверхностью клеточной мембраны. Их концентрация на наружной поверхности значительно возрастает и образует прокоагулянтную поверхность, необходимую для фиксации, активации и взаимодействия плазменных белков гемостаза. Кроме того, это перераспределение меняет вязкость клеточной мембраны, что тоже важно для осуществления гемостатических реакций. Кислые фосфолипиды мембраны тромбоцитов - ФС, ФИ и нейтральный ФЭ - называют фактор 3 тромбоцитов (фз, PF3) или тромбоцитарный тромбопластин.

Помимо ПМТС цитоскелет тромбоцитов образуют нити актина, спектрин и других протеинов, связанные с мембраной и пронизывающие тромбоцит во всех направлениях.

Функции белков цитоскелета тромбоцитов:

- поддержание формы интактных тромбоцитов;
- изменение формы при активации тромбоцитов;
- «фиксация» плазматической части трансмембранных гликопротеидов;
- передача сигнала от внутренних структур к рецепторам;
- участие в «направленном» внутритромбоцитарном движении органелл, белков;
- передача внутриклеточных сигналов.

Рецепторы мембраны тромбоцитов

Специфические функции тромбоцитов в гемостазе требуют активного взаимодействия с другими тромбоцитами, плазменными белками и небелковыми веществами. Роль посредника между тромбоцитом и различными факторами внешней среды, в том числе другими участниками процесса гемостаза, играют рецепторы тромбоцитов.

На поверхности каждого тромбоцита расположено значительное количество различных рецепторов. В самом тромбоците имеется сложная система передачи и обработки сигналов, поступающих извне.

Большинство рецепторов являются гликопротеинами (ГП), фиксированными на цитоплазматической мембране тромбоцита. Один конец молекулы рецепторных ГП находится во внеклеточном пространстве, а другой «пронизывает» мембрану и контактирует со структурами тромбоцита, расположенными на внутренней стороне цитоплазматической мембраны. Рецепторы тромбоцитов могут иметь один или несколько лигандов, которые специфически взаимодействуют с рецептором, вызывают его конформационные изменения, и, таким образом, индуцируют выполнение

тромбоцитом тех или иных функций.

После соединения рецепторных локусов GPI с лигандами модулируется сигнал активации или торможения, передающийся к внутренним структурам тромбоцитов.

Рецепторы для высокомолекулярных белков

Гликопротеиновый комплекс GPIb-V-IX тромбоцитов участвует в опосредованной фактором Виллебранда адгезии тромбоцитов к субэндотелиальным структурам и активации тромбоцитов.

Связывание фактора Виллебранда с GPIb-V-IX интактных тромбоцитов незначительно. Контакт молекулы фактора Виллебранда с субэндотелиальным слоем, особенно при воздействии высокой скорости кровотока, приводит к конформационным изменениям в молекуле, что значительно повышает сродство фактора Виллебранда к GPIb-V-IX.

Тромбоцитарный GPIb-V-IX также является высокоаффинным местом связывания тромбина. Взаимодействие GPIb-V-IX с фактором Виллебранда и тромбином приводит к активации тромбоцитов.

При врожденной недостаточности рецепторного комплекса не происходит связывания с фактором Виллебранда, что характерно для болезни Бернара-Сулье.

ИНТЕГРИНЫ

На мембране тромбоцитов находится большое количество адгезивных рецепторов, относящихся к семейству *интегринов* - трансмембранных гликопротеинов, характеризующихся общностью протеиновых цепей, антигенных свойств и функций. Они принимают участие во взаимодействии клетки с клеткой и клетки с субэндотелиальным матриксом. Благодаря способности образовывать связи со многими белками, интегрины участвуют в процессах распознавания, адгезии, миграции клеток на матриксе, репаративных, иммунных и других реакциях. К семейству интегринов относятся рецепторы к фибриногену, витронектину, фибронектину, коллагену и

другим белкам. Для соединения интегринов с лигандами характерна зависимость от двухвалентных катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} .

Комплекс GPIIb-IIIa является интегриновым рецептором тромбоцитов, который взаимодействует в первую очередь с фибриногеном (фибриногеновый рецептор). Это взаимодействие обеспечивает основной путь агрегации тромбоцитов друг с другом через «фибриновые мостики». При врожденном дефиците этого рецептора - тромбастении Гланцмана - резко нарушена или отсутствует агрегация тромбоцитов с большинством индукторов агрегации, в том числе коллагеном, тромбином, АДФ. Агрегация тромбоцитов с этими индукторами также отсутствует в плазме пациентов с афибриногенемией, если фибриноген отсутствует также и в пулах хранения самих тромбоцитов.

Показано, что связь GPIIb-IIIa с фактором Виллебранда важна для эффективной агрегации тромбоцитов в условиях воздействия повышенного кровотока. Ключевой особенностью комплекса GPIIb-IIIa является способность исполнять роль рецептора только на мембране активированных тромбоцитов. Аффинность этого комплекса на поверхности неактивированных клеток очень низкая, а его антигенная характеристика отличается от таковой на активных тромбоцитах. Активация тромбоцитов приводит к значительному повышению аффинности и изменению антигенной характеристики GPIIb-IIIa.

Активированные тромбоциты могут связывать на своей поверхности более 40000 молекул фибриногена посредством GPIIb-IIIa. Это взаимодействие происходит в присутствии двухвалентных катионов (Ca^{2+}) и вначале является обратимой. Далее, по мере образования дополнительных контактов, происходит стабилизация агрегата.

У 25% жителей Северной Европы в связи с полиморфизмом аллелей в GPIIIa имеется ассоциация с развитием ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда в относительно молодом возрасте.

Использование ингибиторов для комплекса GPIIb-IIIa на ранних стадиях тромбоза приводит к быстрому восстановлению кровотока по

тромбированному сосуду и позволяет избежать инфаркта тромбированного органа.

Органеллы тромбоцитов

В цитоплазме тромбоцитов расположены митохондрии, пероксисомы (содержат каталазу), включения гликогена, лизосомы и гранулы, содержащие пулы хранения различных веществ. В тромбоцитах выделяют 3 вида органелл хранения: α -гранулы, электронноплотные тельца (δ -гранулы) и лизосомы (γ -гранулы).

В α -гранулах хранится до 30 различных белков, большинство из которых были синтезированы еще в мегакариоцитах: β -тромбоглобулин, фактор 4 тромбоцитов, фактор V, фактор Виллебранда, фибриноген, тромбоспондин, фибронектин, витронектин, α_2 -макроглобулин, P-селектин, фактор роста тромбоцитов (PDGF), ингибитор тканевого активатора плазминогена тип 1 (PAI-1), α_2 -антиплазмин, α_1 -антитрипсин, протеин S, лейкоцитарный хемотаксический фактор, высокомолекулярный кининоген и другие. Участие белков α -гранул в физиологических и патологических процессах многостороннее: а) митогенный и хемотаксический эффекты; б) адгезивное действие, участие в агрегации тромбоцитов; в) участие в пламенном гемостазе; г) вазоактивное действие; д) иммунные и другие эффекты.

В плотных тельцах (δ -гранулы) хранятся субстанции, вызывающие, прежде всего, сосудистые реакции и агрегацию тромбоцитов: адениловые нуклеотиды (АТФ, АДФ, АМФ, ц-АМФ, ГДФ), серотонин, адреналин, норадреналин, дофамин, гистамин, Ca^{2+} и другие. Высвобождающиеся из пула хранения АТФ и АДФ быстро метаболизируются в плазме до АМФ и аденозина; последние обладают прямым коронарорасширяющим действием. АДФ является важнейшим физиологическим метаболитом, обеспечивающим первичный гемостаз, стимулируя агрегацию тромбоцитов.

В лизосомах (γ -гранулы) находятся гидролитические ферменты -

пероксидаза, глюкозидазы, галактозидаза или β -глицерофосфатаза, кислая фосфатаза, неспецифическая эстераза. Лизосомы секретируют хранящийся в них секрет только при необратимой активации.

Тромбоциты способны секретировать содержимое гранул как частично при обратимой активации и в процессе трофических взаимодействий с органной капиллярной сетью, так и полностью при реакции освобождения, связанной с необратимой активацией. После дегрануляции цитоплазма тромбоцитов «опустошена». В неактивированных тромбоцитах цитоплазма может выглядеть «опустошенной» при врожденном дефекте заполнения гранул, приводящем к дефициту пула хранения - синдрому «серых» тромбоцитов.

После секреции большинство гранулярных мембран деградирует, гранулы не восстанавливаются, и тромбоциты теряют свою физиологическую активность. Если они находятся в токе крови, измененная форма способствует их быстрой элиминации в селезенке.

Тромбоцитарные факторы

Антигепариновый фактор тромбоцитов (фактор 4 тромбоцитов, ф.4, PF4)

PF4 является специфическим тромбоцитарным белком. PF4 синтезируется в мегакариоцитах, хранится в α -гранулах, высвобождается из тромбоцитов под влиянием стимуляторов агрегации.

Физиологическая роль PF4:

- Нейтрализация гепарина. Связывая с высоким сродством гепарин, PF4 препятствует взаимодействию гепарина с антитромбином. Следствием этого является повышение прокоагулянтного потенциала и усиление процесса образования тромбина.
- Хемотаксис нейтрофилов и моноцитов.
- Активация фибробластов.
- Проагрегантная функция.

- Нейтрализация коллагеназы.

На С-конце PF4 находятся две пары лизиновых остатков, которые важны для соединения фактора с гепарином и нейтрализации последнего. Один тетрамер PF4 может соединяться с 1 молекулой гепарина низкой молекулярной массы и с 2 и более молекулами гепарансульфатов высокой молекулярной массы. Конкуренентное связывание гепарансульфатов с PF4 нарушает его взаимодействие с антитромбином. Это ведет к снижению активности антитромбина и способствует формированию тромба.

PF4 способен подавлять коллагеназу. При врожденной недостаточности α -гранул тромбоцитов и мегакариоцитов - **синдроме серых тромбоцитов**- на поздних стадиях этого заболевания происходит развитие фиброза. Это, вероятно, является следствием избыточной активности коллагеназы.

β - Тромбоглобулин (β - ТГ, β - TG)

После активации тромбоцитов освобождение из них β -TG и PF4 происходит в эквимольных концентрациях. Однако PF4 быстро элиминируется из плазмы, связываясь с гликозаминогликанами, а β - TG относительно долго циркулирует, выделяясь через почки. Поэтому уровень в плазме β -TG в 3-6 раз выше, чем PF4. Влияние быстрой элиминации PF4 сохраняется и в патологических ситуациях, когда наблюдается значительное повышение β -TG и увеличение отношения β -TG/ PF4.

У больных с тромбоцитопенией и тромбоцитозом необходимо рассматривать значения β -TG и PF4 с учетом количества циркулирующих тромбоцитов. По отношению к числу тромбоцитов концентрация тромбоцитарных факторов в плазме повышена при ДВС-синдроме и при тромботической тромбоцитопенической пурпуре, хотя абсолютные значения этих показателей могут быть в пределах нормальных значений.

Фактор роста тромбоцитов (PDGF)

PDGF - синтезируется мегакариоцитами, в тромбоцитах содержится в α -

гранулах. Каждая клетка содержит порядка 1000 молекул PDGF в клетке. Фактор является сильным стимулятором репарации поврежденных тканей.

В сосудистой стенке рецепторы к PDGF присутствуют на фибробластах и гладко мышечных клетках; PDGF стимулирует пролиферацию этих клеток, а также усиливает продукцию гликозаминогликанов, коллагена и других элементов соединительной ткани. В настоящее время установлено, что рецепторы к PDGF имеются в клетках лимфоидной (Т-лимфоциты) и миелоидной линии.

Избыточная секреция PDGF в мегакариоцитах костного мозга может быть причиной развития фиброза, в том числе сопровождающего миелопролиферативные заболевания. Некоторые опухолевые клеточные линии могут продуцировать PDGF, в частности остеосаркома, гепатома, некоторые карциномы, опухоли костного мозга. β -цепь PDGF имеет характерные черты для основной структуры вируса саркомы. В связи с этим PDGF является важной составляющей сложных влияний тромбоцитов на онкогенез.

Фибриноген

Фибриноген α -гранул тромбоцитов составляет примерно 3% от плазменного пула, однако роль его в агрегации тромбоцитов, по-видимому, сопоставима со значением плазменного фибриногена. Тромбоциты получают фибриноген из мегакариоцитов, которые в свою очередь захватывают плазменный фибриноген, синтезированный гепатоцитами. Поэтому даже отмые тромбоциты образуют агрегаты, включающие молекулы фибриногена. У больных с семейной афибриногенемией основным источником фибриногена являются тромбоциты.

Фактор V

Фактор V α -гранул тромбоцитов - коагуляционный белок, синтезируемый в мегакариоцитах. Иммунологически фактор V тромбоцитов схож с фактором V плазмы, формирующим с фактором X протромбиназный комплекс. На долю фактора V тромбоцитов приходится 18-25% этого белка крови. Описан

врожденный геморрагический диатез, при котором единственным нарушением является наличие неактивной формы тромбоцитарного фактора V. Введение протромбиназного комплекса, сформированного из плазменных факторов, не корректирует геморрагических проявлений.

Фактор XIII

Фактор XIII- трансклятаминаза, участвует в стабилизации фибринового сгустка и формировании соединительной ткани. Все количество ф.XIII распределяется примерно поровну между плазмой и тромбоцитами. Тромбоцитарный фактор XIII синтезируется мегакариоцитами, плазменный пул - тканевыми макрофагами печени и гемопоэтических органов.

Функции тромбоцитов определяются их способностью к адгезии, агрегации, транспорту различных веществ в крови, дегрануляции, ретракции кровяного сгустка и т. д.

Основные функции тромбоцитов:

1. *Ангиотрофическая* функция тромбоцитов обеспечивает нормальную проницаемость и резистентность стенок микрососудов. Тромбоциты поддерживают или восстанавливают сосудистую стенку посредством процесса реэндотелизации у места повреждения. На ангиотрофическую функцию расходуется ежедневно около 15% циркулирующих в сосудах тромбоцитов. Дефицит тромбоцитов приводит к дистрофии эндотелия сосудов, он становится проницаем для плазмы и эритроцитов. В клинике повышенная проницаемость (ломкость) капилляров сопровождается мелкими кровоизлияниями (петехиями). При выраженной тромбоцитопении развивается геморрагический синдром.

2. *Адгезивно-агрегационная* функция обусловлена способностью тромбоцитов прилипать (адгезия) к субэндотелиальным структурам поврежденной сосудистой стенки и образовывать сначала скопления (агрегация), а затем тромбоцитарную пробку.

Формирование первичной тромбоцитарной пробки в зоне повреждения

сосудов возникает вследствие процесса, который можно условно разделить на 3 стадии:

- *адгезия* тромбоцитов к субэндотелиальным структурам;
- *активация* этих тромбоцитов с выбросом медиаторов из гранул хранения;
- последующая активация, рекрутирование и фиксация в зоне повреждения дополнительных тромбоцитов - *агрегация*.

В процессе *адгезии* важную роль играют 2 механизма - непосредственная адгезия тромбоцитов через рецепторы GP Ia-IIa и GPVI к коллагену субэндотелия. Однако это взаимодействие недостаточно для удержания тромбоцитов в местах воздействия высоких скоростей кровотока - артериях и артериолах. Другой механизм, эффективно удерживающий тромбоциты при высокой скорости кровотока, включает адгезию тромбоцитов, опосредованную *молекулами адгезии* - фактором Виллебранда, фибронектином, витронектином, ламинином, тромбоспондином и др. При контакте рецепторов адгезии тромбоцитов с субстратом и под воздействием синтезированного в области повреждения сосуда тромбина начинается процесс активации тромбоцитов.

Адгезия и агрегация тромбоцитов обеспечивают первичный гемостаз в мелких сосудах (микроциркуляторный). Адгезия особенно важна в крупных сосудах, так как в них только активная адгезия тромбоцитов может сформировать тромб в месте повреждения, нити фибрина не удерживаются на поверхности артериальной стенки из-за мощного тока крови. В адгезии тромбоцитов принимает участие фактор Виллебранда (плазменный и тромбоцитарный). При его отсутствии развивается болезнь Виллебранда из-за неспособности адгезированных тромбоцитов удерживаться на поверхности поврежденной сосудистой стенки.

Активация тромбоцита лежит в основе выполнения ими своих функций.

Реакция тромбоцитов на активирующие его вещества однотипна:

- Тромбоцит меняет форму, появляются псевдоподии, он

«распластывается», за счет открытой канальцевой системы (ОКС) увеличивается площадь его поверхности.

- Изменяются соотношения различных фосфолипидов между наружным и внутренним листками клеточной мембраны. Это приводит к появлению на поверхности тромбоцита большого количества фосфолипидов с прокоагулянтными свойствами - *фактор 3 тромбоцитов (PF3)*.
- На мембране тромбоцитов экспрессируются или повышается аффинность интегринов.
- Происходит секреция содержимого пулов хранения тромбоцитов во внешнюю среду.
- Тромбоциты фиксируются на поверхностях (субэндотелиальном матриксе и др.) и (или) соединяются друг с другом и другими клетками крови (происходит адгезия и агрегация).

Активация тромбоцитов может быть *обратимой и необратимой*. После обратимой активации и возвращения в неактивное состояние тромбоцит снова может активироваться и вступать во взаимодействие с другими клетками и структурами. Обратимая агрегация возникает при кратковременном воздействии слабого стимула.

Если стимуляция длительная или сильная происходит необратимая активация тромбоцита. В этом случае тромбоцит прочно фиксируется к другим клеткам или внеклеточным структурам, происходит полная дегрануляция и секреция содержимого пулов хранения. Если тромбоцит после необратимой активации поступает в ток крови, он не может в дальнейшем вступать во взаимодействие с другими клетками и быстро элиминируется из кровообращения. В случае массивного поступления в ток крови необратимо активированных тромбоцитов выявляется достоверное снижение агрегации тромбоцитов со всеми индукторами, и при микроскопическом исследовании обнаруживают большое количество деформированных тромбоцитов.

Стимуляторы тромбоцитов можно разделить на слабые и сильные. К

слабым стимуляторам относятся АДФ, адреналин, вазопрессин, серотонин. Сильные стимуляторы тромбоцитов - коллаген, тромбин, большие дозы АДФ.

Часть из них присутствует в подпороговых концентрациях в интактной плазме и избирательно накапливается в зоне повреждения сосудов; другие появляются в системе циркуляции при активации системы свертывания крови в физиологических или патологических условиях. Некоторые факторы выделяются из самих тромбоцитов (АДФ, серотонин, адреналиноподобные субстанции, фактор Виллебранда).

Агрегация тромбоцитов

Процесс агрегации заключается в активации тромбоцитов, находящихся в токе крови, и их присоединении к ранее фиксированным тромбоцитам в области повреждения. Основным рецептором агрегации является GP IIb-IIIa. После активации тромбоцита GP IIb-IIIa значительно повышает свою аффинность к фибрину и меняет антигенную структуру, что свидетельствует о значительных конформационных изменениях. Затем происходит соединение тромбоцитов, опосредованное фибрином и фактором Виллебранда.

Агрегация тромбоцитов, также как и адгезия их к месту повреждения сосуда, стимулируется АДФ, содержащимся в больших количествах в тромбоцитах, эритроцитах, стенке сосудов и тканях. С исчезновением АДФ, возможно с его распадом до АМФ, происходит дезагрегация.

В условиях патологии (парапротеинемии, криоглобулинемии) продукты фибринолиза ингибируют агрегацию тромбоцитов. Агрегация тромбоцитов нарушается также при отсутствии фибриногена, дефиците или аномалии мембранных гликопротеинов.

Сорбционно-транспортная функция тромбоцитов состоит в адсорбции ими на своей поверхности и доставке к месту кровотечения плазменных факторов свертывания, таких как фибриноген, ф.VIII и др., а также биологически активных веществ (например, серотонина) и антикоагулянтов. Тромбоциты способны переносить на своей мембране циркулирующие

иммунные комплексы.

Активация плазменного гемостаза происходит за счет тромбоцитарных факторов, освобождающихся при дегрануляция тромбоцитов. Под влиянием стимуляторов тромбоциты подвергаются адгезии на субэндотелии сосудов, изменяют форму, образуют псевдоподии (активированные тромбоциты) и объединяются в рыхлый агрегат. В последующем агрегат уплотняется, происходит дегрануляция и освобождение содержимого гранул. В процессе реакции под действием тромбина - индуктора агрегации - освобождаются АДФ, серотонин тромбоцитов, происходит синтез тромбоксана. Последний индуцирует вторичную необратимую агрегацию тромбоцитов. Высвобождающиеся внутриклеточно ионы Ca^{++} играют роль пускового механизма реакции сокращения контрактильных белков и участвуют в изменении формы тромбоцитов, активации реакции освобождения факторов и АТФ-азной активности тромбостенина. При разрушении тромбоцитов формируется ф.3, который осуществляет связь между образованием тромбоцитарного тромба и включением в процесс свертывания плазменных факторов.

Ретракция кровяного сгустка - функция тромбоцитов, обеспечивающая уплотнение сгустка и выделение из него избытка сыворотки. Ретракция способствует улучшению механических характеристик сгустка и снижению активности фибринолиза внутри него. Ретракция сгустка связана с контрактильными свойствами тромбоцитов. В активированных тромбоцитах за счет миозина происходит процесс постепенного «сжимания» цитоплазмы, что приводит к уплотнению всего сгустка крови. В процессе ретракции тромбоциты прилипают к нитям фибрина, одновременно в тромбоцитах освобождается тромбостенин, который вызывает сокращение нитей фибрина. В результате их взаимодействия образуется первичный тромб. При врожденной недостаточности GPIIb-IIIa- тромбастенин Гланцмана - нарушается ретракция сгустка крови. Следствием этого является не только грубый дефект

тромбоцитарного гемостаза, но и качественный дефект образовавшегося сгустка крови. Ретракция нарушается также при тромбоцитопениях.

Тромбоциты способны вызвать локальную вазоконстрикцию, стимулировать репарацию тканей, участвуют в регулировании местной воспалительной реакции за счет высвобождения соответствующих медиаторов из пулов хранения.

ЛИМФОЦИТОПОЭЗ

Лимфоциты, также как и другие клетки крови, развиваются из стволовой кроветворной клетки и проходят начальные этапы дифференцировки в костном мозге. На долю лимфоидных клеток в костном мозге приходится около 10% кариоцитов. Из общей лимфоидной популяции около 60% находится в процессе созревания, остальные - зрелые клетки, готовые к эмиграции или наоборот, мигрировавшие в костный мозг из крови. В крови лимфоциты составляют 0,1% от общего пула лимфоцитов, а среди лейкоцитов крови – 20-35%.

Морфология клеток лимфоцитопоэза

Лимфобласт - диаметр 12-16 мкм. Ядро округлосветло-фиолетового цвета, расположено в центре. Хроматин тонкодисперсный. В ядре 1-2 ядрышка. Цитоплазма узкая, светло-синего цвета с небольшой перинуклеарной зоной просветления.

Пролимфоцит-диаметр 12-16 мкм. Ядро округлой или овальной формы, расположено в центре или несколько эксцентрично. Хроматин имеет более грубую структуру, нечеткие нуклеолы. Цитоплазма узкая, голубого цвета с перинуклеарной зоной.

Лимфоцит - диаметр 7-12 мкм. Ядро округлой или бобовидной формы, расположено в центре или эксцентрично. Структура хроматина глыбчатая, нуклеолы при обычных методах окрашивания не выявляются. Цитоплазма светло- синяя, с перинуклеарной зоной.

Большой гранулярный лимфоцит - диаметр 12-15 мкм. Ядро округлой или бобовидной формы, расположено в центре или эксцентрично. Структура

хроматина неравномерная, глыбчатая, нуклеолы отсутствуют. Цитоплазма более широкая, голубого цвета, с мелкими или более грубыми азурофильными гранулами.

Плазмобласт - диаметр 16-20 мкм. Ядро занимает большую часть клетки, располагается в центре, нежной структуры, темно-фиолетового цвета, содержит 1-2 нуклеолы. Цитоплазма интенсивно синего цвета, характерна перинуклеарная зона просветления.

Проплазмоцит - диаметр 20 мкм. Ядро занимает большую часть клетки, располагается эксцентрично, в ядре определяются нуклеолы. Цитоплазма голубовато-синего цвета с просветлением вокруг ядра, возможно наличие вакуолей.

Плазматическая клетка - диаметр 8-12 мкм. Ядро располагается эксцентрично, округлой или овальной формы, хроматин имеет грубую колесовидную исчерченность. Цитоплазма различных оттенков базофилии с четко выраженной перинуклеарной зоной просветления, могут встречаться вакуоли.

Клетки иммунной системы - это гетерогенная популяция, отличающаяся по иммунофенотипическим и функциональным характеристикам. Для типирования лейкоцитов предложена единая классификация мембранных антигенов и распознающих их моноклональных антител (точнее, их групп кластеров). Было введено обозначение антигенов как CD (англ. *cluster designation*) с указанием соответствующего номера. Наиболее характерной особенностью лимфоцитов является присутствие на их поверхности рецепторов для распознавания антигенов. В отсутствии контакта с антигеном лимфоциты представляют собой покоящиеся клетки, они не делятся, не секретируют активные вещества, их метаболическая активность минимальна. Морфологически такие клетки представляют собой малые лимфоциты. Только после связывания антигенов происходит активация лимфоцитов, приводящая к их дифференцировке в эффекторные и регуляторные клетки. На каждом

лимфоците имеется уникальный по специфичности рецептор, передающийся дочерним клеткам. В результате возникают клоны (клон - это потомство одной клетки), отличающиеся по специфичности рецепторов. Каждый клон настроен на свой собственный антиген, а в совокупности все клоны лимфоцитов узнают огромное множество антигенов, существующих в природе. При попадании в организм антигена в иммунный ответ вовлекается тот клон (обычно группа клонов), клетки которого несут соответствующий рецептор.

Наиболее многочисленной является Т-клеточная популяция лимфоцитов, нуждающаяся в особых условиях развития, которые они находят, мигрируя из костного мозга в тимус.

Костномозговая дифференцировка Т-лимфоцитов. В костном мозге формируются ранние предшественники Т-лимфоцитов, которые затем заселяют тимус и далее периферические лимфоидные органы. Наиболее ранним Т-клеточным маркером является CD7, появление которого на стволовых CD34+ гемопоэтических клетках указывает на Т-клеточную направленность дифференцировки. Этап коэкспрессии CD34 и CD7 в костном мозге протекает очень быстро. Практически одновременно с CD7 начинается цитоплазматическая экспрессия CD2 и CD3. На этом же этапе или близком к нему на Т-клетках появляется мембранный антиген CD5, а затем и CD2. На ранних этапах дифференцировки Т-лимфоцитов может отмечаться экспрессия CD10. Незрелые протимоциты не имеют молекул HLA-DR, TdT (терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза), CD3, в них только начинается перестройка генов Т-клеточного рецептора.

Дифференцировка Т-лимфоцитов в тимусе. Миграция предшественников Т-лимфоцитов из костного мозга в тимус обусловлена целым рядом их свойств, что позволяет им покинуть костный мозг, задержаться в сосудах тимуса и преодолеть гематотимический барьер. Под влиянием микроокружения тимуса они проходят ряд последовательных стадий сначала в кортикальном, затем в медуллярном слое, в ходе которых формируется Т-клеточный рецептор,

служащий для распознавания антигена.

Для *кортикальных тимоцитов* является характерной экспрессия молекулы CD1a и одновременное присутствие антигенов CD4 и CD8. Большинство кортикальных тимоцитов гибнет путем апоптоза. Последний этап дифференцировки тимоциты проходят в медуллярном слое (*медуллярные тимоциты*). Он характеризуется появлением мембранных маркеров CD3, CD2, TCR $\alpha\beta$, разделением Т-лимфоцитов на две субпопуляции - Т-хелперы (CD4+) и цитотоксические клетки (CD8+).

Т-лимфоциты покидают тимус через сосуды кортико-медуллярной зоны и, поступив в кровоток, становятся частью единого пула рециркулирующих Т-лимфоцитов. Из тимуса в периферические лимфоидные органы поступают наивные Т-лимфоциты (CD4+ или CD8+). Характерной иммунофенотипической особенностью этих клеток является мембранная экспрессия молекулы CD45RA. Во вторичных лимфоидных органах (лимфатические узлы, селезенка, лимфатические фолликулы) Т-лимфоциты занимают преимущественно тимусзависимые зоны: паракортикальные зоны лимфатических узлов, параартериальные муфты селезенки. В медуллярной зоне обнаруживаются Т-клетки вместе с В-лимфоцитами и плазматическими клетками. В этих областях преобладают CD4+ Т-клетки над CD8+, располагаясь скоплениями вокруг интердигитирующих дендритных клеток.

Т-лимфоциты недолго задерживаются в лимфоидных органах, вскоре покидают их, поступая в лимфу или, например, из селезенки мигрируют с током крови. Т-клетки вовлекаются в процессы активации и иммунного ответа при контакте с антигеном в периферических лимфоидных органах. После ряда последовательных делений дифференцировка заканчивается образованием сенсibilизированных (эффektorных) Т-хелперов (CD4), либо Т-цитотоксических лимфоцитов (CD8) и формированием клеток памяти (CD45RO+), доля которых составляет почти 50% лимфоцитов.

Т-лимфоциты имеют разную продолжительность жизни. Большая часть

их относится к ДОЛГО живущим клеткам, поэтому с возрастом увеличивается количество CD3+CD4+ клеток памяти (CD45RO+) и уменьшается количество наивных клеток (CD45RO-). Время обновления ДОЛГО живущей популяции Т-лимфоцитов составляет годы, что иногда сопоставимо со сроком жизни человека. Небольшая часть клеток живет несколько недель, месяцев.

С возрастом количество Т-лимфоцитов в костном мозге повышается - в трепанобиоптате до 34,8%, в аспиратах костного мозга до 46%. Отмечается селективный хоминг-эффект зрелых CD8+ лимфоцитов в костный мозг, где соотношение CD4/CD8 составляет менее 1,0. Зрелые Т-лимфоциты костного мозга осуществляют контроль над процессами пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток, как путем контактных взаимодействий, так и опосредованно через продукцию цитокинов.

Основным и наиболее специфичным маркером Т-лимфоцитов является CD3. Менее специфичны, но почти всегда присутствуют на Т-клетках CD7, CD2, CD5. Молекулы CD4 и CD8 определяют субпопуляции Т-лимфоцитов - Т-хелперы и Т-киллеры (цитотоксические лимфоциты).

Среди Т-хелперов выделяют Т-хелперы первого и второго типа (Th1 и Th2), которые помогают развитию соответственно клеточного и гуморального иммунного ответа. Т-лимфоциты участвуют в реализации клеточного иммунного ответа, который проявляется в двух формах: цитотоксического ответа и реакции гиперчувствительности замедленного типа.

В основе цитотоксического ответа лежит активация Т-киллеров, которые разрушают пораженные клетки-мишени (например, вирусинфицированные, опухолевые клетки). Реакция гиперчувствительности замедленного типа имеет в основе реакцию макрофагов, направляемую Th1-клетками. Клеточный иммунный ответ развивается при отторжении алло генного трансплантата - реакции «хозяин против трансплантата» и «трансплантат против хозяина».

Запуск цитотоксического ответа осуществляется путем представления макрофагами или дендритными клетками антигена в комплексе с молекулами

главного комплекса гистосовместимости (МНС) 1 класса Т-киллерам (цитотоксическим Т-лимфоцитам), которые активируются, подвергаются бласттрансформации и экспрессируют ряд активационных молекул. Наиболее важным является рецептор к ИЛ-2 (CD25). На этом этапе помощь при активации Т-киллеров состоит в выработке ИЛ-2, который обуславливает их размножение. Источником ИЛ-2 служат Т-хелперы и сами Т-киллеры. Пролиферация цитотоксических клеток обеспечивает необходимую численность киллеров для достижения конечной цели - разрушения клеток, на поверхности которых присутствуют молекулы МНС 1 класса, содержащие чужеродные пептиды, т. е. инфицированные или трансформированные клетки.

Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) представляет собой самую медленную форму клеточного иммунного ответа. Известным проявлением ГЗТ служит туберкулезная реакция - ответ на введение туберкулина. Особенность реакции ГЗТ состоит в том, что ее эффекторными клетками являются не цитотоксические лимфоциты, а CD4⁺-клетки. В основе реакции ГЗТ лежит взаимодействие антигенпредставляющих (макрофаг, дендритная клетка) и Th1-клеток. В первой фазе реакции ГЗТ антигенпредставляющая клетка взаимодействует с Т-хелпером, который получает 3 сигнала:

- 1) распознавание с помощью Т-клеточного рецептора комплекса молекулы МНС II класса с антигенным пептидом, образовавшимся в результате расщепления антигена;

- 2) воздействие костимулирующих молекул CD28 и CD80;

- 3) действие ИЛ-12, продуцируемого антигенпредставляющей клеткой. В результате Т-хелпер дифференцируется в Th1-клетку.

Во второй фазе Th1-клетка взаимодействует с макрофагом, представляющим пептидный фрагмент того же антигена. При дополнительной стимуляции посредством CD28 Th1-клетка активируется и секретирует комплекс цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-1, ГМ-КСФ, ИФγ, ФНО-α), один из

которых (ИФ- γ) активизирует макрофаги, что приводит к повышению их фагоцитарной, бактерицидной, секреторной и киллерной активности. Макрофаги продуцируют большой спектр цитокинов, в значительной степени опосредующих общие и местные проявления реакции ГЗТ (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12, ФНО- α , МIP, MCP, O₂, NO). При развитии неэффективной реакции на внедрение инфекционных агентов или инертных частиц, которые не поддаются разрушению или элиминации, формируется гранулема. В центре гранулемы сосредоточены возбудитель, инфицированные макрофаги, гигантские эпителиоидные клетки, казеозный детрит, вокруг формируется демаркационный клеточный вал из Т-лимфоцитов или клеток других типов. Таким образом, гранулематозная ткань, развивающаяся при хронических инфекциях, представляет собой структуру, предназначенную для изоляции возбудителя или иного чужеродного объекта, разрушение которого оказывается невозможным.

Дифференцировка В-лимфоцитов. Костный мозг служит основным местом дифференцировки В-лимфоцитов. Содержание их в костном мозге выше, чем Т-лимфоцитов и их предшественников. Основной характеристикой В-лимфоцитов является наличие на их мембране рецепторов для распознавания антигенов, основу которых составляют молекулы иммуноглобулинов.

В-лимфоциты в костном мозге проходят этап антигеннезависимой дифференцировки. Самый ранний распознаваемый этап дифференцировки В-лимфоцитов носит название **про-В-лимфоцита**. На этой стадии происходит начальный этап перестройки генов тяжелых μ -цепей иммуноглобулинов и появляется на мембране CD19, который является общим (пан - В-клеточным) маркером для всех В-лимфоцитов и участвует в процессах активации клеток. Появление CD19 происходит в клетках, экспрессирующих молекулы HLA-DR, часто в сочетании с CD38, CD34 и TdT. Отличительной чертой следующего этапа дифференцировки В-лимфоцитов является экспрессия на мембране CD10 (CALLA) и цитоплазматического CD22 антигенов. Эта стадия носит название

пре-пре-В-лимфоцита.

На следующем этапе происходит появление цитоплазматических μ -цепей иммуноглобулинов и молекулы CD20: клетка приобретает иммунофенотип **пре-В-лимфоцита**. На этой стадии происходит перестройка генов легких цепей, которая завершает процесс генетических преобразований в В-лимфоцитах. Легкие цепи иммуноглобулинов еще не синтезируются в пре-В-клетках. Клетки непродуктивно перестроенными генами иммуноглобулинов гибнут в костном мозге, вероятно, путем апоптоза. Следствием реаранжировки генов L-цепей является экспрессия полноценного мембранного IgM в сочетании с другими мембранными маркерами. Этот этап соответствует стадии **незрелой В-клетки**. Процесс антигеннезависимой дифференцировки В-лимфоцитов завершается экспрессией IgD, который сосуществует с IgM-рецептором. Присутствие на мембране IgM + IgD, CD19, CD20 антигенов позволяет считать В-лимфоцит **зрелой (наивной) клеткой**. С момента завершения формирования рецепторного комплекса В-клетка приобретает способность взаимодействовать с антигеном.

Зрелые девственные (наивные) В-клетки покидают костный мозг, имея сформированный иммуноглобулиновый рецептор, активационные антигены CD23 и CD5 на мембране отсутствуют. Содержание В-лимфоцитов в трепанобиоптатах костного мозга составляет у взрослых лиц около 34% (16-40), количество клеток с иммунофенотипом CD20+CD19+ 16% (12-23); в аспиратах костного мозга 8% и 6,6%, соответственно. С увеличением возраста происходит снижение общего количества В-лимфоцитов в костном мозге и их пролиферативного потенциала. В основном это происходит за счет примитивных В-клеток, а также клеток, экспрессирующих CD45RA.

Большую роль в развитии В-лимфоцитов играет костномозговое микроокружение - клетки стромы и молекулы межклеточного матрикса, гуморальные факторы (ИЛ-7, ИЛ-3, ИЛ-1, ИЛ-4, интерферон- γ). Зрелые В-лимфоциты покидают костный мозг, попадают в циркуляцию и поступают в

периферические лимфоидные органы, где при встрече с антигеном они проходят этап антигензависимой дифференцировки. В этих органах они выполняют свои функции, локализуясь в наружных слоях коры лимфатических узлов, краевой зоне и фолликулах белой пульпы селезенки. Продолжительность жизни большинства зрелых В-лимфоцитов в отсутствие антигенной стимуляции составляет несколько месяцев. Основным источником обновления популяции В-лимфоцитов служит костный мозг. Зрелые В-лимфоциты располагают необходимыми мембранными молекулами, чтобы не только распознать антиген, но и эффективно контактировать с другими клетками иммунной системы, молекулами иммуноглобулинов, компонентами комплемента, цитокинами.

В лимфатических узлах (ЛУ) зрелые В-лимфоциты поступают в первичные фолликулы, которые представлены в виде компактных округлых образований, не имеющих светлого (зародышевого) центра. Вторичные фолликулы отличаются от первичных наличием зародышевого центра.

Морфология клеток первичного фолликула соответствует малому лимфоциту, большинство из них не имеет признаков активации. Лимфоциты экспрессируют на мембране CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD37, т. е. имеют фенотип периферических В-клеток. Чаще всего эти клетки содержат мембранные IgM + IgD или IgM. Активационные антигены CD23, CD5, CD38, а также CD10, как правило, отсутствуют. У плода и новорожденного фенотип клеток первичных фолликулов ЛУ отличается от фенотипа клеток взрослых присутствием маркера CD5 на большинстве лимфоцитов. Содержание CD5+ клеток в ЛУ взрослых составляет 2-3% от общего количества В-лимфоцитов. В отсутствие антигенной стимуляции клетки через несколько дней гибнут путем апоптоза. При взаимодействии с антигеном происходит активация и пролиферация В-лимфоцитов, отражением которой является появление на мембране молекулы CD23, повышенная экспрессия HLA-DR, утрата мембранного IgD. Особая группа антигенов, включающая главным образом

аутологичные и немного численные (преимущественно тимуснезависимые) экзогенные антигены, ведет к появлению экспрессии CD5 в процессе активации В-лимфоцитов. Активированные CD5-CD23+ В-лимфоциты мигрируют в фолликул ЛУ, структура которого из-за быстрой пролиферации видоизменяется – появляется зародышевый центр и, так называемая, мантийная зона.

В условиях микроокружения зародышевого центра происходит многоступенчатый процесс антигензависимого созревания и дифференцировки В-клеток. В темной зоне зародышевого центра активированные В-клетки утрачивают CD23 и превращаются в центробласты (ЦБ), которые активно пролиферируют. Для центробластов характерна экспрессия CD77, CD10, CD19, CD20, CD38, практически полное отсутствие IgM и IgD. Большинство этих клеток гибнет путем апоптоза, поскольку ген антиапоптоза *bcl-2* в центробластах не функционирует. Разрушенные погибшие клетки поглощаются макрофагами зародышевых центров, называемых макрофагами инородных тел (*tingible-body macrophages*). Здесь же в зародышевом центре часть центробластов дифференцируется в центроциты - клетки с расщепленными ядрами.

На центроцитах появляются мембранные иммуноглобулины (IgG, IgA или IgE). Синтез иммуноглобулинов с продукции IgM переключается на IgG, IgA и IgE. Переключение происходит преимущественно с синтеза IgM на синтез IgG, обнаружение которого свидетельствует о том, что клетка подверглась антигенной стимуляции. Одновременно с пролиферацией и дифференцировкой центробластов в центроциты происходят соматические гипермутации в переменных участках генов иммуноглобулинов, в процессе которых в генах некоторых клеток возникают различные поломки, в результате чего клетка не может продуцировать иммуноглобулины и подвергается апоптозу. Процесс соматической мутации необходим для повышения специфичности иммуноглобулиновых цепей и приобретения высокого аффинитета к антигену. Из центроцитов формируются В-клетки памяти и

плазматические клетки. Это происходит в апикальной светлой зоне зародышевого центра фолликула, содержащей густую сеть CD23+ фолликулярных дендритных клеток (ФДК). ФДК содержат значительное количество антигена, к которому формируется иммунный ответ в данном зародышевом центре. Антиген на ФДК удерживается в виде иммунных комплексов с антителами и комплементом. Это происходит за счет экспрессии на ФДК большого числа Fc-рецепторов (CD23, CD16, CD32) и рецепторов комплемента (CD35, CD21, CD11b). Антиген на ФДК представляется В-лимфоциту в свободном виде или в виде маленьких мембранных телец, нагруженных антигеном. Направленность дифференцировки В-лимфоцитов в клетки памяти или в плазматические клетки регулируется в апикальной светлой зоне зародышевых центров. Связывание молекулы CD40 на В-клетках с соответствующим лигандом Т-лимфоцитов ведет к формированию В-клеток памяти. Плазмоцитарная дифференцировка В-лимфоцитов происходит после их взаимодействия с растворимым фрагментом CD23 или с антигеном CD23, присутствующим на ФДК. В этих взаимодействиях участвует CD21 и ИЛ-1. Зрелые плазматические клетки выполняют основную функцию - синтез и секрецию иммуноглобулинов, обеспечивающих гуморальную защиту организма. При этом плазматическая клетка теряет большинство В-клеточных мембранных рецепторов, на их поверхности определяется только CD38. Субпопуляция CD5+ В-клеток присутствует на границе зародышевого центра и внутреннего слоя мантии. Остается неизвестным, подвержены ли они тем же изменениям в фолликулярном центре, так как механизм соматических гипермутаций в них неэффективен, и при активации преобладает сигнал к апоптозу. Однако эти клетки способны к дифференцировке в плазмоциты и к переключению классов иммуноглобулинов с IgM на IgG и IgA.

Клетки маргинальной зоны фолликула ЛУ представлены по сравнению с селезенкой и лимфоидной тканью слизистых оболочек в незначительном количестве – это так называемые «моноцитоподобные В-клетки». Термин отражает

их внешнее сходство с моноцитоидными элементами (неправильная форма ядра, широкая, обильная светлая цитоплазма). Выраженная пролиферация этих клеток в лимфатическом узле наблюдается при токсоплазмозе, инфекционном мононуклеозе, краснухе, ВИЧ-инфекции. Иммунофенотип этих клеток соответствует активированным В-клеткам, близким к терминальным стадиям дифференцировки (CD19, CD20, CD22, CD37, CD40, IgM). Экспрессия CD21, CD23, CD24 обычно отсутствует, что отличает их от лимфоидных элементов светлых центров и зоны мантии фолликулов. Наибольшее сходство этот тип клеток имеет с лимфоцитами маргинальной зоны селезенки, но отличается от них большим постоянством экспрессии CD20, CD39, CD75, CD38.

Общими маркерами В-лимфоцитов являются CD19, CD20, CD22, CD79a. Основная функция В-лимфоцитов - реализация гуморального иммунного ответа, в основе которого лежит активация В-клеток и их дифференцировка в антитело образующие плазматические клетки. В процессе ответа происходит переключение синтеза антител с IgM на IgG - антитела, а при иммунном ответе в слизистых оболочках - на IgA-антитела. Антитела нейтрализуют свободные антигены, образуя иммунные комплексы, опсонизируют клетки-мишени фагоцитов и естественных киллеров, активируют комплемент.

В результате иммунного ответа образуются Т- и В-клетки памяти, которые обеспечивают ускоренное развитие реакции на повторное попадание в организм тех же антигенов - вторичный иммунный ответ. Клетки памяти представляют собой малые лимфоциты, обладающие способностью к рециркуляции и большой продолжительности жизни, которая обуславливает длительное сохранение иммунитета к возбудителям инфекционных заболеваний и другим чужеродным агентам.

В случае, если лимфоциты не получили комплекса активирующих сигналов, а также после выполнения своих функций или при действии некоторых факторов (радиация, глюкокортикоиды), они подвергаются

апоптозу.

Естественные киллеры (NK-клетки) - фракция лимфоцитов, лишенных маркеров Т- и В-клеток. Их фенотип CD3-CD16+CD56+. Они не имеют перестройки генов Т- клеточного рецептора, экспрессируют на мембране рецептор к комплементу (C3d), вирусу Эпштейна-Барр (CD21), Ес-рецептор. Содержание этих клеток наиболее значительно в печени и селезенке, незначительно - в лимфатических узлах, костном мозге, легких, лимфоидных фолликулах тонкой кишки. В периферической крови на долю NK-клеток приходится от 5 до 25% лимфоцитов, в трепанобиоптате костного мозга - 4% (3-7). Морфология этих клеток соответствует большим гранулярным лимфоцитам - 12-15 мкм в диаметре, имеют азурофильные гранулы в цитоплазме, количество и плотность которых варьирует. В гранулах содержатся перфорин - белок, обуславливающий образование пор в мембране клеток-мишеней, гранзимы - ферменты, вызывающие индукцию апоптоза при проникновении в клетки-мишени, хондроитинсульфат А, защищающий NK-клетки от аутолиза. Основная функция естественных киллеров – контактный цитолиз клетки-мишени (инфицированные вирусом, опухолевые и быстро пролиферирующие клетки) с выбросом сигнальных молекул, включающих в них апоптоз.

Нормальные показатели содержания в крови основных популяций лимфоцитов представлены в справочном материале.

Таким образом, благодаря своей полифункциональности, клетки крови участвуют во многих обменных процессах организма, обеспечивая клеточный гомеостаз. Место пребывания клеток гемопоэза - кровь, лимфа, ткани, органы, где они выполняют транспортную функцию, участвуют в защитных реакциях организма, репаративных, воспалительных, некротических и других процессах. Имея ограниченную продолжительность жизни, клетки требуют периодического обновления. Постоянное образование новых клеточных клонов и является сущностью гемопоэза. Равновесие в системе гемопоэза

поддерживается процессами пролиферации и дифференцировки клеточных элементов в органах кроветворения и разрушением отживших и поврежденных клеток в органах системы мононуклеарных фагоцитов. Постоянство клеточного состава крови определяет нормальные показатели миело-и гемограммы. Несмотря на многочисленные, вызванные научно-техническим прогрессом, изменения в окружающей среде, кроветворение остается стабильным, а ситуации, при которых имеются отклонения от нормальных параметров гемограммы, являются показанием для более глубокого гематологического обследования. Общий анализ крови рассматривается как показатель состояния организма.

Возрастные особенности некоторых показателей гемограммы

В течение всего периода детства в системе крови выявляются закономерные возрастные особенности, характеризующиеся определенной динамикой изменений гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов и других гематологических показателей. Сразу после рождения у ребенка отмечается повышенное содержание гемоглобина, эритроцитов, гематокрита вместе с увеличением среднего объема эритроцитов и среднего содержания гемоглобина в эритроците. В 1-е сутки эти показатели несколько увеличиваются за счет гемоконцентрации и плацентарной гемотрансфузии, со 2-го дня - снижаются. Красная кровь новорожденных характеризуется анизоцитозом, макроцитозом, пониженной осмотической резистентностью эритроцитов, определяются эритрокарициты, которые исчезают из периферической крови к концу периода новорожденности. У новорожденных ретикулоциты составляют от 2 до 4% и снижаются до значений взрослого человека в течение 8 дней. Недоношенные новорожденные имеют более высокое содержание ретикулоцитов.

Тенденция к эритроцитозу, повышенная гемоглобинизация эритроцитов, ретикулоцитоз, наличие эритрокарицитов у новорожденных детей обусловлены недостаточным снабжением плода кислородом в период внутриутробного развития. Это приводит к интенсивному эритропоэзу. После

рождения ребенок попадает в условия гипероксии, меньше вырабатывается эритропоэтина, что сопровождается некоторым уменьшением активности эритропоэза. Снижению показателей красной крови также способствует более укороченная жизнь эритроцитов в этот период.

Вслед за этим периодом в течение первого полугодия жизни отмечается резкое физиологическое падение гемоглобина и эритроцитов, выраженное снижение гематокрита, среднего объема эритроцита и среднего содержания гемоглобина в эритроците. Минимальные значения этих показателей наблюдаются в возрасте 2-4 месяцев. Характерны меньшая гемоглобинизация эритроцитов, тенденция к гипохромии вследствие истощения запасов железа и роста ребенка. В дальнейшем происходит повышение показателей красной крови. Со 2-го года жизни отмечается увеличение количества гемоглобина, объема эритроцитов, исчезновение микроцитоза. Эти изменения связаны со становлением эритропоэза в постнатальный период, сменой функционирующих эритроидных предшественников с бурстобразующих (БОЕ-Э) на эритропоэтинчувствительные (КОЕ-Э) и типов гемоглобина с фетального на гемоглобин взрослого типа. Количество лейкоцитов в первые часы после рождения колеблется в широких пределах. В первый день жизни их число увеличивается до $35-40 \times 10^9/\text{л}$ с преобладанием нейтрофилов. При этом в крови могут быть найдены молодые формы нейтрофилов (метамиелоциты, миелоциты, промиелоциты) и нормобласты. Такие изменения состава крови особенно характерны для недоношенных новорожденных. На 5-6-е сутки количество лимфоцитов и нейтрофилов становится одинаковым. Это так называемый первый перекрест. К концу периода новорожденности лейкоцитоз снижается, и среди форменных элементов крови начинают преобладать лимфоциты. Минимальные значения сегментоядерных нейтрофилов и максимальное число лимфоцитов определяются в возрасте 5-6 месяцев. Преобладание лимфоцитов в формуле крови наблюдается у детей до 4-6 лет. В этом возрасте содержание лимфоцитов и нейтрофилов сравнивается (второй

перекрест). Направленность в изменении числа нейтрофилов и лимфоцитов сохраняется до 14-15 лет, когда содержание этих клеток становится таким же, как у взрослых.

В течение первых 2 недель жизни в крови имеют место миелоциты и метамиелоциты. Содержание моноцитов у доношенных детей сразу после рождения низкое, в последующие 2 недели увеличивается, а затем вновь несколько снижается. Число тромбоцитов во все периоды детства существенно не изменяются.

При оценке состава лейкоцитов периферической крови необходимо ориентироваться только на абсолютное количество отдельных форм лейкоцитов, соотнося их с возрастными нормами. Увеличение процентного содержания того или иного вида клеток может отражать не увеличение их абсолютного числа, а снижение количества других форменных элементов крови.

РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КРОВИ

Изменения гемопоэза могут носить опухолевый и реактивный (временный, перераспределительный, функциональный) характер. Этиологические факторы, обуславливающие реактивные изменения крови, разнообразны. Это бактериальные и вирусные инфекции, гельминты, простейшие, токсические и лекарственные вещества, ионизирующая радиация и многое другое. Одни и те же этиологические агенты могут вызывать различные изменения крови у разных людей. Вместе с тем можно выделить определенную специфичность реагирования той или иной клеточной линии, например, глистные инвазии приводят к эозинофилии, вирусные инфекции - лимфоцитозу. Степень интенсивности клеточной реакции определяется индивидуальной реактивностью организма, поэтому один и тот же раздражитель в одних случаях вызывает изменения в гемограмме, в других - она остается интактной.

О состоянии лейкопоэза судят по количеству лейкоцитов, изменению их

соотношения в лейкоцитарной формуле и появлению дегенеративных и атипичных клеток. Лейкоцитарный состав крови рассматривается как общий показатель состояния организма при самых различных патологических процессах. Лейкоцитарная картина крови здоровых людей довольно постоянна и складывается в результате процессов дегенерации в органах и тканях и регенерации в кроветворных органах. Это постоянство, однако, нарушается многократно в течение суток за счет физиологических колебаний лейкоцитов, при этом качественный состав их не меняется.

ЛЕЙКОЦИТОЗ

Лейкоцитоз - увеличение содержания лейкоцитов в крови более $9,0 \times 10^9/\text{л}$. Лейкоцитоз может быть нейтрофильный, эозинофильный, моноцитарный, лимфоцитарный, редко вследствие увеличения другого вида клеток.

Нейтрофильный лейкоцитоз

Наиболее часто имеет место нейтрофильный лейкоцитоз или нейтрофилез, при котором абсолютное количество нейтрофилов превышает $6,0 \times 10^9/\text{л}$ (табл.1).

Клинико-диагностическое значение нейтрофилеза

Вид лейкоцитоза	Патогенетические механизмы	Клиническая ситуация
Реактивный (перераспределительный)	Перераспределение пристеночного и циркулирующего пулов нейтрофилов, мобилизация костномозгового пула нейтрофилов	Физическая нагрузка, физиотерапевтические процедуры, горячие холодные ванны, боль, стресс, послеоперационные состояния, прием глюкокортикоидов
	Гипоксия	Острые и хронические анемии (постгеморрагическая, гемолитическая, аутоиммунная и др.)
Стимуляция лейкопоэза	Инфекционные агенты, токсины	Абсцесс, остеомиелит, ангина, скарлатина, дифтерия, отит, пневмония, аппендицит, пиелонефрит, менингит, сепсис, перитонит
	Воспаление и некроз тканей (факторы воспаления и тканевого распада)	Эмпиема плевры, инфаркт органов, атака ревматизма, обширные ожоги и травмы, операция, злокачественные новообразования и др.
	Эндогенные интоксикации	Ацидоз, эклампсия, уремия, синдром Кушинга, подагра
Опухолевый	Лейкозная пролиферация клеток	Лейкозы

Степень выраженности нейтрофильного лейкоцитоза зависит от объема костномозгового и сосудистого резерва, активности костномозговой продукции клеток, интенсивности потребления гранулоцитов в тканях, вирулентности микроорганизмов, характера патологического процесса, состояния защитных систем организма.

Нейтрофильный лейкоцитоз (нейтрофилез) может быть следствием:

- усиленной продукции клеток в костном мозге;

- повышенной миграции нейтрофилов из костномозгового гранулоцитарного резерва и синусов селезенки в кровь;
- перераспределения нейтрофилов из маргинального в циркулирующий пул (демаргинация);
- задержки миграции нейтрофилов из крови в ткани;
- сочетанных действий выше перечисленных причин.

Время развития нейтрофилеза может исчисляться минутами (демаргинация), часами (выброс нейтрофилов из костного мозга) и сутками (повышение продукции клеток в костном мозге).

Реактивный нейтрофильный лейкоцитоз наблюдается вследствие перераспределения клеток в органах и крови «без участия» костного мозга (прием пищи, лекарственных препаратов, физические и эмоциональные нагрузки, воздействие холода, тепла, наркоза и др.) или при повышенном выбросе нейтрофилов из костного мозга в ответ на инфекционный, септический, гнойно-воспалительный и токсический процессы, отравление.

Перераспределительный лейкоцитоз характеризуется переходом лейкоцитов из пристеночного пула в циркулирующий. Этому способствуют такие факторы, как повышенное давление крови в капиллярах, нарушение кровотока в мелких сосудах различных органов, подъем уровня адреналина и кортизола. Перераспределительный лейкоцитоз бывает, как правило, незначительным и кратковременным.

Лейкоцитоз новорожденных и беременных носит большей частью смешанный характер: он может быть как перераспределительный, так и в результате активации костномозгового кроветворения. Повышенное количество лейкоцитов сопровождается увеличением в крови нейтрофилов, сдвигом лейкоцитарной формулы влево до мета- и миелоцитов, что отражает максимальную активность процессов пролиферации и элиминации гранулоцитов из костного мозга. Это не исключает развития нейтрофильной реакции при осложнениях.

Истинное увеличение числа циркулирующих нейтрофилов наблюдается в том случае, если повышенная продукция и выход в циркуляцию нейтрофилов стимулируется на уровне костного мозга. Нейтрофильный лейкоцитоз развивается при многих острых бактериальных инфекциях, локализованных воспалительных процессах (фурункул, карбункул, абсцесс, флегмона, тонзиллит, отит). Наиболее часто нейтрофилез сопровождает такие заболевания, как пневмония, холецистит, сальпингит, менингит, перитонит, сепсис, эндокардит, остеомиелит, пищевые токсикоинфекции, а также инфекционные заболевания (дифтерия, скарлатина, сибирская язва, чума).

Интенсивность лейкоцитарной реакции значительно варьирует у разных больных, что во многом зависит от характера патологического процесса. Так, при катаральной форме аппендицита количественные и качественные изменения крови наблюдаются приблизительно в 50% случаев. Через 48-72 ч при стихании воспалительного процесса количество лейкоцитов снижается до $7-8 \times 10^9/\text{л}$, при обострении - вновь увеличивается до $15-18 \times 10^9/\text{л}$ со сдвигом влево. При развитии перитонита лейкоцитоз достигает $20-25 \times 10^9/\text{л}$. Острый деструктивный аппендицит сопровождается повышением количества лейкоцитов в 94% случаев. Гангренозному аппендициту с бурным развитием клинической картины, септическим перитонитом сопутствует лейкопения со значительным сдвигом влево в лейкоцитарной формуле. При хроническом аппендиците вне обострения количество лейкоцитов колеблется в нормальных пределах, редко - ниже. Нейтрофильный лейкоцитоз со сдвигом влево может служить диагностическим признаком воспалительных заболеваний почек.

Значительное увеличение числа нейтрофилов в крови со сдвигом влево и появлением токсической зернистости в нейтрофилах имеют место при тканевом повреждении, вызванном механической травмой, термическим ожогом, подагрой. При оперативных вмешательствах, как результат массивного повреждения тканей, нейтрофилез сохраняется от 12 до 36 ч. Введение колониестимулирующих факторов (КСФ), вакцинация, воздействие различных

ядов способствуют развитию нейтрофилии.

Лейкоцитарный нейтрофилиз развивается в течение 1-2 ч после начала острого кровотечения, гемотрансфузии несовместимой крови, острого гемолиза.

Повышенное содержание нейтрофилов в крови может иметь место при злокачественных заболеваниях (рак легких, желудочно-кишечного тракта, печени и др.). Во многих случаях опухолевые клетки продуцируют КСФ, которые вызывают нейтрофилиз путем прямой стимуляции костномозговых предшественников. Подъем нейтрофилов при злокачественных заболеваниях может свидетельствовать о некрозе или нагноении опухолевого узла. В ряде случаев реактивный нейтрофильный лейкоцитоз со сдвигом влево до миелоцитов следует дифференцировать с хроническим миелолейкозом. С этой целью используют определение активности щелочной фосфатазы в нейтрофилах, которая повышается при воспалительном процессе.

Из лекарственных препаратов продолжительный нейтрофилиз вызывают кортикостероиды, соли лития, катехоламины, которые усиливают синтез КСФ.

Механизм развития нейтрофилии при выше перечисленных ситуациях связан с повышенным выбросом нейтрофилов из гранулоцитарного костномозгового резерва. В то же время одновременно происходит усиленная продукция гранулоцитов в костном мозге, стимулированная колониестимулирующими факторами (Г-КСФ, ГМ-КСФ), которые секретируются фагоцитами в очаге воспаления.

Нейтрофилия не бывает беспричинной. В большинстве случаев нейтрофилия, особенно со сдвигом влево, с токсической зернистостью, вакуолизацией цитоплазмы нейтрофилов, появлением телец Кнэзко-Деле, служит маркером воспалительного процесса. Если нет явной причины нейтрофилии, следует искать скрытый воспалительный процесс (заглоточный, поддиафрагмальный абсцесс и др.), злокачественную опухоль. Изменения в гемограмме могут иметь прогностическое значение. Так, выраженный нейтрофильный лейкоцитоз со сдвигом влево свидетельствует о максимальной

активности гемопоэза, что прогностически благоприятно. Нейтрофилез со сдвигом влево при наличии лейкопении связан с резким подавлением защитных систем, истощением гранулоцитарного костномозгового резерва и является крайне неблагоприятным признаком.

Морфологические аномалии нейтрофилов

Гиперсегментация ядер - наличие в ядре более 5 сегментов.

Кариопикноз - уплотнение хроматина ядра, оно становится темным, бесструктурным, компактным.

Кариорексис - распад ядра на мелкие части. Цитолиз (лизис) клетки: ядро теряет свою структуру, контуры его стираются, цитоплазма часто отсутствует.

Клазматоз - фрагментация цитоплазмы.

Аномалиями нейтрофилов также являются вакуолизация цитоплазмы и ядра, голубоватая пятнистость цитоплазмы (тельца Князькова-Делгу, токсическая (токсигенная) зернистость нейтрофилов (гипертрофированные азурофильные гранулы). Все эти морфологические аномалии коррелируют со степенью выраженности бактериемии и нарушением функции гранулоцитов.

ЛЕЙКОПЕНИЯ

Лейкопения - снижение содержания лейкоцитов в крови менее $4,5 \times 10^9/\text{л}$. Возникает обычно как следствие нейтропении, абсолютное содержание нейтрофилов в крови составляет менее $2,0 \times 10^9/\text{л}$. Падение абсолютного числа нейтрофилов ниже $0,5 \times 10^9/\text{л}$ обозначают как агранулоцитоз. Лейкопения - показатель депрессии костномозгового нейтропоэза, тяжести патологического процесса и низкой реактивности организма. Нейтропения при пониженном содержании лейкоцитов, палочкоядерном сдвиге, токсигенной зернистости свидетельствует о резком истощении костномозгового гранулоцитарного резерва и является крайне неблагоприятным прогностическим признаком. Выраженная нейтропения всегда связана с повышенным риском развития инфекции.

Нейтропения может иметь различный генез. Она возникает вследствие:

- снижения продукции нейтрофилов в костном мозге;
- истощения гранулоцитарного костномозгового резерва;
- замедления выхода нейтрофильных гранулоцитов из костного мозга;
- повышенной деструкции нейтрофилов в сосудистом русле и

уменьшения времени их циркуляции;

- перераспределения нейтрофильных гранулоцитов в сосудистом русле.

Снижение продукции нейтрофилов в костном мозге является причиной нейтропении при апластических анемиях - гетерогенных по своему происхождению и механизмам развития аплазий кроветворения, для которых ведущими в патогенезе является поражение стволовых клеток, повышение супрессорной активности Т-лимфоцитов в отношении гемопоэза и повышенная способность клеток к апоптозу. Характерными изменениями в лейкоцитарной формуле при апластических состояниях служат абсолютная нейтропения и относительный лимфоцитоз. Снижение продукции нейтрофилов может быть обусловлено уменьшением плацдарма гранулоцитопоэза из-за вытеснения гемопоэтических клеток опухолевыми клетками при остром лейкозе, фиброзной тканью при миелофиброзе или метастазировании злокачественных новообразований в костный мозг. Угнетение нейтрофильного гранулоцитопоэза наблюдается при циклической нейтропении как следствие дефекта продукции КСФ, врожденных нейтропений (синдром Костманна, синдром Чедиака-Хигаши и др.). Клинически нейтропения сочетается с резкой утомляемостью, гипотоническими состояниями, нарушениями сна, голоданием, алиментарной дистрофией. Это, так называемые, функциональные лейкопении.

В основе ряда нейтропений может иметь место усиленная внутрикостномозговая деструкция нейтрофилов - неэффективный гранулоцитопоэз. Классическим примером его является нейтропения при В₁₂-фолиеводефицитной анемии, миелодиспластическом синдроме.

Нарушение выхода зрелых нейтрофилов из костного мозга в кровь

является причиной нейтропении при синдроме «ленивых лейкоцитов», в основе которого лежит снижение хемотаксиса клеток, обусловленное дефектом мембраны нейтрофилов.

Повышенная деструкция нейтрофилов может наблюдаться при различных состояниях, не связанных с угнетением гранулоцитопоеза. Такие состояния могут развиваться после переливания крови, содержащей антитела к нейтрофилам. Трансплацентарный переход антинейтрофильных IgG от матери к плоду может быть причиной аутоиммунной нейтропении новорожденных. Одной из причин развития нейтропении и агранулоцитоза является реакция на введение лекарственных препаратов (аналгетики, противовоспалительные, сердечно-сосудистые, противомаларийные препараты, антибиотики, цитостатики, антидепрессанты и др.). Лекарственные препараты (пенициллины, сульфаниламиды, цефалоспорины и др.) могут оказывать прямое токсическое действие на процессы пролиферации гранулоцитов в костном мозге, вызывая нейтропению или индуцировать продукцию аутоиммунных антител против клеток-предшественников нейтрофилов. Фармакологические препараты могут снижать не только количество нейтрофилов в периферической крови, но и вызывать их дисфункцию - угнетение хемотаксиса, фагоцитоза, внутриклеточного киллинга. Лейкопения с нейтропенией и наличием антинейтрофильных цитоплазматических антител часто встречается при гранулематозе Вегенера, язвенном колите. Ускоренная деструкция нейтрофилов имеет место при спленомегалии. Лейкопения с нейтропенией сопровождается аутоиммунные заболевания (ревматоидный артрит, синдром Шегрена, системная красная волчанка, синдром Фелти).

Кратковременная перераспределительная нейтропения возможна при шоковых состояниях, заболеваниях, сопровождающихся выбросом гистамина, при которых наблюдается переход нейтрофилов из циркулирующего пула в маргинальный.

Различные вирусные инфекции могут сопровождаться развитием

лейкопении с нейтропенией (грипп, острый и хронический вирусный гепатит, СПИД, корь, ветряная оспа, краснуха, геморрагическая лихорадка). Редко лейкопения наблюдается при инфекционном мононуклеозе. Лейкопения с нейтропенией без левого сдвига возможна при хронических заболеваниях желудочно-кишечного тракта (холецистит, холангит, гастрит, язвенная болезнь), тяжелых атипичных формах гнойно-септических и воспалительных процессов (хронический сепсис), инфекциях (брюшной тиф, висцеральный лейшманиоз). Нейтропения может появляться в результате генерализации инфекции, например, милиарном туберкулезе.

Нарушение функциональной активности нейтрофилов наблюдается при воздействии вирусов, бактерий, грибов, которые угнетают хемотаксис, эндоцитоз, активность ферментов, формирование фаголизосомы, респираторный взрыв и дегрануляцию. Количественные изменения лейкоцитов могут сопровождаться морфологическими аномалиями нейтрофилов в виде асинхронности созревания ядра и цитоплазмы, нарушения гранулогенеза, псевдопельгеризации, дефицита ферментативной активности и снижения функциональной способности нейтрофилов.

Причины и механизмы развития нейтропений представлены в табл. 2.

Таблица №2. Клинико диагностическое значение нейтропении

Лейкопении	Патогенетические механизмы	Заболевания и состояния
Функциональные	Недостаточное образование нейтрофилов вследствие угнетающего воздействия бактериальных токсинов на нейтропоэз, в результате активации макрофагов при вирусных и риккетсиозных инфекциях	Брюшной тиф, паратифы, бруцеллез, туляремия, подострый септический миокардит, хронический сепсис, милиарный туберкулез, тяжелое течение инфекционных заболеваний, ОРВИ, грипп, вирусный гепатит, цирроз печени, сыпной тиф и др.
	Ареактивное состояние	Гипотоническое состояние, голодание, длительное недосыпание и стресс, алиментарная дистрофия
	Перераспределение нейтрофилов в органах	Анафилактический шок, синдром Фелти
	Повышенное разрушение нейтрофилов иммунного генеза: гетероиммунные	Гиперчувствительность к лекарственным препаратам
	аутоиммунные	Системная красная волчанка, ревматоидный артрит, лимфопролиферативные заболевания
	изоиммунные	У новорожденных
Органические	Недостаточность костномозгового кроветворения	Апластическая анемия
	Недостаточность нейтропоэза при лейкозах	Острые лейкозы и хронические лимфолейкозы, МДС
	Дефицит витамина В ₁₂ и фолиевой кислоты	Мегалобластные анемии
	Наследственные формы	Наследственная доброкачественная нейтропения, циклическая нейтропения, синдром Чедиака-Хигаши
	Миелотоксические экзогенные факторы: цитостатики, ионизирующая радиация, химические агенты	Лучевая болезнь, агранулоцитоз, гипо- и апластические состояния

Наследственные нарушения морфологии лейкоцитов

Среди наследственных нарушений морфологии лейкоцитов наиболее известна аномалия Пельгера-Хюэта - аутосомно-доминантно наследуемая аномалия гранулоцитов, характеризующаяся нарушением сегментации ядер. В основном встречаются гетерозиготы, гомозиготы - исключительно редко. Хемотаксис, фагоцитарная и бактерицидная активность, как и активность гранулоассоциированных ферментов (миелопероксидаза, кислая фосфатаза, лизоцим, β -глюкуронидаза) нейтрофилов, нормальные. Не изменена также степень редукции нитросинего тетразолия. Предполагают, что аномалия ограничивается только морфологическими изменениями сегментоядерных нейтрофилов вследствие наследственного дефекта генетического контроля постмитотической стадии созревания гранулоцитов. Аномалия диагностируется случайно, клиническая симптоматика отсутствует. Течение инфекционных заболеваний обычное. В крови у носителей аномалии определяются нейтрофилы с нарушенной сегментацией ядер. Ядерный хроматин грубоглыбчатый, пикнотичный, т. е. процесс конденсации хроматина в них закончен. Число сегментов не превышает двух. Обнаруживаются ядра с намечающейся перетяжкой в форме пенсне, гири, палочки. Реже бывают двух-, трехядерные клетки. Пригомозиготных формах преобладают круглоядерные гранулоциты, напоминающие миелоциты, но с конденсированным хроматином. Часть нейтрофилов содержит крупную, обильную зернистость. Цитоплазма в нейтрофилах обычная, свойственная зрелым нейтрофилам.

Аналогичные изменения наблюдаются у эозинофилов. Наследственные формы следует отличать от приобретенной «псевдопельгеризации», которая может наблюдаться при системной красной волчанке, сублейкемическом миелозе, хроническом миелолейкозе, остром миелобластном лейкозе, инфекционных заболеваниях, миелодиспластических синдромах. Однако, как правило, они носят преходящий характер и исчезают при лечении.

ЭОЗИНОФИЛИЯ

Эозинофилия - увеличение количества эозинофилов в крови более $0,4 \times 10^9/\text{л}$. Эозинофил является основной эффекторной клеткой в развитии инфекционных, паразитарных, аллергических, аутоиммунных и онкологических заболеваний.

Эозинофильные реакции сопровождают ответ на активирующее действие многих факторов: гистамин (фактор хемотаксиса эозинофилов), IgE, C3a, C5a, ИЛ-5, ИЛ-2, лимфоцитарный хемотаксический фактор, ИЛ-8 и другие. Эозинофилия - частый симптом аллергических заболеваний различной локализации (бронхиальная астма, атопические экземы, сенная лихорадка, пищевая аллергия). Активированные эозинофилы продуцируют большое количество провоспалительных медиаторов, являющихся токсичными для тканей, и поддерживают хроническое воспаление. Хорошо известна взаимосвязь эозинофилии с гельминтозами. Хемотаксис эозинофилов и распознавание ими паразитов осуществляется за счет факторов, продуцируемых клетками воспаления, и продуктов жизнедеятельности паразитов. Эозинофилия обнаруживается при инфекционных заболеваниях в период развернутой клинической картины - скарлатина, инфекционный мононуклеоз, гонорея. При всех воспалительных заболеваниях, аутоиммунных процессах, злокачественных новообразованиях (в частности лимфогранулематоз), хронических инфекциях (туберкулез), кожных заболеваниях (экзема, псориаз, пузырчатка, герпес, микозы), к которым присоединяется аллергический компонент, определяемый гиперпродукцией IgE, наблюдается эозинофилия (табл. 3).

Клинико-диагностическое значение эозинофилии

Патогенетические механизмы	Заболевания
Инвазия паразитами	Аскаридоз, трихинеллез, токсакароз, эхинококкоз, шистосоматоз, филяриатоз, стронгилоидоз, описторхоз, анкилостомидоз, лямблиоз
Опухолевая пролиферация (повышенная продукция ИЛ-5)	Гиперэозинофильный синдром, лимфогранулематоз, острые и хронические лейкозы, лимфомы, злокачественные новообразования других локализаций, сопровождающиеся метастазами и некрозом
Сенсибилизация организма	Лекарственная аллергия, бронхиальная астма, аллергические дерматиты, инфекционный эозинофилез, аллергический ринит
Иммунодефициты	Синдром Вискотта-Олдрича и др.
Патология соединительной ткани	Узелковый периартериит, ревматоидный артрит, системная склеродермия, эозинофильный фасциит
Инфекции	Туберкулез, хламидийная пневмония
Интерстициальные и другие заболевания легких	Саркоидоз, гистиоцитоз из клеток Лангерганса, эозинофильный плеврит, легочный эозинофильный инфильтрат (болезнь Леффлера), хроническая эозинофильная пневмония

Обнаруживается эозинофилия также в фазе выздоровления от инфекционных заболеваний. Эозинофилия любого генеза может осложняться васкулитом, эндокардитом (синдром Леффлера) и тромбозом, вызывая изменения гемостаза через калликреин-кининовую систему.

Высокая эозинофилия может иметь место при применении антибиотиков, сульфаниламидных препаратов, аспирина, эуфиллина, преднизолона и др.

ЭОЗИНОПЕНИЯ

Эозинопения - снижение количества эозинофилов в крови менее $0,2 \times 10^9/\text{л}$ или анэозинофилия - отсутствие эозинофилов в крови - встречается на первом этапе воспалительного процесса, при тяжелых гнойных инфекциях, шоке, стрессе, эклампсии и в родах, интоксикациях различными химическими соединениями, тяжелыми металлами.

Оценка динамики изменения количества эозинофилов в течение воспалительного процесса имеет прогностическое значение. Эозинопения соответствует началу воспаления, восстановление количества эозинофилов или эозинофилия - началу выздоровления. Однако ряд инфекционных и других заболеваний с высоким уровнем IgE характеризуются эозинофилией после окончания воспалительного процесса, что указывает на незаконченность иммунной реакции с ее аллергическим компонентом. В то же время снижение числа эозинофилов в активной фазе заболевания зачастую свидетельствует о тяжести процесса и является неблагоприятным признаком. В целом изменение количества эозинофилов в периферической крови является результатом дисбаланса процессов продукции клеток в костном мозге, их миграции и распада в тканях.

БАЗОФИЛИЯ

Базофилия - увеличение количества базофилов в крови (более $0,1 \times 10^9/\text{л}$).

Базофилы и тучные клетки участвуют в клеточных воспалительных реакциях замедленного типа в коже и других тканях, вызывая гиперемию, формирование экссудата, повышенную проницаемость капилляров. Эти клетки служат основным источником медиаторов, запускающих анафилактическую реакцию гиперчувствительности немедленного типа. Пероксидаза эозинофилов вызывает дегрануляцию базофилов и выделение ими в кровь биологически активных веществ, в том числе фактора хемотаксиса эозинофилов, поэтому

эозинофилы встречаются везде, где имеется увеличение числа тучных клеток или повышение их активности. Усиленная базофильная инфильтрация может происходить в секретах дыхательных путей при аллергии, вызываемой антигенами окружающей среды, а также в почках при хроническом интерстициальном нефрите и отторжении трансплантата, при контактном дерматите, хроническом язвенном колите. Базофилия может наблюдаться при аллергических заболеваниях, в ранней фазе ревматизма, при хроническом миелоидном лейкозе, миелофиброзе, эритремии. Тучноклеточный лейкоз сопровождается увеличением тучных клеток в костном мозге и крови.

ЛИМФОЦИТОЗ

Лимфоцитоз - относительное увеличение количества лимфоцитов (более 37%) или в абсолютных значениях (более $3,0 \times 10^9/\text{л}$). Абсолютный или относительный лимфоцитоз сопровождает большинство вирусных заболеваний (инфекционный лимфоцитоз, краснуха, инфекционный мононуклеоз, ветряная оспа, полиомиелит, инфекционный гепатит, паротит, грипп и т. д.) (табл. 4).

Клинико-диагностическое значение лимфоцитоза.

Лимфоцитоз	Этиологический фактор	Заболевания
Реактивный (поликлональный)	Вирусы	Инфекционный мононуклеоз, инфекционный лимфоцитоз, ветряная оспа, коклюш, корь, краснуха, острый и хронический вирусный гепатит, цитомегаловирусная инфекция, ВИЧ и др.
	Бактерии	Хронические бактериальные инфекции, сопровождающиеся образованием эпителиодноклеточной гранулемы (туберкулез, сифилис, бруцеллез и др.)
	Паразитарный антиген	Токсоплазмоз
	Иммунопатологический процесс	Аутоиммунные нейтропении
Опухолевый (моноклональный)	Опухолевая пролиферация	Лимфопролиферативные заболевания

Лимфоцитоз может наблюдаться при протозойной инвазии (токсоплазмоз). При выше перечисленных инфекциях большинство лимфоцитов представлено широкоцитоплазменными клетками, встречаются иммунобласты, лимфоциты с базофильной цитоплазмой, плазмоциты.

Относительный лимфоцитоз с нейтропенией характерен для оспы, кори, при этом может сохраняться нормальное количество лейкоцитов. Заболевания соединительной ткани (ревматизм, ревматоидный артрит, системная красная

волчанка, склеродермия и др.) сопровождаются лимфоцитозом, среди лимфоцитов встречаются широкоцитоплазменные и плазматизированные клетки, увеличено количество плазмоцитов.

Инфекционный мононуклеоз вызывается вирусом Эпштейна-Барр (вирус семейства герпеса), который инфицирует В-лимфоциты через поверхностные антигены CD21, вызывая их пролиферацию. На вирусинфицированные клетки реагируют цитотоксические Т-лимфоциты (CD8+) и НК-клетки, которые в значительном количестве циркулируют в крови и находятся в лимфоидной ткани в виде широкоцитоплазменных лимфоцитов. Заболевание характеризуется высокой температурой, ангиной, лимфаденопатией, спленомегалией и гепатомегалией. Преимущественно увеличиваются заднешейные, затылочные, реже подмышечные лимфатические узлы, болезненные при пальпации. В периферической крови наблюдается чаще лейкоцитоз (до $20 \times 10^9/\text{л}$ и более), абсолютное или относительное снижение нейтрофилов, абсолютный лимфоцитоз (атипичные мононуклеары), плазматические клетки.

Атипичные мононуклеары имеют разнообразную морфологию. Это могут быть клетки с округлыми, неправильными, полиморфными ядрами, не редко похожие на ядра моноцитов. Структура хроматина стертая, лишена грубой глыбчатости, свойственной зрелым лимфоцитам. Цитоплазма клеток может быть различной по объему и окраске: широкая, голубого цвета с краевой базофилией, либо узкая с резкой базофилией.

Среди атипичных мононуклеаров могут встречаться иммунобласты - клетки крупных размеров, с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, центрально расположенным гиперхромным ядром, гомогенной структурой хроматина и 1-2 нуклеолами. Процент атипичных мононуклеаров может варьировать и достигать 60-80% в разгар заболевания с постепенным снижением по мере выздоровления. Для инфекционного мононуклеоза в период реконвалесценции характерна эозинофилия и моноцитоз, повышение СОЭ.

Заболевание длится 3-4 недели с длительным астеническим синдромом после выздоровления.

ЛИМФОЦИТОПЕНИЯ

Лимфоцитопения - содержание лимфоцитов менее $1,0 \times 10^9/\text{л}$, наблюдается при острых инфекционных заболеваниях, милиарном туберкулезе (висцеральная форма), системной красной волчанке, почечной недостаточности, в терминальной стадии злокачественных новообразований, лимфогранулематозе, как ранний признак острой лучевой болезни, в терминальной стадии СПИД, вторичных иммунодефицитах. У детей и подростков лимфоцитопения (менее $1,0 \times 10^9/\text{л}$) возможна в результате алергизации организма и при наследственном иммунодефиците.

МОНОЦИТОЗ

Моноцитоз - количество моноцитов более $0,7 \times 10^9/\text{л}$. Моноцитопоз в костном мозге представлен пролиферирующими клетками-предшественниками и не имеет резервного пула зрелых клеток (в отличие от гранулоцитопоза). Поэтому причиной моноцитоза можно считать ускоренное созревание и переход клеток из костного мозга в кровь. Моноцитоз возможен при туберкулезе, бруцеллезе, малярии, подостром септическом эндокардите, саркоидозе, лимфогранулематозе, сифилисе, хроническом сепсисе, коллагенозах и др. Абсолютный моноцитоз нередко сопутствует раку легких и надпочечников.

Моноцитопения - снижение содержания моноцитов менее $0,09 \times 10^9/\text{л}$ - встречается при гипоплазии кроветворения.

ЭРИТРОЦИТОЗ

Эритроцитоз - увеличение количества эритроцитов в крови (более $5,0 \times 10^{12}/\text{л}$), может быть реактивный (вторичный или симптоматический) и опухолевый (первичный). Реактивный эритроцитоз развивается вследствие гиперпродукции эритропоэтина в ответ на тканевую гипоксию, причины

которой могут быть различные («высотная» болезнь, хронические обструктивные заболевания легких, врожденные пороки сердца); опухоли (рак почек, надпочечников, гепатома, аденома и киста гипофиза); поликистоз почек, стеноз почечной артерии, гидронефроз и т.д. Эритроцитозы вторичные (относительные) развиваются у лиц с избыточной массой тела, артериальной гипертонией и неврастениями, при постоянном приеме диуретиков; в постинфарктном периоде у больных ИБС; при повышении в крови уровня окиси углерода у курильщиков, длительной адинамии, в частности у космонавтов. Эритроцитоз, как правило, не достигает очень высоких цифр и сопровождается небольшим ретикулоцитозом. Морфология эритроцитов при реактивном эритроцитозе практически не изменяется. У лиц, находящихся в условиях высокогорья или длительного периода адинамии, возможно появление гипохромии, небольшого анизоцитоза и мишеневидных эритроцитов.

Эритроцитоз опухолевого генеза - эритремия, сопровождается увеличением количества эритроцитов, гематокрита, вязкости крови, нарушением реологии крови, низкими показателями СОЭ.

Наследственные эритроцитозы - группа гетерогенных заболеваний, обусловленных генетически закрепленными дефектами на разных стадиях гуморальной регуляции эритропоэза и сопровождающаяся повышением количества эритроцитов в крови. Наследственные эритроцитозы характеризуются биохимическим полиморфизмом. Наиболее частой причиной их являются мутации в молекулах гемоглобина, повышающее его сродство к кислороду, реже аномально высокая концентрация 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах.

ЭРИТРОЦИТОПЕНИЯ

Эритроцитопения - снижение числа эритроцитов (менее $4,0 \times 10^{12}/л$) в единице объема крови. Эритроцитопения может развиваться вследствие: кровопотери, нарушенного кроветворения (апластические анемии),

повышенного гемолиза эритроцитов (эритроцитопатии, энзимопатии, гемоглобинопатии); радиационного облучения; заболеваний печени, почек; гиперспленического синдрома; дефицита гемопоэтических факторов (железо, витамин В₁₂, фолиевая кислота); гипергидратации при увеличении объема циркулирующей плазмы; инфекциях, в первую очередь хронических и, в частности, при туберкулезе. Эритроцитопения часто сопровождается неэффективным эритропоезом, который проявляется повышенным содержанием и дисплазией эритрокариоцитов в костном мозге, накоплением в них ШИК-положительного материала и гранул железа, повышенным апоптозом, ретикулоцитопенией.

Изменение морфологии эритроцитов – формы, размера, насыщения гемоглобином, свойственно различным видам анемии, но не является абсолютно специфичным для какой-либо формы. Появление эритроцитов с более широкой неокрашенной центральной частью - *гипохромия* - обусловлена снижением концентрации гемоглобина в эритроците. Равномерная интенсивная окраска эритроцитов - *гиперхромия* - связана с толщиной и повышенным насыщением эритроцитов гемоглобином. *Анизохромия* - присутствие в мазках крови гипо-и гиперхромных эритроцитов. *Полихроматофилия* - серая окраска эритроцитов, обусловлена восприятием клетками кислых и основных красителей. *Анизоцитоз* - изменение размера эритроцитов (микро-, макро-, мегалоцит, шизоциты - мелкие фрагменты эритроцитов). *Пойкилоцитоз* - изменение формы эритроцитов (овалоцит, акантоцит, стоматоцит, эхиноцит, мишеневидные и серповидные клетки, сфероцит, дакриоцит и др.). Патологические включения в эритроцитах могут выявляться в виде базофильной пунктации, телец Жолли, колец Кебота, телец Гейнца.

Наиболее характерные изменения морфологии эритроцитов возможны при следующих состояниях: *дефиците железа* (анизоцитоз, микро-и макроцитоз, гипохромия, анизохромия); *дефиците фолиевой кислоты и/или*

витамина В₁₂ (макроциты, мегалоциты, мегалобласты, гиперхромия); *поражениях паренхимы печени* (макроцитоз, мишеневидные эритроциты, гиперхромия); *эритроцитопатиях* (микросфероцитоз, овалоцитоз, стоматоцитоз, акантоцитоз и др.); *гемоглобинопатиях* (HbF, HbC, HbH, HbS и др.) - мишеневидные, серповидноклеточные эритроциты, тельца Гейнца; *энзимопатиях* (дефицит ферментов эритроцитов) - макроцитоз, гиперхромия; *иммунных и аутоиммунных гемолитических анемиях* (микро-, макро-, мегало-, сфероциты); *метастазах рака в костный мозг* (макро-, мегалоциты, гиперхромия); лейкозах.

Патологические эритроциты могут возникать в результате механического воздействия на них, например при АИК или протезированных клапанов, иммунных и аутоиммунных антител, осмотических нарушений проницаемости мембраны, кровопотери, гипоксии, ожога и др.

Ретикулоциты являются показателем активности эритропоэза. *Ретикулоцитоз* наблюдается при постгеморрагической анемии, гемолизе, терапии эритропоэтином, витамином В₁₂ и фолиевой кислотой и других состояниях. Для проведения допингового контроля у спортсменов предлагается использовать показатели гематокрита и ретикулоцитов. Подозрением на прием ЭПО является ретикулоцитоз более 2,4%, гематокрит более 47%, гемоглобин более 160 г/л. Наиболее чувствительным индикатором успешной трансплантации костного мозга считается увеличение фракции незрелых ретикулоцитов более чем на 20%, которое часто предшествует повышению количества нейтрофилов.

Ретикулоцитопения имеет место при апластической анемии, парциальной красноклеточной аплазии, метастазах рака в костный мозг, лейкозах, снижении уровня ЭПО, неэффективном эритропоэзе, миелодиспластическом синдроме.

ТРОМБОЦИТОЗ

Тромбоцитоз - увеличение количества тромбоцитов более 320×10^9 /л.

Различают реактивные и опухолевые тромбоцитозы.

Реактивные тромбоцитозы носят временный характер и вызваны активацией кроветворения. Они могут наблюдаться после спленэктомии в течение 3-6 месяцев, редко более продолжительное время, особенно в тех случаях, когда показанием к удалению селезенки не была тромбоцитопения. Возможно повышение количества тромбоцитов после кровопотери и острого гемолиза, при злокачественных новообразованиях.

Опухолевый генез тромбоцитозы имеют при миелоидных лейкозах. Наиболее часто тромбоцитоз наблюдается при миелофиброзе, иногда при эритремии, редко и непродолжительное время бывает в начальном периоде хронического миелолейкоза. Увеличение числа тромбоцитов может быть до нескольких миллионов (гипертромбоцитоз) при остром и хроническом мегариоцитарных лейкозах. Большая масса клеток приводит к микроциркуляторным нарушениям в результате свертывания крови с последующим развитием геморрагического синдрома. Гипертромбоцитоз, который сопровождается геморрагическим синдромом, носит название геморрагическая тромбоцитемия.

Синдром геморрагической тромбоцитемии (СГТ) развивается при лейкозах миелоидной ткани, чаще при миелофиброзе (сублейкемический миелоз), характеризуется гипертромбоцитозом, который может достигать 1-3 млн. в 1 мкл крови, редко больше. Отмечается анизоцитоз, гигантские, атипичные и незрелые формы тромбоцитов. Возможен и панцитоз. Клиническая и гемостатическая картина при СГТ разнообразна: заболевание может протекать без кровотечений и тромбозов или только с тромботическими или геморрагическими проявлениями. Наклонность к тромбозу при СГТ обусловлена гипертромбоцитозом, который сопровождается гибелью тромбоцитов в кровотоке, освобождением тромбоцитарных факторов и активацией протромбинаобразования. Повышение активности протромбиназы способствует тромбиногенезу с последующим превращением

фибриногена в фибрин. Вместе с тем одновременно усиливается антикоагулянтная активность и фибринолиз. От взаимодействия этих систем зависит развитие, как тромбоза, так и кровоточивости, а также клиническая картина заболевания. Кровоточивость при СГТ проявляется обширными кровоизлияниями и кровотечениями из слизистых оболочек и, по-видимому, имеет различный генез: в результате разрыва затромбированного сосуда, действия ингибиторов тромбина, наличия коагулопатии потребления и чрезмерного неадекватного фибринолиза. Вместе с тем фибринолиз при СГТ может быть и снижен. Развитие СГТ возможно при диффузном карциноматозе костей, после спленэктомии.

ТРОМБОЦИТОПЕНИЯ

Тромбоцитопении представляют собой заболевания или синдромы, при которых количество тромбоцитов снижено менее $180 \times 10^9/\text{л}$. Тромбоцитопении являются результатом недостаточного образования, повышенного разрушения или потребления тромбоцитов. Различают наследственные и приобретенные тромбоцитопении.

Приобретенные тромбоцитопении могут наблюдаться при гиперспленизме, инфекционных заболеваниях, хронической интоксикации любого генеза, гипер-и метапластических поражениях костного мозга, лучевой и цитостатической терапии и сопровождаются геморрагическим синдромом. Среди приобретенных тромбоцитопений наиболее часто встречаются иммунные и аутоиммунные формы, при которых тромбоциты разрушаются антителами.

Выделяют несколько форм тромбоцитопений.

Иммунные тромбоцитопении - это группа заболеваний, при которых снижение в крови числа тромбоцитов обусловлено продукцией антитромбоцитарных ауто-или аллоантител и ускоренным разрушением сенсibilизированных тромбоцитов в ретикулоэндотелиальной системе. В зависимости от механизма выработки антитромбоцитарных антител различают

несколько форм иммунных тромбоцитопений. Наиболее известное и распространенное заболевание этой группы - *идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура*, представляющая собой аутоиммунное заболевание, диагностируемое как аутоиммунная тромбоцитопения. Антитела при аутоиммунной тромбоцитопении вырабатываются против неизмененных тромбоцитарных антигенов в результате нарушения толерантности иммунной системы больного. Чаще всего антитела направлены против главных и наиболее иммуногенных белков - комплекса мембранных гликопротеинов (ГП) Пб-Ша и ГП Ib. Развитие тромбоцитопении по аутоиммунному механизму может наблюдаться при таких процессах, как системная красная волчанка и лимфопролиферативных заболеваниях.

В отдельную группу выделяют гаптеновые (гетероиммунные) тромбоцитопении. При этой патологии аутоантитела вырабатываются против измененных или чужеродных антигенных структур на поверхности тромбоцитов, появляющихся, например, в результате воздействия лекарств или вирусов.

При неонатальной аллоиммунной тромбоцитопенической пурпуре антитела синтезируются в результате иммунизации матери аллоантигенными детерминантами, содержащимися на тромбоцитах отца и ребенка. Аллоантитела вызывают развитие тромбоцитопении у плода, которая сохраняется 2-3 недели после родов.

Дифференциальная диагностика иммунных тромбоцитопений должна быть направлена в первую очередь на доказательство ее иммунной природы и исключение диагнозов тромбоцитопении костномозгового генеза со снижением продукции тромбоцитов в результате угнетения мегакариоцитов, наследственных тромбоцитопений, ассоциированных с тромбоцитопатиями.

Идиопатические тромбоцитопении - этиологический фактор остается неизвестным. Характерно увеличение количества мегакариоцитов, нормальная скорость продукции тромбоцитов и резко укороченная продолжительность их

жизни. Для определения времени жизни тромбоцитов в кровотоке используется определение времени циркуляции радиоактивно меченных тромбоцитов (^{51}Cr). Это состояние клинически часто проявляется как тромботическая тромбоцитопеническая пурпура и гемоуремический синдром.

ТРОМБОЦИТОПЕНИЯ, ВЫЗВАННАЯ ГЕПАРИНОМ

Тромбоцитопения развивается примерно у 5% больных, получавших бычий гепарин, и 1% больных, получавших свиной гепарин. У больных с гепариновой тромбоцитопенией прогрессивно увеличивается риск тромбоза, возникают угрожающие жизни артериальные тромбы (рикошетные тромбозы). Патогенез гепарин-индуцированной тромбоцитопении (ГИТ) связан с действием патогенных гепарин-зависимых IgG-антител (ГИТ-IgG). Тромбоцитарный фактор 4 является гепарин-связывающим белком. На поверхности тромбоцитов формируется мультимолекулярный комплекс между ГИТ-IgG и гепарин/тромбоцитарным фактором 4.

Мультимолекулярный комплекс связывается со специфическим рецептором (FcγRIIA) на тромбоцитарной мембране. Предрасположенность к этому осложнению связана с мутацией в FcγRIIA гене. В результате в молекуле FcγRIIA-рецептора происходит замена Arg131→His131, и пациенты с такой мутацией становятся склонны к развитию гепарин-индуцированных рикошетных тромбозов. В будущем, по-видимому, молекулярно-генетическая диагностика позволит идентифицировать пациентов с повышенным риском развития гепариновой тромбоцитопении и рикошетных гепариновых тромбозов.

Покрытые IgG антителами тромбоциты активно удаляются из системы циркуляции макрофагами. ГИТ-IgG способны повреждать эндотелиальные клетки. Это связано с тем, что гепарансульфат гликокаликса эндотелия, как структурный аналог гепарина, может вступать в качестве антигена во взаимодействие с ГИТ-IgG. Затем возможно развитие иммунных реакций на поверхности эндотелия, адгезия в этих зонах макрофагов и развитие

пристеночного тромба.

Следует отметить, что низкомолекулярные гепарины (фраксипарин, фраксипарин, ловенокс, клексан) не вызывают тромбоцитопении, вероятно из-за меньших, чем требуется для образования иммунного комплекса, размеров молекул этих препаратов.

Тромбоцитопениям, независимо от патогенеза, свойственны паренхиматозные кровотечения из мелких сосудов капиллярного и прекапиллярного типа, которые обусловлены низким числом тромбоцитов, изменением их структуры и, как следствие, проницаемости стенки сосудов. Тромбоцитопения может быть латентной или сопровождаться кровоточивостью, которая обычно возникает при довольно низких количествах тромбоцитов ($50 \times 10^9/\text{л}$ и ниже). Геморрагический синдром при умеренной тромбоцитопении предполагает наличие сопутствующих наследственных или приобретенных нарушений функциональной активности тромбоцитов.

В диагностике тромбоцитопений практическое значение имеет главным образом количество тромбоцитов, снижение которых сопровождается удлинением времени кровотечения. Количество тромбоцитов ниже $50-30 \times 10^9/\text{л}$ приводит к нарушению свертывания крови, ретракции кровяного сгустка и проницаемости сосудистой стенки.

Наследственная тромбоцитопения характеризуется увеличением количества мегакариоцитов при сохранении у них признаков отшнуровки тромбоцитов, так что число деятельных мегакариоцитов длительное время не уменьшается. При иммунных и аутоиммунных формах тромбоцитопении количество мегакариоцитов и их функциональное состояние могут значительно варьировать. Изменение морфологии тромбоцитов и показателей гемостаза при тромбоцитопениях независимо от генеза довольно однотипны. Отмечается анизоцитоз тромбоцитов, атипичные и гигантские формы, скудная азурофильная зернистость или полное отсутствие грануломера, базофилия цитоплазмы, так называемые «голубые пластинки».

Время кровотечения удлинено до 20-30 мин и больше. Ретракция кровяного сгустка недостаточная или отсутствует. Дефицит тромбоцитов (недостаток ф.3) вызывает медленное образование тромбопластины крови. Для диагностики иммунных тромбоцитопений используют исследование антитромбоцитарных сывороточных антител, продолжительности жизни тромбоцитов, определение аллотипов тромбоцитарных антител.

ТРОМБОЦИТОПАТИИ

Тромбоцитопатии представляют собой группу заболеваний и синдромов, характеризующихся различными нарушениями: структуры мембраны клетки, обмена аденилнуклеотидов, серотонина, Са, дефицитом белка, чувствительного к тромбину и др. Тромбоциты при этой группе заболеваний отличаются функциональной неполноценностью. Возможны морфологические аномалии, такие как анизоцитоз, так называемые «серые» пластинки и другие. Количество тромбоцитов может оставаться нормальным или снижаться. Патогенез наследственных тромбоцитопатий изучен недостаточно. Укорочение жизни тромбоцитов объясняют дефектом структуры их мембраны или энергетикой клетки, вызванной дефицитом ферментов. Заболевания сопровождаются нарушением микроциркуляции и петехиально-пятнистым типом кровоточивости.

Дифференциальная диагностика этих форм очень затруднена, поскольку основным и чуть ли не единственным подтверждением наследственной патологии может служить наличие семейного анамнеза, а показателем аутоиммунного генеза - обнаружение антитромбоцитарных антител.

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛЕТОК КРОВИ

Изменения клеточного состава периферической крови наблюдаются как при патологии, так и при различных физиологических состояниях организма. На показатели крови могут оказать влияние физическая и эмоциональная нагрузка, сезонные, климатические, метеорологические условия, время суток, прием пищи, курение и т. д. При интерпретации результатов необходимо

учитывать такие данные, как возраст, пол, активность пациента и положение его тела в момент взятия крови. Показатели гемоглобина и гематокрита у больных в положении лежа снижены примерно на 6%.

Для подсчета и анализа клеток крови используют ручные микроскопические методы и гематологические счетчики разного уровня автоматизации. За последние 15-20 лет произошло существенное развитие технологии и аппаратуры для автоматического исследования клеток на принципе проточной цитометрии. Во многих странах мира автоматический анализ крови почти полностью заменил ручные и полуавтоматические методы.

ВЗЯТИЕ И ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

По данным ряда авторов до 70% лабораторных ошибок связаны с преаналитическим этапом. Контроль преаналитических факторов в гематологических исследованиях является ключевым для обеспечения качественных результатов тестов. Такие преаналитические характеристики, как взятие пробы, транспортировка и хранение образца, интерферирующие вещества, а также факторы, связанные с подготовкой пациента, могут привести к неверным или неточным результатам анализов и, следовательно, к постановке ошибочного диагноза, что может повлечь за собой риск для здоровья пациента. Путем снижения числа ошибок на любой стадии преаналитического этапа лечебное учреждение может существенно улучшить качество гематологических анализов, снизить количество повторных проб и сократить расходы рабочего времени и средств, выделяемых на обследование пациентов.

Снижение до минимума возможных ошибок и обеспечение высокого качества гематологических исследований возможно при стандартизации преаналитического и аналитического этапов работы.

ВЗЯТИЕ КРОВИ

На точность и правильность результатов оказывает влияние техника взятия крови, используемые при этом инструменты (иглы, скарификаторы и

др.), а также пробирки, в которые берется, а в последующем хранится и транспортируется кровь.

Стандартизация преаналитического этапа за счет использования стандартизованных расходных материалов для взятия, хранения и транспортировки биопроб, стандартных реактивов и диагностических систем позволяют существенно повысить достоверность и точность исследования.

Кровь для общего клинического анализа берут у пациента из пальца, вены или из мочки уха, у новорожденных - из пятки.

При плановом назначении лабораторного теста кровь следует брать натощак (после примерно 12 ч голодания, воздержания от приема алкоголя и курения), между 7 и 9 ч утра, при минимальной физической активности непосредственно перед взятием (в течение 20-30 мин), в положении пациента лежа или сидя. Взятие материала следует производить в резиновых перчатках, соблюдая правила асептики.

Венозная кровь. Венозная кровь считается лучшим материалом не только для определения биохимических, гормональных, серологических, иммунологических показателей, но и для клинического исследования крови. Это обусловлено тем, что применяемые в настоящее время гематологические анализаторы предназначены для работы с венозной кровью, и в большинстве своем в тех странах, где эти анализаторы производятся, они сертифицированы и стандартизованы для работы с этой кровью. Кроме того, при известной стандартизации процессов взятия, хранения, транспортировки крови, удается добиться минимальной травматизации и активации клеток, примеси других веществ (тканевой жидкости), при этом всегда имеется возможность повторить и/или расширить (например, добавить исследование ретикулоцитов) анализ.

Достоверность и точность гематологических исследований, проводимых из венозной крови, во многом определяется техникой взятия крови. В данном случае стандартизация всех составляющих преаналитического этапа приобретает исключительно важное значение.

Подготовка пациента к взятию крови из вены включает несколько этапов. При проведении венепункции следует обращать особое внимание на правильную идентификацию пациента, которая позволит избежать путаницы проб и обеспечить безопасность пациентов. Процедуру венепункции необходимо проводить, строго следуя принятым отечественным и международным стандартам, внутренним правилам ЛПУ и рекомендациям производителей систем для взятия крови.

Место венепункции нужно продезинфицировать марлевой салфеткой, смоченной 70⁰ спиртом, и подождать до полного высыхания антисептика (30-60 с). Не рекомендуется вытирать и обдувать место прокола, чтобы не занести на него микроорганизмы. Нельзя также пальпировать вену после обработки. Рука пациента должна покоиться на твердой поверхности, быть вытянута и наклонена немного вниз так, чтобы плечо и предплечье образовывали прямую линию.

При взятии венозной крови игла должна быть достаточно большого диаметра и иметь короткий срез, чтобы не травмировать противоположную стенку вены. Во время наложения жгута давление в вене должно обеспечивать минимальный стаз, при котором клетки крови не повреждаются, при этом жгут следует накладывать не более чем на 1-2 мин. В случае несоблюдения этого правила происходит существенное изменение концентрации некоторых основных анализов, в том числе гемоглобина. Нельзя также заставлять пациента работать рукой, сжимая и разжимая кулак. Необходимо следить, чтобы в момент взятия крови кулак пациента был разжат.

Кровь для гематологических исследований должна поступать свободным током непосредственно в пробирку с крышечкой, содержащую антикоагулянт. Взятие крови шприцом без антикоагулянта с последующим переливанием в пробирку недопустимо из-за формирования микросгустков и гемолиза. В момент переливания крови в пробирку она подвергается воздействию окружающей среды, что приводит к потере стерильности и снижению качества

образца. Кроме того, данный метод не позволяет избежать ошибок, связанных с точностью дозирования крови и, вследствие этого, нарушением соотношения кровь/антикоагулянт.

Использование шприца с иглой следует также избегать из-за его недостаточной безопасности для медицинского персонала. При взятии крови шприцом высока вероятность попадания крови пациента на руки медицинского персонала. В этом случае руки процедурной сестры могут послужить фактором передачи возбудителей гемоконтактных инфекций другому пациенту через инъекционную ранку. Медицинский работник сам может заразиться от источника инфекции.

При использовании современных анализаторов для гематологических исследований достаточно 2-3 мл крови с K_2 ЭДТА.

Рационально применение пробирок для взятия крови небольшого объема (4-5 мл) при соотношении диаметра и высоты пробирки 13×75 мм. Взятие венозной крови облегчается применением закрытых вакуумных систем. Под влиянием вакуума кровь из вены быстро поступает в пробирку, что упрощает процедуру взятия и сокращает время наложения жгута.

Вакуумная система состоит из трех основных элементов, соединяющихся между собой в процессе взятия крови: стерильной одноразовой пробирки с крышкой и дозированным содержанием вакуума, стерильной одноразовой двусторонней иглы, закрытой с обеих сторон защитными колпачками, и одно- или многоразового иглодержателя. Пробирки, входящие в закрытую вакуумную систему, содержат различные добавки и антикоагулянты, в том числе и для проведения гематологических исследований. Для обозначения содержимого пробирок с различными добавочными компонентами применяется цветное кодирование закрывающих их крышек. Так, для пробирок с антикоагулянтами лиловый цвет крышки означает наличие K_2 ЭДТА, зеленый цвет - гепарина, голубой - цитрата. Добавление в пробирку ингибиторов гликолиза (фторида, йодацетата) как одних, так и в комбинации с

антикоагулянтами (гепарином, К₂ЭДТА), кодируется пробкой серого цвета. Эти цвета крышек утверждены Международной организацией стандартизации (ISO, 2000 г.).

Метод взятия крови с помощью закрытых вакуумных систем имеет ряд преимуществ, основными из которых являются обеспечение высокого качества пробы и предотвращение любого контакта с кровью пациента, а значит, обеспечение безопасности медицинского персонала и других пациентов.

Капиллярная кровь. Пункция кожи с целью получения капиллярной крови является процедурой выбора, если требуется взять небольшое количество крови. Для гематологических исследований капиллярную кровь рекомендуется брать в следующих случаях:

- при ожогах, занимающих большую площадь поверхности тела пациента;
- при наличии у пациента мелких или труднодоступных вен;
- при выраженном ожирении пациента;
- при установленной склонности к венозному тромбозу;
- у новорожденных.

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 соответствии с местом прокола и необходимым количеством крови.

Пункция пальца не должна производиться у младенцев, так как это может привести к повреждению кости. У новорожденных кровь берется из пятки, при этом рекомендуется использовать специальные атравматичные скарификаторы.

Перед проколом кожа пальца пациента обрабатывается стерильным тампоном, смоченным 70° спиртом. Кожа в месте прокола должна быть сухой, розовой и теплой. Место пункции необходимо просушить естественным способом для удаления остатков спирта, поскольку он может вызвать гемолиз.

Применение ватных тампонов и других волокнистых материалов не

рекомендовано, поскольку это приводит к засорению волокнами датчика анализатора и гемоглобиновой камеры. В результате точность и воспроизводимость измерения концентрации гемоглобина резко падает. Первую каплю крови, полученную после прокола кожи, следует удалить тампоном, поскольку эта капля, вероятно, содержит примесь тканевой жидкости. Капли крови должны свободно вытекать, нельзя давить на палец и массировать зону вокруг прокола, так как при этом в кровь попадает тканевая жидкость, что существенно искажает результаты исследования. После взятия крови к раневой поверхности прикладывается новый стерильный тампон, смоченный 70° спиртом. Тампон следует удерживать, пока не прекратится кровотечение.

После прокола капиллярная кровь помещается в специальный микрокапилляр или специальные пластиковые пробирки, обработанные антикоагулянтом К₂ЭДТА. При прикосновении капилляра под действием капиллярного эффекта. При сборе крови в пробирку ее следует плотно закрыть. Необходимым условием для обеспечения качественной пробы является ее обязательное немедленное перемешивание с антикоагулянтом путем осторожного переворачивания пробирки 10 раз. Пробирки с наполнителями должны заполняться до уровня, расположенного между двумя отметками. В случае последовательного взятия капиллярной крови в несколько микропробирок необходимо соблюдать определенный порядок их заполнения. Пробирки с ЭДТА набираются в первую очередь, для того чтобы обеспечить адекватный объем пробы и точность гематологических тестов. Пробирки с другими реактивами наполняются вслед за ЭДТА, пробирки для исследования сыворотки заполняются в последнюю очередь.

Основные проблемы и рекомендации при работе с капиллярной кровью:

- При прохождении через поврежденную ткань активируется свертывание крови, поэтому длительность взятия крови является критически показателем.

- Немецкий стандарт DIN 58910-D: кровь, вытекающая самотеком, должна быть взята в стерильный капилляр в течение 10с. Чистое и сухое место кончика пальца или ушной мочки пунктируется стерильным скарификатором. Прокол должен быть достаточно глубоким, чтобы кровь текла самотеком. Не допускается давление или сжатие. Для исследования используются первые капли крови, берется 10-50 мкл в стерильный капилляр, который держится горизонтально, один конец касается места прокола.

АНТИКОАГУЛЯНТЫ

При проведении гематологических исследований большую роль играет выбор правильного антикоагулянта. Наиболее часто используют K_2 ЭДТА или ЭДТУК – K_3 ЭДТА (дву- или трикалийевый этилендиаминтетраацетат или трилон Б), тринатрий-цитрат и гепарин. Первые два вещества ингибируют коагуляцию путем удаления кальция из крови; гепарин действует в качестве Ко-фактора образования комплекса тромбина с антитромбином III плазмы, в результате тромбин связывается и не переводит фибриноген в фибрин, кровь не свертывается.

ЭДТА (ЭДТУК) - предпочтительный антикоагулянт при подсчете форменных элементов крови с использованием автоматических гематологических анализаторов. Концентрация ЭДТА во взятой крови должна быть постоянной и составлять 1,5-2,2 мг/мл крови (например, для получения соотношения 1,5 мг/мл в пробирку, рассчитанную на 2 мл крови, наливают 0,04 мл 7,5% раствора K_2 ЭДТА или K_3 ЭДТА). При взятии крови очень важно заполнять пробирку точно до указанного на ней объема, поскольку недостаток антикоагулянта обычно приводит к микросвертыванию крови и образованию сгустка, а избыток является причиной роста осмотического давления крови и сморщивания клеток. Изменение концентрации ЭДТА от измерения к измерению могут вызвать неконтролируемые отклонения исследуемых параметров крови, связанные, прежде всего, с объемом эритроцитов и тромбоцитов.

Снижение величины микроцентрифужного гематокрита с увеличением концентрации ЭДТА в крови более выражено при использовании K_3 ЭДТА по сравнению с K_2 ЭДТА. Вследствие этого Международный комитет по стандартизации в гематологии (ICSH) рекомендовал K_2 ЭДТА в качестве антикоагулянта выбора для взятия образцов крови, предназначенных для подсчета клеток крови и определения их размера. Однако следует отметить, что при использовании рекомендованных концентраций K_2 ЭДТА и K_3 ЭДТА и при проведении анализа на гематологических анализаторах в пределах от 1 до 4 ч после взятия крови существенных различий результатов между образцами, взятыми с этими двумя антикоагулянтами, не было зафиксировано.

У некоторых пациентов может наблюдаться небольшая спонтанная агрегация тромбоцитов или реже, так называемая, ЭДТА-зависимая псевдотромбоцитопения (иммунного характера), причем эти явления прогрессируют по мере увеличения времени, прошедшего после взятия крови. Точный подсчет числа эритроцитов у лиц, с вызванным ЭДТА сателлизмом тромбоцитов, может быть осуществлен при разведении крови, полученной из пальца или путем взятия крови с цитратом в качестве антикоагулянта. Использование Na_2 ЭДТА не рекомендуется вследствие его плохой растворимости в крови.

Гепарин - лучший антикоагулянт для определения осмотической резистентности эритроцитов и функциональных исследований лейкоцитов, включая ряд иммунологических тестов. Особенностью действия этого антикоагулянта является способность максимально предотвращать гемолиз. Мазки, приготовленные из гепаринизированной крови и окрашенные по Романовскому, имеют голубоватый фон. Поскольку гепарин не предотвращает агрегации клеток, его нецелесообразно использовать при подсчете лейкоцитов и тромбоцитов.

Цитрат натрия - антикоагулянт выбора при исследованиях свертывающей системы крови и функции тромбоцитов. Применение в качестве

антикоагулянта гепарина или цитрата натрия сопровождается изменениями в структуре клеток и поэтому не рекомендуется для исследования морфологии клеток крови. В гематологических исследованиях цитрат натрия в основном используется для определения скорости оседания эритроцитов (СОЭ) по методу Вестергрена или Панченкова. Для этого венозная кровь набирается в пробирки с 3,8% цитратом натрия в соотношении 4:1. Также может использоваться венозная кровь, взятая с ЭДТА (1,5 мг/мл) и затем разведенная цитратом натрия или физиологическим раствором в соотношении 4:1.

Сразу же после заполнения пробирки кровью до указанного на ней объема пробу следует осторожно перемешать: пробирку с ЭДТА 8-10 раз, пробирку с цитратом для определения СОЭ - также 8-10 раз. Пробирки нельзя встряхивать - это может вызвать пенообразование и гемолиз, а также привести к механическому лизису эритроцитов.

Несоответствие концентрации антикоагулянта объему взятой крови, а также недостаточно тщательное смешивание, может привести к значительным ошибкам, в том числе повлечь за собой неточное определение концентрации клеточных элементов, искажение морфологической структуры клеток.

Для получения из образцов крови проб для различных видов исследований рекомендуется следующая последовательность наполнения пробирок:

1. Кровь без антикоагулянтов - для получения сыворотки, используемой при биохимических и серологических исследованиях;
2. Кровь с цитратом - для получения плазмы, используемой при коагулологических исследованиях;
3. Кровь с гепарином - для получения плазмы, используемой при клинико-химических исследованиях;
4. Кровь с K_2 ЭДТА - для получения цельной крови, используемой для гематологических исследований.

После того как все необходимые пробирки будут наполнены, нужно

приложить сухую стерильную салфетку к месту венепункции, а затем наложить давящую повязку на руку или бактерицидный пластырь.

При отсутствии возможности работы со стабилизированной антикоагулянтной кровью приходится использовать старые методы взятия, при которых в лаборатории заранее для каждого пациента готовятся следующие пробирки с:

1. 5 мл трансформирующего раствора для определения гемоглобина;
2. 4 мл 0,9% изотонического раствора натрия хлорида для подсчета числа эритроцитов;
3. 0,4 мл 3% раствора уксусной кислоты для подсчета числа лейкоцитов;
4. 5% раствором трехзамещенного цитрата натрия, набранного в капилляр Панченкова до метки 50 и слитого в пробирку или коммерческие пробирки с 3,8% цитратом Na на буфере, позволяющие сохранить стабильность эритроцитов до 12 ч - для определения СОЭ.

Взятие крови может осуществляться 2 способами:

I. После прокола пальца несколько капель крови (не менее 3-4) спускают на индивидуальное предметное (часовое) стекло или гнездо пластикового планшета, перемешивают и используют для работы.

II. Кровь набирают индивидуальным, стерильным капилляром Панченкова, предварительно смоченным цитратом натрия.

Сразу после взятия крови в 1, 2 и 3-ю пробирки добавляют по 20 мкл крови и несколько раз промывают пипетку в верхнем слое жидкости. Для определения СОЭ в капилляр, промытый цитратом натрия, дважды набирают кровь до метки 0 (100 делений) и выдувают ее в пробирку с раствором цитрата натрия (соотношение крови и реактива - 4:1), пробирку встряхивают. Исследование крови начинают с разведения для эритроцитов, так как дальнейшая работа по определению количества лейкоцитов и содержания гемоглобина связана с использованием реактивов, лизирующих эритроциты.

Для исследования лейкоцитарной формулы, морфологии эритроцитов,

лейкоцитов, тромбоцитов готовят мазки крови с помощью шлифованного стекла или специального шпателя (фирма «Гем»):

- из стабилизированной крови после тщательного, щадящего перемешивания, желательного сразу же после взятия. Длительный контакт крови с антикоагулянтом приводит к морфологическим изменениям клеток (вакуолизации цитоплазмы, изменению структуры ядер). Гемоглобин, эритроциты стабильны в течение одного дня при хранении в закрытой пробирке;

- непосредственно из пальца пациента. Для этого вытирают место укола сухим шариком ваты и наносят каплю крови на сухое обезжиренное предметное стекло, затем быстро готовят тонкие мазки.

ДОСТАВКА, ХРАНЕНИЕ И ПОДГОТОВКА ПРОБ К ИССЛЕДОВАНИЮ

Для обеспечения качественного результата исследований нужно четко контролировать время и условия хранения проб до выполнения анализа. Исследование венозной крови с ЭДТА необходимо проводить либо непосредственно после взятия (исключается возможность спонтанной агрегации тромбоцитов), либо спустя 25 мин (время необходимое для адаптации тромбоцитов к антикоагулянту) и не позднее 6 ч после взятия образца и хранения его при комнатной температуре. Однако в некоторых случаях этот период времени оказывается слишком продолжительным для обеспечения достоверных результатов. Только гемоглобин и число тромбоцитов остаются стабильными в течение этого времени. Стабильность аналитов при пониженной температуре (+4°C) также сильно зависит от типа аналита. Поэтому для достоверного дифференциального подсчета клеток крови оптимальным будет приготовление мазка в течение 1-2 ч после взятия крови. Более продолжительное хранение до 24 ч не рекомендуется.

Капиллярную кровь с ЭДТА следует хранить при комнатной температуре и анализировать в течение 4 ч после взятия.

Непосредственно перед исследованием кровь должна быть тщательно перемешана в течение нескольких минут для разведения антикоагулянта и равномерного распределения форменных элементов. Длительное постоянное перемешивание образцов до момента их исследований не рекомендуется вследствие возможного травмирования и распада патологических клеток.

При необходимости проведения отсроченного анализа (транспортировка на отдаленные расстояния, техническая неполадка прибора и т. д.), пробы крови хранят в холодильнике (4-8 °С) и исследуют в течение 24 ч. **Кровь нельзя замораживать.** Однако при длительном хранении происходит набухание клеток и изменение параметров, связанных с их объемом. У практически здоровых людей эти изменения не носят критического характера и не сказываются на количественных параметрах. Однако при наличии патологических клеток, последние могут изменяться или даже разрушаться вследствие апоптоза в течение нескольких часов с момента взятия крови.

Исследование крови на приборе проводится при комнатной температуре.

Кровь, хранившаяся в холодильнике, необходимо вначале согреть до комнатной температуры, так как при низкой температуре увеличивается вязкость крови, и форменные элементы имеют тенденцию к склеиванию, что в свою очередь, приводит к нарушению перемешивания и неполному лизису. Исследование холодной крови может быть причиной флагоирования при дифференцировке лейкоцитов по трем параметрам вследствие компрессии лейкоцитарной гистограммы.

При определении СОЭ кровь следует анализировать при комнатной температуре не позже 2 ч после взятия. Если кровь стоит при +4°С, СОЭ должно быть определено в течение не более 6 часов, но перед выполнением метода кровь должна быть прогрета до комнатной температуры. Для получения правильных результатов определение СОЭ должно выполняться при 18-25°С, так как при более высоких температурах значение СОЭ увеличивается, а при более низких - замедляется.

При выполнении гематологических исследований на значительном удалении от места взятия крови неизбежно возникают проблемы, связанные с неблагоприятными условиями транспортировки. Воздействие механических факторов (тряска, вибрация, перемешивание и т. д.), температурного режима, вероятность пролива и загрязнения проб могут оказывать влияние на качество анализов. Для устранения этих причин при перевозках пробирок с кровью рекомендуется использовать герметично закрытые пластиковые пробирки и специальные транспортные изотермические контейнеры.

ВЛИЯНИЕ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ, ЗАВИСЯЩИХ ОТ ПАЦИЕНТА

Следует принимать во внимание, что на результаты гематологических исследований могут также влиять факторы, связанные с индивидуальными особенностями и физиологическим состоянием организма пациента. Изменения клеточного состава периферической крови наблюдаются не только при различной патологии, они также зависят от следующих данных: возраст; раса; пол; диета и голодание; курение и употребление алкогольных напитков; менструальный цикл, беременность, менопаузальный статус; физические упражнения; эмоциональное состояние и психический стресс; циркадный и сезонные ритмы; климатические и метеорологические условия; положение пациента в момент взятия крови; прием фармакологических препаратов и др.

Так, например, число эритроцитов и, следовательно, гемоглобин у новорожденных выше, чем у взрослых. С увеличением высоты над уровнем моря наблюдается значительное повышение гематокрита и гемоглобина (до 8% на высоте 1400 м). Физические упражнения могут приводить к существенным изменениям числа лейкоцитов, обусловленных гормональными сдвигами. У больных при переходе из положения лежа в положение стоя показатели гемоглобина и число лейкоцитов могут увеличиваться на 6-8%, а показатели гематокрита и число эритроцитов возрастать на 15-18%. Выраженная диарея и рвота могут приводить к значительной дегидратации и гемоконцентрации.

После регидратации наблюдается снижение гемоглобина и гематокрита, что может быть ошибочно принято за потерю крови.

Для устранения или сведения к минимуму влияния этих факторов кровь для повторных анализов необходимо брать в одних и тех же условиях.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЕМОГЛОБИНА

Гемоглобин является одним из основных параметров, используемых для оценки эритропоеза. В тоже время с определением именно данного показателя связано наибольшее количество ошибок.

Под термином «гемоглобин» подразумевают несколько форм гемоглобина, которые присутствуют в крови человека, как в норме, так и при патологии:

- оксигемоглобин (HbO_2);
- восстановленный гемоглобин или дезоксигемоглобин (принятое написание - HbH);
- карбоксигемоглобин (HbCO);
- сульфгемоглобин (SHb);
- нитрозогемоглобин (HbNO);
- метгемоглобин (HbMet) или гемиглобин (Hi);
- цианметгемоглобин или гемиглобинцианид (CNmetHb).

Как в оксигемоглобине, так в восстановленном гемоглобине или карбоксигемоглобине, сульфгемоглобине железо находится в закисленной двухвалентной форме (Fe^{+2}). При окислении в метгемоглобин железо переходит в трехвалентную окисленную форму (Fe^{+3}). В зависимости от того, с каким лигандом или в какой форме (закиси или окиси) находится железо, меняется спектр гемоглобина.

В крови гемоглобин существует в четырех основных формах: оксигемоглобин, дезоксигемоглобин, карбоксигемоглобин и метгемоглобин.

HbO_2 и CNmetHb имеют максимум поглощения при 540-542 нм, близок к

этим цифрам и карбоксигемоглобин (539 нм). Для HbMet характерен максимум поглощения - 630 нм при рН 6,6, который в значительной степени зависит от рН. При 523 нм одинаковую абсорбцию (точка пересечения) имеют HbO₂ и HbH. В результате измерение Hb проводится разными способами при длинах волн 523, 540 или 630 нм.

Существует, по крайней мере, три причины, в соответствии с которыми затруднено фотометрическое определение гемоглобина непосредственно в цельной крови:

1. Основное количество гемоглобина крови сосредоточено в эритроцитах. Присутствие в пробе значительного числа клеток и различных белков приводит при фотометрии к значительному рассеиванию света, в связи с чем оптические свойства крови не подчиняются закону Бугера-Ламберта-Бера, который устанавливает прямо пропорциональную зависимость между поглощением светового потока определенной длины волны и концентрацией растворенного вещества.

2. Оптимальная плотность фотометрирования равна 0,5 Б (Белл). Практически все фотометры работают при плотности биопроб 0,2-1 Б. Концентрация гемоглобина в крови столь высока, что для достижения необходимой плотности фотометрирования требуется кювета с длиной оптического пути 50 микрометров. Изготовить такую кювету с необходимой точностью и поместить в нее кровь проблематично, поэтому измерению гемоглобина предшествует разведение пробы.

3. Производные гемоглобина имеют различные спектральные кривые поглощения. Результат фотометрирования зависит от их соотношения, которое в каждом конкретном случае неизвестно.

Из сказанного выше вытекают следующие требования к пробе крови, необходимые для проведения фотометрического анализа:

1. Биопроба должна иметь окраску и быть прозрачной.
2. Оптическая плотность биопробы в стандартных спектрофотометрических

кюветах с длиной оптического пути 10мм должна быть в пределах 0,2-1 Белл.

3. Биопроба должна иметь одну производную гемоглобина с удобным для фотометрирования спектром поглощения или способ фотометрирования должен учитывать поглощение различных форм гемоглобина.

МЕТОДЫ ГЕМОГЛОБИНОМЕТРИИ

Определение гемоглобина в крови традиционно проводится на основе измерения окрашенного железопорфиринового комплекса. При этом используются разные фотометрические методы: цианметгемоглобиновый метод Драбкина (син. гемиглобинцианидный метод), гемиглобиновый метод (син. гемихромный метод), аммиачный метод и другие.

Принцип основных методов заключается в подготовке из цельной крови с помощью трансформирующих растворов биопроб с последующим их фотометрированием. По измеренной оптической плотности определяется концентрация гемоглобина, исходя из формулы:

$$CHb(\text{г/л}) = \frac{D_{\lambda \text{пробы}} \cdot F \cdot 10}{L}$$

где $D_{\lambda \text{пробы}}$ оптическая плотность раствора на рабочей длине волны L нм; F - коэффициент (фактор) пересчета оптической плотности в концентрацию; 10 - толщина «идеальной» спектрофотометрической кюветы в мм; L - истинная длина кюветы.

Следует отметить, что величина фактора определена для монохроматического измерения, когда спектральная полоса составляет $D_{\lambda} \approx 1$ нм. Такая полоса достигается только в спектрофотометрах.

Гемиглобинцианидный метод (метод Драбкина) рекомендован Международным комитетом по стандартизации в гематологии в качестве референтного. В этом методе Fe^{+2} гемоглобина окисляется до Fe^{+3} метгемоглобина феррицианидом, затем метгемоглобин переводится в стабильный цианметгемоглобин цианидом. Абсорбция $CNmetHb$ измеряется при 540 нм, при которой имеется максимум абсорбции.

Цианметгемоглобиновый метод характеризуется высокой точностью, простотой исполнения, дешевизной и возможностью выполнения на гематологических анализаторах.

Высокая точность обусловлена тем, что: 1) практически все формы гемоглобина быстро переводятся трансформирующим раствором в цианметгемоглобин, 2) в широком диапазоне концентраций растворов цианметгемоглобина имеет место строгое соблюдение закона Бугера-Ламберта-Бера. Наличие в спектре поглощения гемиглобинцианида максимума при длине волны 540 нм позволяет использовать фотометры разных классов для его измерения без значительных снижений точности анализа. Гемиглобинцианид оказался устойчив и стабилен при хранении, для него известен коэффициент миллимолярной экстинкции (11,0 л/моль×см). Для гемиглобинцианида фактор является известной величиной и равен 367,7 ($\lambda = 540$ нм).

Технически определение гемоглобина можно вести прямым измерением оптической плотности с последующим прямым пересчетом на концентрацию или по калибровочной кривой, используя стандартные растворы гемиглобинцианида.

Ход определения. В пробирку с 5 мл трансформирующего раствора добавляют 20 мкл крови (разведение 1:251). Содержимое пробирки тщательно перемешивают и оставляют на 10 мин. Измерения проводят при длине волны 540 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм против холостой пробы (трансформирующий раствор). Удобно использовать пластиковые спектрофотометрические кюветы однократного применения.

Расчет содержания гемоглобина проводят по калибровочному графику, построенному по четырем точкам: на миллиметровой бумаге по горизонтальной оси абсцисс откладывают концентрации гемоглобина в г/л, указанные в паспорте и соответствующие содержанию гемиглобинцианида в ампулах. На вертикальной оси ординат откладывают величины абсорбции или показания гемоглобинометра, полученные при измерении соответствующего

раствора гемиглобинцианида. Калибровочный график должен представлять собой прямую линию, исходящую из начала координат. Получение кривой линии вместо прямой означает, что в работе были допущены ошибки или прибор неисправен. Для каждого фотометра необходимо построение собственного графика. Из калибровочного графика, рассчитывают фактор, по следующей формуле:

$$F = \frac{C}{D}$$

где С-конкретная концентрация гемоглобина; D-соответствующая ей оптическая плотность.

Полученный фактор используется для программируемого фотометра или при расчете таблицы. Если спектрофотометр позволяет выделить длину волны 540 нм, можно использовать для измерения гемоглобина прямую спектрофотометрию реакционной смеси (5 мл трансформирующего раствора + 20 мкл крови). Величину абсорбции умножают на коэффициент 367,7 и получают концентрацию гемоглобина в г/л. При исследовании гемоглобина на фотоэлектрокалориметре с широкополосным светофильтром 520--540 нм расчет содержания гемоглобина проводят по калибровочному графику.

Гемихромный методне требует перевода HbMet в CNmetHb, поэтому не используются цианистые соединения. Максимум поглощения гемихрома находится на длине волны 533 нм. Однако измерение на этой длине волны возможно только в спектрофотометрических приборах, где можно установить любую длину волны, поэтому для определения гемоглобина на фотометрах используется длина волны в 540 нм.

Для гемихромного метода фактор равен 398,0 ($\lambda=540$ нм).

Обычно определение гемоглобина гемихромным методом проводится с использованием калибраторов.

Аммиачный метод (модифицированный метод Дервиза-Воробьева).
Сущность метода заключается в том, что все разновидности гемоглобина не

переводятся в единую форму, а выполняется разведение пробы крови (различных производных гемоглобина) в 0,04% растворе аммиака. Для модифицированного метода Дервиза-Воробьева оптимальной (рабочей) является изобестическая точка 523 нм, в которой сводятся к минимуму ошибки измерений. В данной точке два производных гемоглобина - оксигемоглобин, дезоксигемоглобин и метгемоглобин имеют одинаковое поглощение, поэтому результат фотометрирования не зависит от относительного содержания этих производных в растворе.

Относительное поглощение карбоксигемоглобина при длине волны 523 нм больше, чем у остальных производных гемоглобина, поэтому результирующая величина ошибки при измерении гемоглобина крови зависит от концентрации карбоксигемоглобина.

В подавляющем большинстве случаев метод Дервиза-Воробьева дает приемлемый для практики результат. Этот метод реализован в гемоглобинометре «Мини ГЕМ-523», имеющем узкополосный светофильтр с максимумом пропускания на длине волны 523 нм. Методическая ошибка определения гемоглобина на гемоглобинометрах «Мини ГЕМ-523» (предельно допустимое значение коэффициента общей аналитической вариации) не превышает 1,5%, если концентрация карбоксигемоглобина в крови не превышает 10%.

Определение гемоглобина методом Сали характеризуется большими погрешностями, основные из них связаны с влиянием белков плазмы на реакцию между гемоглобином и соляной кислотой, интерференцией со стороны билирубина, неустойчивостью окраски под действием света, изменением со временем стандартных растворов гематина. В результате суммарная ошибка метода Сали при определении гемоглобина достигает 30%. Согласно современным требованиям (Приказ МЗ РФ №245 от 7.02.2000 и отраслевой стандарт ОС 91500.13.0001-2003.) предельно допустимое значение коэффициента общей аналитической вариации при определении гемоглобина

не должно превышать 5%. Поэтому метод Сали не пригоден для использования в клинико-диагностических лабораториях.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОДСЧЕТ КОЛИЧЕСТВА ЭРИТРОЦИТОВ В СЧЕТНОЙ КАМЕРЕ

Наиболее распространен классический микроскопический метод подсчета клеток в камере Горяева.

Принцип. Подсчет эритроцитов под микроскопом в определенном количестве квадратов счетной сетки с последующим пересчетом на 1 мкл крови, исходя из объема квадратов и разведения крови.

Ход определения. Исследуемую кровь разводят в 200 раз, для чего в пробирку с 4 мл 0,9% раствор хлорида натрия добавляют 20 мкл крови. Кончик пипетки вытирают фильтровальной бумагой или марлей, и кровь выдувают на дно пробирки. Пипетку тщательно промывают в верхнем слое жидкости, содержимое пробирки перемешивают и оставляют стоять до момента подсчета. К счетной камере притирают шлифовонное стекло и заполняют ее разведенной кровью. Предварительно несколько раз тщательно встряхивают содержимое пробирки, затем стеклянной или пластиковой пипеткой или стеклянной палочкой отбирают каплю разведенной крови и подносят ее к краю покровного стекла, следя за тем, чтобы она равномерно без пузырьков воздуха заполнила всю поверхность камеры с сеткой, не затекая в бороздки. Заполненную камеру оставляют в горизонтальном положении на 1 мин (для оседания эритроцитов).

Подсчет эритроцитов производят в 5 больших квадратах, разделенных на 16 малых, т. е. в 80 малых квадратах. Рекомендуется считать клетки в квадратах сетки, расположенных по диагонали. Для того, чтобы не считать одни и те же эритроциты, лежащие на линиях, принято считать клетки только на определенных двух линиях (например, на левой и верхней).

Расчет количества эритроцитов в 1 мкл крови проводят, исходя из разведения крови (200), числа сосчитанных квадратов (80) и объема 1 малого квадрата (1/4000 мкл), по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 4000 \cdot 200}{80} = a \cdot 10000$$

где X - число эритроцитов в 1 мкл крови; a - число сосчитанных эритроцитов.

Эритроциты рекомендуется считать в течение 2-3 ч после взятия крови.

При гемолитических и мегалобластных анемиях - сразу после взятия, так как эритроциты легко разрушаются.

Ручные методы подсчета клеток чрезвычайно трудоемки и не всегда дают достаточно точные результаты, так как при визуальном подсчете постоянно присутствует субъективный фактор. Кроме того, малейшие отклонения от правил подготовки камеры и подсчета клеток влияют на конечный результат исследования. Вместе с тем, эти методы не требуют сложного оборудования, реактивов и могут быть применены практически в любых условиях.

Основными источниками ошибок при подсчете эритроцитов являются:

- неточное взятие крови в пипетку;
- образование сгустка, поглощающего часть клеток и занижающего результат исследования;
- недостаточное перемешивание содержимого пробирки перед заполнением камеры;
- неправильная подготовка камеры: недостаточное притирание покровных стекол; неравномерное заполнение камеры, образование пузырьков воздуха и т. д.;
- подсчет эритроцитов сразу после заполнения камеры, не выжидая 1 мин;
- подсчет меньшего, чем требуется по методике, количества квадратов;
- плохо вымытые камера, пробирки, пипетка, капилляр для взятия крови; недостаточно просушенные пробирки и пипетки;
- использование недоброкачественного разводящего раствора.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗМЕРОВ ЭРИТРОЦИТОВ

Диаметр эритроцита может быть определен путем прямого измерения 100

клеток с помощью окуляр-микрометра и построении кривой Прайс-Джонса. Этот метод используется при диагностике микросфероцитарной гемолитической анемии, при которой эритроциты имеют меньший, чем в норме, диаметр, а эритроцитометрическая кривая сдвигается влево. При этом результаты исследования среднего объема эритроцитов на гематологическом анализаторе не отличаются от нормы.

Индексы эритроцитов

В лабораторной и клинической практике используются различные индексы, позволяющие количественно характеризовать средний объем эритроцитов, степень их насыщения гемоглобином, анизоцитоз. Часть этих индексов можно рассчитать, исходя из концентрации гемоглобина, числа эритроцитов, показателя гематокрита, некоторые определяют только автоматические гематологические анализаторы.

Цветовой показатель отражает относительное содержание гемоглобина в эритроците. Вычисляется цветовой показатель по формуле:

$$\text{Цветовой показатель} = \frac{Hb_{\text{опыт}}}{Hb_{\text{норма}}} \div \frac{RBC_{\text{опыт}}}{RBC_{\text{норма}}}$$

где $Hb_{\text{опыт}}$ - концентрация гемоглобина в исследуемом образце крови; $Hb_{\text{норма}}$ - нормальная концентрация гемоглобина (условно принимается в 1 л крови 167 г Hb); $RBC_{\text{опыт}}$ - количество эритроцитов в исследуемом образце крови; $RBC_{\text{норма}}$ - нормальное количество эритроцитов (условно принимается в 1 л крови $5,0 \times 10^{12}$ эритроцитов). После проведения сокращений

$$\text{Цветовой показатель} = \frac{3 \cdot Hb_{\text{опыт}}}{RBC_{\text{опыт}} \text{ (первые три цифры)}}$$

Цветовой показатель определяется в условных единицах и имеет отвлеченное значение. Нормальные величины - 0,86-1,05. В настоящее время значительно точнее и надежнее для оценки насыщения эритроцитов гемоглобином рассчитывать среднее содержание гемоглобина в эритроцитах.

Средний объем эритроцита (MCV) вычисляется путем деления

гематокритной величины крови на число эритроцитов в 1 мм: по формуле:

$$MCV = \frac{\text{гематокрит}}{\text{число эритроцитов в } 1 \text{ мм}^3}$$

Результат выражают в кубических микронах (мкм^3), или в фемтолитрах (фл). На практике средний объем эритроцита вычисляют путем умножения гематокрита (%) на 10 и деления полученного произведения на число эритроцитов в миллионах в кубическом миллиметре крови:

$$MCV = \frac{\text{гематокрит (\%)} \cdot 10}{\text{число эритроцитов (млн кл./мм}^3)}$$

MCV является более объективным параметром, чем визуальная оценка диаметра эритроцитов (изменение диаметра эритроцита на 5% приводит к изменению его объема на 15%), поскольку последний зависит от формы клетки. Следует помнить, что микросфероциты имеют диаметр меньше нормы, в то время как средний объем их чаще остается в норме. На определение среднего диаметра эритроцитов влияет ряд факторов внешней среды:

- диаметр эритроцитов при высыхании в мазках уменьшается на 10-20%;
- в толстых мазках диаметр эритроцитов меньше, чем в тонких;
- в направлении мазка диаметр эритроцитов больше, чем поперек.

Нормальные величины: 80-100 фл (мкм^3), Показатель MCV меняется в течение всей жизни: у новорожденных он достигает 128 фл, в течение первой недели снижается до уровня 100-112 фл, к шести месяцам падает до 78 фл, к году составляет 77-79 фл, в возрасте 4-5 лет нижняя граница (80 фл) нормы стабилизируется. Снижение MCV менее 80 фл расценивается как микроцитоз, увеличение свыше 95 фл - как макроцитоз.

ГЕМАТОКРИТ (ПОКАЗАТЕЛЬ ГЕМАТОКРИТА)

Гематокрит (HCT, Ht - *hematocrit*, гематокритная величина) отражает долю объема крови, занимаемую эритроцитами; выражается в процентах или в виде индекса в системе СИ (л/л). Наиболее распространен способ центрифугирования образца крови с добавлением антикоагулянта в

стандартном капилляре с использованием гематокритных центрифуг и измерение высоты столбика эритроцитов. Антикоагулянты: гепарин - 5000 ЕД/мл разводят дистиллированной водой в соотношении 1:5 или К₂-ЭДТА (трилон Б), 40 г/л. Наиболее удобны в использовании коммерческие гепаринизированные гематокритные капилляры стандартов 75, 70 и 30 мм.

Ход определения. Предварительно обработанный антикоагулянтом и высушенный капилляр заполняют кровью из пальца (или венозной) на 7/8 длины. Закрывают капилляр с одного конца специальной пастой. Помещают в ротор центрифуги так, чтобы закупоренные концы упирались в резиновую прокладку, и центрифугируют 5 мин при 8000 об/мин. По отсчетной шкале, приложенной к центрифуге, определяют гематокритную величину;

Метод центрифугирования используется с целью прогноза возможных тромбоэмболических осложнений при повышенной вязкости крови. В случаях полицитемии исследование, проведенное при помощи счетчика, недостаточно надежно. Центрифужный метод имеет ценность у пациентов с измененным осмотическим давлением плазмы. У таких пациентов гематокрит не может быть определен путем вычисления из среднего объема эритроцитов (МСV), так как при разведении в изотоническом растворе в анализаторе меняется объем клеток. Воспроизводимость показателя гематокрита, если ее оценивать по коэффициенту вариации (CV), составляет примерно 2%.

В большинстве гематологических анализаторов предусмотрено определение гематокрита. В кондуктометрических типах аппаратов электронным методом измеряется средний корпускулярный объем эритроцита (МСV), эта величина умножается на количество клеток в единице объема и вычисляется гематокрит. В лазерных проточных системах используется тот же расчетный способ. Отличие заключается в технике измерения, которая соотносит величину светового импульса, образующегося при прохождении эритроцита через лазерный луч, с клеточным объемом.

Клиническое значение. Показатель гематокрита широко используют для

суждения о степени анемии, при которой, как правило, отмечается его снижение, иногда до значительных цифр (20-25%). Повышение гематокрита (55- 65% и выше) характерно для эритремии, менее резкое увеличение (50-55%) наблюдается при симптоматических эритроцитозах, сопутствующих врожденным порокам сердца, легочной недостаточности, некоторым гемоглобинопатиям. Показатель гематокрита дает представление о гемоконцентрационных сдвигах, он снижается при гемодилуции. Широко используется определение гематокрита для расчета эритроцитарных индексов, отражающих различные характеристики эритроцитов: средний объем, средняя концентрация гемоглобина, а также для ряда биохимических показателей.

Гематокрит отражает лишь объем эритроцитов в крови, а не их общую массу в организме. Например, у пациентов с шоком за счет гемоконцентрации гематокрит может быть нормальным или даже высоким, хотя общая масса эритроцитов значительно снижена в связи с потерей крови. Гематокрит не может быть надежным при оценке степени выраженности анемии сразу после потери крови или гемотрансфузии.

Основными источниками ошибок при определении гематокрита являются несоответствующая концентрация антикоагулянта, недостаточное перемешивание образца или центрифугирование. Специальная калибровка или контрольные материалы обычно непригодны для оценки качества этого исследования. Небольшую часть столбика эритроцитов занимает плазма, оставшаяся между клетками; она составляет от 1 до 3% этого столбика, что не имеет большого клинического значения. При наличии патологических форм эритроцитов (сфероцитов, овалоцитов) количество такой плазмы может составлять до 6% от общего объема клеток. Обычно чем выше гематокрит, тем больше плазмы оказывается между клетками.

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ

Для оценки физико-химических свойств эритроцитов исследуют стойкость (резистентность) эритроцитов к различным воздействиям.

Наибольшее распространение в клинической практике получило исследование осмотической резистентности эритроцитов.

Метод определения осмотической резистентности эритроцитов

Принцип. Определение степени гемолиза эритроцитов в забуференных гипотонических растворах хлорида натрия.

Реактивы. Основной раствор (по своей осмотической концентрации соответствует 10% раствору хлорида натрия) имеет рН 7,4, состав раствора: двузамещенный фосфат натрия (Na_2HPO_4) - 27,31 г (или $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) - 34,23, г, однозамещенный фосфат натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) - 4,86 г, хлорид натрия - 180 г, дистиллированная вода - до 2 л. Раствор можно хранить в закрытой после в холодильнике в течение нескольких месяцев. Основной раствор разводят в 10 раз и получают раствор, соответствующий по своей осмотической концентрации 1 % раствору хлорида натрия. На основе этого раствора готовят рабочие растворы хлорида натрия следующих концентраций: 0,85; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40; 0,35; 0,30; 0,20; 0,10%. Можно приготовить по 100 мл этих рабочих растворов и сохранять их в холодильнике. Растворы годны в течение 2 нед.

Ход определения. В две стерильные пробирки с предварительно внесенными 2 каплями гепарина помещают по 1,5 мл крови, перемешивают и одну используют для исследования, вторую - оставляют на сутки в термостате. В ряд центрифужных пробирок (14 штук) разливают по 5 мл рабочих растворов хлорида натрия с концентрацией от 1 до 0,10%. В каждую центрифужную пробирку добавляют по 0,02 мл перемешанной гепаринизированной крови и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Центрифугируют смесь крови с растворами хлорида натрия при 2000 об/мин в течение 5 мин. Из каждой пробирки сливают надосадочную жидкость и измеряют на фотоэлектроколориметре при длине волны 500-560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 10мм против холостой пробы. Холостая проба - надосадочная жидкость в пробирке, содержащей 1 % раствор хлорида натрия.

Расчет. За 100% гемолиз принимают гемолиз в пробирке, содержащей 0,1 % раствор хлорида натрия. Вычисляют процент гемолиза в каждой пробирке, сравнивая величину оптической плотности надосадочной жидкости, с оптической плотностью, принятой за 100%, по формуле:

$$\% \text{ гемолиза} = \frac{D_x \cdot 100}{D_1}$$

где D_1 - оптическая плотность надосадочной жидкости в пробирке с 0,1% раствором хлорида натрия; D_x - оптическая плотность исследуемой пробы; 100 - процент гемолиза в пробирке с 0,1% раствором хлорида натрия.

На следующий день повторяют исследование с кровью, инкубированной 24 ч при 37°C, так как в ряде случаев понижение осмотической резистентности выявляется только при исследовании инкубированной крови.

Нормальные величины. У здоровых лиц в свежей крови начало гемолиза отмечают при концентрации хлорида натрия 0,50-0,45%, а полный гемолиз - при 0,40-0,35% растворе хлорида натрия.

Клиническое значение. Исследование проводят при подозрении на гемолитическую анемию. Понижение осмотической резистентности, т. е. появление гемолиза эритроцитов при более высокой, чем в норме, концентрации хлорида натрия (0,70-0,75%), наблюдается при наследственной микросфероцитарной и некоторых наследственных несфероцитарных гемолитических анемиях, а также иногда при аутоиммунной гемолитической анемии. Повышение осмотической резистентности характерно для талассемии, гемоглобинопатий.

СКОРОСТЬ ОСЕДАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ (СОЭ)

Скорость оседания эритроцитов – показатель, входящий в общий анализ крови. СОЭ зависит от огромного количества внутренних и внешних факторов и рассматривается как неспецифический тест.

В процессе оседания эритроцитов различают 3 фазы. В 1-й фазе, под действием силы тяжести, эритроциты медленно оседают отдельными клетками.

Через некоторый период времени они образуют агломераты, монетные столбики, оседание которых происходит значительно быстрее, чем единичных клеток. Агломерация эритроцитов является основным феноменом реакции оседания эритроцитов. В 3-й фазе оседание вновь замедляется: агломераты эритроцитов располагаются так густо, что дальнейшее их оседание затруднено и постепенно прекращается.

СОЭ меняется в зависимости от целого ряда физиологических и патологических факторов. Скорость спонтанной седиментации сферических тел в жидкости прямо пропорциональна массе оседающих частиц, разнице в плотности частиц и жидкости и обратно пропорциональна вязкости жидкости. Основным фактором, влияющим на образование монетных столбиков из эритроцитов, является белковый состав плазмы крови. Все белковые молекулы снижают Z-потенциал на эритроцитарной мембране, который способствует взаимному отталкиванию эритроцитов и поддержанию их во взвешенном состоянии.

Международным комитетом по стандартизации в гематологии (ICSH) для определения СОЭ рекомендован метод Вестергрена (Westergren). Серийно выпускаются автоматические и полуавтоматические анализаторы СОЭ по методу Вестергрена за рубежом: Sediscan (USA), Sediplus (Germany), Eleca (Italy). В нашей стране исторически сложилось, что более распространенным является метод Панченкова, который не автоматизирован и не снабжен системой документирования результатов. Хотя метод Панченкова не дорог и прост, он требует не менее 1 ч для выполнения, проводится вручную, неудобен при большом количестве исследований, имеет много источников ошибок.

Микрометод Панченкова

Смесь капиллярной крови с цитратом разделяется в аппарате Панченкова, состоящем из штатива и капиллярных пипеток со шкалой 100 мм.

Реактивы. 5% р-р трехзамещенного цитрата натрия ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 5H_2O$).

Раствор фильтруют (рН должен быть нейтральным или слабощелочным).

При помутнении реактив не годен.

Ход определения. Перед использованием химически чистый капилляр промывают цитратом натрия, набирают последний до метки 50 и выдувают его в пробирку. Для проведения исследования в пробирку с цитратом добавляют два капилляра крови из пальца или вены (набирают дважды в капилляр до метки 0 и переносят в пробирку, усиленно выдувая всю кровь). Кровь перемешивают цитратом, при этом получают соотношение крови и цитрата 4:1. В лаборатории полученной смесью заполняют капилляр до метки «0». Закрыв пальцем верхний конец капилляра, осторожно, чтобы кровь из капилляра не вылилась, устанавливают его в штатив строго вертикально, упирая нижний конец капилляра в резиновую прокладку, прижимая верхний конец прокладкой или пробкой. Через час отмечают оседание эритроцитов по высоте отстоявшегося слоя плазмы в миллиметрах.

В настоящее время используют пипетки-капилляры для СОЭ с фильтром, специальное оборудование, позволяющее ускорить и автоматизировать определение СОЭ.

Нормальные величины. У мужчин 1-10 мм/ч, у женщин 2-15 мм/ч, у новорожденных 0,9 мм/ч в 1-й день и до $4,0 \pm 2,1$ мм/ч на 2-й нед. У детей 1-го года жизни СОЭ колеблется от 4-10 мм/ч, в дальнейшем варьирует от 5 до 11 мм/ч.

Метод Вестергрена

Метод Вестергрена проводится на градуированных пипетках Вестергрена (Westergren) с просветом в 2,4-2,5 мм и шкалой в 200 мм (Фирма «Гем»). В отличие от метода Панченкова в методе Вестергрена используется венозная, а не капиллярная кровь. Пробоподготовка, постановка и считывание результатов у этих методов принципиально не отличаются.

Методы Панченкова и Westergren хорошо коррелируют между собой, а в диапазоне нормальных значений (1-20 мм/ч) зависимость линейная. Однако при увеличении значений СОЭ метод Westergren дает более высокие цифры (до 200

мм/ч), это, в частности связано с тем, что метод Панченкова имеет измерительную шкалу лишь до 100 мм/ч.

Нормальные значения СОЭ по методу Westergren для мужчин - до 15 мм/ч, для женщин - до 20 мм/ч.

Автоматизированный метод. При постановке СОЭ на предлагаемом в настоящее время специальном оборудовании капилляры или тест-пробирки устанавливаются не в вертикальном положении, а под углом 45°. Такой способ значительно ускоряет определение СОЭ, которое занимает до 5-20 мин. Измерение СОЭ выполняется прибором в режиме кинетики с помощью линейного сенсора, аналогичного микротелекамере, который обеспечивает непрерывное и динамичное считывание в каждой измерительной ячейке в заданное время. Автоматический анализатор СОЭ исключает ручные операции с образцами, позволяет измерить СОЭ одновременно в нескольких пробах крови за короткий промежуток времени.

Примером подобных анализаторов может служить анализатор СОЭ StaRRsed производство Mechatronics, выполняющий измерение СОЭ в соответствии с методом Вестергрена с использованием закрытых пробирок с образцами, заполненными цитратной или ЭДТА кровью. Поскольку на значение СОЭ существенное влияние оказывает температура проведения измерения, то анализатор снабжен датчиками, измеряющими температуру прибора во время проведения исследования, что позволяет проводить корректировку конечного результата в соответствии с данным параметром. Считывание капилляров происходит автоматически путем перемещения датчика вдоль капилляра и измерения поглощения инфракрасного света через каждые 0,25 мм. На основании этого сканирования определяется степень и количество уровней поглощения. Все значения поглощения определяются по отношению к самому сильному (100%) и самому слабому (0%) уровням. Капилляры всегда заполняются образцом крови до определенного уровня. Использование закрытых пробирок снижает вероятность заражения персонала.

После проведения измерений капилляры автоматически освобождаются, промываются, дезинфицируются и сушатся струей теплого воздуха. Автоматическое считывание штрихкода с пробирки исключает ошибку в идентификации образца. Производительность прибора в зависимости от модификации от 60 до 150 анализов в день.

Клиническое значение. Увеличение СОЭ наблюдается при различных воспалительных процессах, интоксикациях, острых и хронических инфекциях, при инфаркте миокарда, опухолях, после кровопотери, оперативных вмешательств. При острых воспалительных и инфекционных процессах ускорение оседания эритроцитов наступает через 24 ч или через несколько дней после повышения температуры и увеличения числа лейкоцитов. Повышение белков острой фазы (фибриноген, С-реактивный белок, орозомиукоид, альфа-1-антитрипсин, церулоплазмин и гаптоглобин), сопровождающее острый воспалительный процесс, способствует формированию агрегатов эритроцитов и индуцируют повышение СОЭ. При хроническом воспалении увеличение СОЭ связано с повышением уровня фибриногена, моно- и поликлональных иммуноглобулинов в крови. СОЭ увеличивается при беременности, приеме многих стероидных гормонов (эстрогенов, глюкокортикоидов) и некоторых лекарственных препаратов (например, салицилаты).

Особенно выраженное ускорение СОЭ (60-80 мм/ч) характерно для парапротеинемических гемобластозов (множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрема, острый плазмобластный лейкоз и др.) и моноклональных парапротеинемий, сопутствующих злокачественным новообразованиям, хроническому гепатиту, циррозу печени, туберкулезу, амилоидозу, коллагенозам. Замедление СОЭ наблюдается при эритремии и симптоматических эритроцитозах.

Измерение СОЭ рассматривают как предварительное исследование, которое не имеет выраженной специфичности для какого-либо заболевания и

используется как скрининговый тест.

Источники ошибок при выполнении анализа:

- При комнатной температуре СОЭ определяют не позже 2 ч после взятия крови. В случае хранения крови при +4°C, СОЭ определяют в течение не более 6 ч, но перед выполнением реакции кровь прогревают до комнатной температуры.

- Исследование СОЭ должно выполняться при 18-25°C. При более высоких температурах значение СОЭ увеличивается, при низких - замедляется.

- Перед проведением анализа кровь хорошо перемешивают, что обеспечивает лучшую воспроизводимость результатов.

- При отсутствии резкой границы между эритроцитным столбиком и плазмой (регенеративных анемиях) над компактной массой эритроцитов образуется светлая «вуаль» в несколько миллиметров из разведенных эритроцитов (главным образом из ретикулоцитов). В таком случае определяется граница компактного слоя, а эритроцитарная вуаль причисляется к столбику плазмы.

- Стекланные капиллярные пипетки могут быть заменены на пластмассовые (полипропил, поликарбонат), однако они требуют проверки и оценки степени корреляции полученных результатов со стекланными капиллярами.

- Нарушение соотношения кровь/цитрат (неточное дозирование цитрата или крови), стояние пробы под наклоном, на свету, в тепле, более 4 ч с цитратом, во влажном капилляре.

ПОДСЧЕТ КОЛИЧЕСТВА РЕТИКУЛОЦИТОВ

Существуют различные возможности подсчета ретикулоцитов: в световом микроскопе с использованием суправитального окрашивания, на гематологических анализаторах, с помощью проточной цитофлуориметрии и анализаторов клеточного изображения. До настоящего времени основным методом оценки количества ретикулоцитов является микроскопический с

подсчетом относительного количества ретикулоцитов в суправитально окрашенном мазке крови. Однако указанный метод трудоемок, недостаточно стандартизирован, отличается низкой воспроизводимостью. Коэффициент вариации по данным различных авторов составляет от 25 до 50%. Кроме того, визуальная оценка ретикулоцитов является достаточно субъективной и зачастую не позволяет уловить слабо выраженные зернисто-сетчатые структуры.

В мазках эритроциты окрашены в желтовато-зеленоватый цвет, зернисто-нитчатая субстанция - в синий или синевато-фиолетовый цвет.

Приготовленные одним из указанных выше способов мазки микроскопируют с иммерсионным объективом. Подсчитывают не менее 1000 эритроцитов и отмечают среди них количество ретикулоцитов. Количество подсчитанных ретикулоцитов выражают в % или ‰. В настоящее время для окрашивания ретикулоцитов используют готовый набор.

Наборы фирмы Deltalab представляют собой коробку-штатив на 50 пробирок емкостью 2 мл с крышками, в которые помещено стандартное количество стабилизированного раствора бриллиантового крезилового синего с добавками, ускоряющими суправитальную окраску эритроцитов. В пробирку с красителем помещают 2-3 капли крови, смешивают кровь с красителем, инкубируют 10-15 мин при комнатной температуре, после чего делают мазок.

ПОДСЧЕТ КОЛИЧЕСТВА ЛЕЙКОЦИТОВ

Определение количества лейкоцитов в счетной камере. Подсчет лейкоцитов под микроскопом проводят после лизирования эритроцитов в 100 больших квадратов счетной сетки и пересчитывают на 1 л крови, исходя из объема квадратов и разведения крови. Подсчет лейкоцитов должен быть произведен в течение 2-4 ч после взятия крови.

Реактивы. 3-5% раствор уксусной кислоты, подкрашенный несколькими каплями раствора метиленового синего (для окраски ядер лейкоцитов). Раствор голубого цвета, длительно годен к употреблению.

Ход определения. В пробирку с 0,4 мл уксусной кислоты набирают из пальца 20 мкл крови (разведение 1:20). Можно использовать стабилизированную антикоагулянтном венозную кровь. Выдувают кровь из пипетки на дно пробирки, затем тщательно перемешивают, повторно набирая и выдувая ее. Заполненную камеру оставляют в горизонтальном положении на 1 мин (для оседания лейкоцитов). Лейкоциты подсчитывают в 100 больших квадратах с малым увеличением (окуляр 10×, объектив 8×). Для большей точности счет лейкоцитов проводят по всей сетке в больших квадратах (неразделенных на малые квадраты и полосы), начиная с левого верхнего угла сетки. Для лучшего контрастирования затемняют поле зрения, опуская конденсор и закрывая диафрагму.

Расчет числа лейкоцитов проводят по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 250 \cdot 20}{100} = a \cdot 50$$

где X - число лейкоцитов в 1 мкл крови; а - число лейкоцитов в 100 больших квадратах; 20 - разведение крови; 100 - число подсчитанных квадратов; 250 - объем одного большого квадрата 1/250.

Таким образом, количество лейкоцитов, подсчитанных в 100 больших квадратах, умножают на 50.

При наличии в периферической крови ядросодержащих клеток красного ряда, они не лизируются и подсчитываются вместе с лейкоцитами. В этом случае, чтобы определить истинное количество лейкоцитов, из общего числа посчитанных клеток вычитают количество клеток красного ряда.

ПОДСЧЕТ КОЛИЧЕСТВА ТРОМБОЦИТОВ

Для определения количества тромбоцитов используют следующие методы: подсчет в счетной камере, мазках крови и на гематологическом анализаторе. Каждый метод имеет преимущества и недостатки.

Подсчет тромбоцитов в камере достаточно точен, не требует для расчета количества эритроцитов. С другой стороны, этот метод более трудоемкий,

поскольку тромбоциты в нативном виде представлены мелкими и плохо контрастированными элементами. Недостаток метода в необходимости подсчета тромбоцитов в ближайшие часы после взятия крови.

Определение количества тромбоцитов в мазках крови значительно уступает по своей точности камерному методу или автоматическим счетчикам. Ошибки при подсчете в мазках крови могут быть обусловлены плохим качеством мазка и связанным с этим неравномерным распределением тромбоцитов, неточным определением количества эритроцитов крови. Существенное неудобство метода - необходимость одновременного подсчета тромбоцитов и эритроцитов в крови. Преимущество его - возможность исследования тромбоцитов в любое время, независимо от момента взятия крови.

Метод определения тромбоцитов с помощью гематологического анализатора позволяет достаточно точно определить количество тромбоцитов, их средний объем и распределение по объему.

В настоящее время существуют готовые наборы для подсчета тромбоцитов.

Метод подсчета в камере

Принцип. Определение количества тромбоцитов в 1 л крови с учетом ее разведения и объема квадрата счетной сетки камеры Горяева с применением Фазово-контрастного устройства для контрастирования тромбоцитов.

Реактивы. Применяют 1% раствор оксалата аммония, который быстро и полностью лизирует эритроциты. Раствор кипятят и фильтруют. Хранят в холодильнике.

Ход определения. Исследуемую кровь разводят в 200 раз; для этого в сухую пробирку набирают 4 мл реактива и 0,02 мл крови. Перемешивают и оставляют на 25-30 мин для гемолиза эритроцитов. Подготавливают счетную камеру. Перемешивают разведенную кровь и заполняют камеру: подносят каплю крови с помощью стеклянной палочки или пастеровской пипетки к краю

покровного стекла, следя за тем, чтобы кровь равномерно без пузырьков воздуха заполняла всю поверхность сетки, не затекая в бороздки. Помещают счетную камеру во влажную камеру на 5 мин для оседания тромбоцитов (чашка Петри с уложенной по краям смоченной водой фильтровальной бумагой). Подготавливают фазово-контрастное устройство в соответствии с инструкцией, приложенной к нему. Тромбоциты считают в 25 больших квадратах.

Тромбоциты выглядят в счетной камере в виде мелких, хорошо преломляющих свет образований. Расчет тромбоцитов проводят по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 250 \cdot 200}{25} = a \cdot 2000$$

где X - число тромбоцитов в 1 мкл крови; а - число тромбоцитов, сосчитанных в 25 больших квадратах; 200 - разведение крови; 25 - число сосчитанных квадратов; 250 - объем одного большого квадрата 1/250 мкл. Число подсчитанных тромбоцитов умножают на 2000.

Воспроизводимость. Ошибка метода составляет 6,5%.

Метод подсчета в мазках крови (по Фонио)

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

Реактивы. Применяют 14% раствор сульфата магния или 6% раствор этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА).

Ход определения. Реактив набирают в капилляр Панченкова до метки «75» и вносят в пробирку, затем добавляют кровь, взятую тем же капилляром, до метки «0». Содержимое пробирки перемешивают и готовят тонкие мазки. Фиксируют и окрашивают по Романовскому-Гимзе в течение 2-3 ч при использовании раствора сульфата магния и в течение 30-45 мин при применении ЭДТА. Высохшие мазки микроскопируют с иммерсионным объективом, подсчитывая количество тромбоцитов в тонких местах препарата (эритроциты должны быть расположены разрозненно).

Подсчет производят следующим образом: в каждом поле зрения микроскопа считают число эритроцитов и тромбоцитов, передвигая мазок до тех пор, пока не будут просчитаны 1000 эритроцитов.

Расчет: количество тромбоцитов на 1000 эритроцитов составляет A%. Зная число эритроцитов в 1 л крови, подсчитывают количество тромбоцитов в 1 л крови.

Референтные значения. У здорового человека количество тромбоцитов может несколько меняться в течение суток. Нормальное содержание тромбоцитов в крови колеблется в пределах $180-320 \times 10^9/\text{л}$ (в последнее время в связи с поступлением на отечественный рынок зарубежных гематологических счетчиков и анализаторов, в инструкции к которым даются зарубежные нормы, стали приводить значения нормального содержания тромбоцитов в диапазоне от 150 до $450 \times 10^9/\text{л}$).

При отсутствии в крови гемопоэтических стимулов, общий объем циркулирующих тромбоцитов довольно постоянен. В патологических условиях количество и объем тромбоцитов могут меняться. При снижении продукции тромбоцитов, гемостатический потенциал может быть частично компенсирован за счет повышения их объема. В обратной ситуации, при повышении количества тромбоцитов выше $450 \times 10^9/\text{л}$ объем тромбоцитов не снижается ниже определенного физиологического уровня. Соответственно, общий объем тромбоцитарного пула в крови возрастает пропорционально увеличению количества тромбоцитов.

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МАЗКОВ КРОВИ

Техника приготовления мазка на предметном стекле. Используются чистые предметные обезжиренные стекла желательной толщиной 1 мм. Капля крови помещается в середине стекла в 1-2 см от одного из концов. Шлифованное стекло, которым будет сделан мазок, ставят на предметное под углом 30-45 градусов на 1-2 мм перед каплей и двигают его немного назад, чтобы стекло соприкоснулось с каплей крови, и капля растеклась по углу

между двумя стеклами. Далее быстро выполняют движение вперед по предметному стеклу шлифованным (которое должно быть уже предметного) или специальным пластиковым шпателем, позволяющим получить монослойный мазок практически на всем его протяжении. Мазок должен иметь длину 3-4 см. Не следует сильно нажимать на стекло, так как при этом травмируются форменные элементы крови. Мазки высушивают на воздухе и маркируют. Правильно выполненный высохший мазок должен быть тонким, желтоватого цвета, располагаться на 1-1,5 см от краев и оканчиваться «метелочкой». Даже в хорошо приготовленном мазке в его начале наблюдается небольшое перекрытие эритроцитов, однако относительно большая площадь отделенных друг от друга клеток имеется в области «хвоста» мазка.

В толстых (густо-розового цвета) мазках морфология клеток плохо различима. После окрашивания эритроциты при микроскопии должны располагаться отдельно друг от друга в виде монослоя.

Существует 2 типа автоматических приборов для производства равномерных мазков крови, в основе которых используется механическое распределение клеток или центрифугирование. Цитоцентрифуга концентрирует клетки на небольшой площади, и такие препараты используют для изучения клеток в низких концентрациях, например, в спинномозговой жидкости. В современных гематологических анализаторах имеется устройство для автоматического приготовления мазков с последующей их фиксацией и окрашиванием, что сокращает время приготовления препаратов и обеспечивает постоянство характеристик окраски. Данные приборы требуют стандартных стекол размером 26×76×1.

Фиксация и окраска мазков крови

Наиболее часто применяют окраску по Романовскому, Нохту и Паппенгейму-Крюкову. Существуют автоматические устройства для приготовления и окраски мазков, которые позволяют стандартизировать условия и повысить качество препаратов.

Во многих лабораториях для фиксации продолжают использовать 96° этиловый спирт или смесь Никифорова (смесь равных объемов 96° этилового спирта и диэтилового (серного) эфира), но результаты при фиксации этими реактивами значительно хуже. В метиловом спирте фиксация продолжается 5-10мин, в этиловом спирте - не менее 30мин. При окраске по Паппенгейму фиксация мазков проводится раствором эозин-метиленового синего по Май-Грюнвальду.

Основные и рабочие растворы красителей.

- Основной раствор азура II: 1 г краски растворяют в 1 л дистиллированной воды. Оставляют в посуде из темного стекла на 12-14 дней при комнатной температуре или в термостате при 37°С на 6-8 дней.

- Основной раствор эозина калия: 1 г краски растворяют в 1 л дистиллированной воды. Оставляют в посуде из темного стекла на 12-14 дней при комнатной температуре или в термостате при 37°С на 6-8 дней. Рабочий раствор азур-эозина: перед окрашиванием мазков смешиваются 25 мл основного раствора азура II, 20 мл основного раствора эозина калия и 55 мл буферного раствора. Пропорции красителей могут варьировать, их устанавливают опытным путем при приготовлении свежих основных растворов.

Технология окрашивания мазков периферической крови по Паппенгейму

Для окраски мазков по методу Паппенгейма следует использовать панхромные гематологические красители. В качестве фиксатора применяется красящий раствор Май-Грюнвальда, в состав которого входит метиловый спирт. Фиксация и окраска мазков происходит одновременно.

Последовательность процедур:

- сухие нефиксированные мазки аккуратно помещают в решетку контейнера для окраски мазков или располагают горизонтально на специальные рельсы.

- решетку опускают в кювету контейнера с рабочим раствором фиксатора - красителя на 3-5 мин или наливают по 3-4 мл фиксатора - красителя на каждый из препаратов, находящихся на рельсах.
- контейнер с мазками ополаскивают в кювете с дистиллированной водой в течение 1 мин или на мазок, не сливая красителя, добавляют дистиллированную воду на 1 мин.
- контейнер с мазками помещают в кювету с краской азур-эозин по Нохту (или по Романовскому-Гимзе) на 8-10 мин или наливают краситель на мазки, находящиеся на рельсах.
- смывают краску водопроводной водой, мазки высушивают.

В настоящее время предлагается широкий спектр высококачественных красителей, удобные в применении и дающие хорошие результаты при окраске мазков. Можно использовать наборы для быстрого окрашивания мазков крови в течение 20-30 с.

Автоматическая фиксация и окраска мазков может быть осуществлена с помощью специальных устройств, в которые загружают нефиксированные мазки. Последующее автоматическое дозирование фиксатора-красителя и буферных растворов обеспечивает стандартную и равномерную окраску мазков.

Исследование мазка крови. Окрашенный препарат крови должен сначала быть рассмотрен с помощью иммерсионного объектива (90×) и окуляра 7× или 10×. При исследовании эритроцитов важно выявить отклонения в их размере, форме, степени насыщения и распределении гемоглобина, а также наличие включений. Затем оценивается число и морфология тромбоцитов и проводится дифференциальный подсчет лейкоцитов.

Дифференциальный подсчет лейкоцитов. Подсчет лейкоцитарной формулы заключается в регистрации всех встречающихся в поле зрения лейкоцитов отдельно по их принадлежности к тем или иным росткам. В мазке

крови распределение форменных элементов происходит неравномерно, так как лейкоциты различаются по своим физическим свойствам (размеры, удельная масса, упругость и т. д.). По краям препарата чаще встречаются нейтрофилы, моноциты, эозинофилы, В середине - лимфоциты. Поэтому передвигать стекло надо в определенном порядке. Считают несколько полей зрения вдоль края, затем возвращаются к центру и так далее по зубчатой траектории.

При подсчете лейкоцитарной формулы используют лабораторные клавишные счетчики. Подсчитывают 100 клеток с последующим выведением процентного, а при необходимости абсолютного количества клеток, исходя из общего количества лейкоцитов. В случае патологии анализируют не менее 200 клеток, при этом особое внимание обращают на качественные изменения в эритроцитах, тромбоцитах и морфологию лейкоцитов.

При визуальном дифференциальном подсчете имеются 3 главных источника ошибок: неравномерное распределение клеток в препарате, нераспознавание клеток и погрешность счета.

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

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

В настоящее время для подсчета и анализа клеток крови используют гематологические анализаторы разного уровня сложности. Преимущество современных технологий подсчета и оценки форменных элементов крови: высокая производительность (до 100-120 проб в час), небольшой объем крови для анализа (12-150 мкл), анализ большого массива (десятки тысяч) клеток, определение с высокой точностью и воспроизводимостью 30 и более параметров одновременно, графическое представление результатов исследований (гистограммы, скетограммы). По сравнению с визуальной

техникой автоматический подсчет - более точный метод оценки концентрации клеток. Автоматизированный анализ крови открыл много новых диагностических возможностей, но одновременно он располагает и некоторыми ограничениями, особенно касающихся морфологических исследований клеток. Несмотря на все достоинства, даже самые современные анализаторы не в состоянии полностью заменить метод микроскопической оценки клеток.

Подготовка и проведение исследований на гематологических анализаторах

При выполнении анализа на гематологическом анализаторе предпочтительно использовать венозную кровь. Взятие венозной крови лучше осуществлять, применяя специальные одноразовые системы с ЭДТА (вакутейнеры). Это гарантирует отсутствие в образце посторонних примесей, а наличие антикоагулянта в оптимальной концентрации предотвращает образование фибриновых сгустков и агрегацию тромбоцитов.

При взятии капиллярной крови необходимо использовать специальные пробирки с ЭДТА для капиллярной крови. Нанесенный на внутреннюю поверхность пробирки мелкодисперсный порошок ЭДТА быстро растворяется в крови и надежно блокирует процессы свертывания крови и активации тромбоцитов.

Не следует использовать пробирки с выпаренным раствором ЭДТА. При испарении раствора на дне пробирки образуются крупные кристаллы ЭДТА, которые очень медленно растворяются в крови. Это может приводить к образованию фибриновых нитей в верхней части пробы крови.

Цельная кровь имеет высокую вязкость и поэтому трудно перемешивается с антикоагулянтом. Перед началом измерения цельную кровь следует перемешивать плавным переворачиванием и вращением пробирки в течение не менее 2 мин. Для этих целей лучше всего использовать специальный гематологический шейкер.

При ручном перемешивании цельной крови недопустимы резкие

встряхивающие движения, так как они приводят к механическому лизису эритроцитов.

Для дезинфекции подушечки пальца перед взятием крови и высушивания носика пробирки следует использовать специальные безворсовые салфетки. Применение ватных тампонов и других волокнистых материалов подобного рода может привести к засорению волокнами счетной и гемоглобиновой камер. В результате точность и воспроизводимость измерения резко падает. Извлечение посторонних частиц из камеры требует повышенного расхода промывающего раствора, а в ряде случаев, даже частичной разборки прибора.

При работе в режиме предиллюции следует учитывать, что образование пузырьков при разведении крови с использованием диллятора может приводить к подсчету последних как клеток крови и, как следствие, являться причиной завышения результатов подсчета тромбоцитов. Поэтому необходимо следить, чтобы жидкость стекала по стенке стаканчика без образования пузырьков.

Во избежание случаев несовместимости реагентов следует использовать изотонический раствор и гемолитик от одного изготовителя. При смене реагентоводного производителя на реагенты другого производителя необходимо проверить калибровку анализатора по контрольной крови, обращая особое внимание на HGB и MCV/HCT и при необходимости сделать их перекалибровку. Калибровка других показателей, как правило, не меняется.

При эксплуатации гематологических анализаторов важную роль играет качество электрической сети и заземления. Внезапное отключение электропитания часто приводит к сбоям в работе приборов и необходимости вмешательства инженеров сервисной службы. В том случае, если электрическое питание пропадает в момент забора пробы или анализа, и появляется спустя несколько часов (5-20), последствия могут оказаться значительно более серьезными - может выйти из строя гидравлика, засориться сгустками крови капиллярные трубки, апертура и т. д. Поэтому прибор должен работать с

источником бесперебойного питания, который позволяет закончить анализ и провести отмывку прибора перед выключением.

Периодически необходима калибровка по стандартным материалам, так как электронные и механические компоненты прибора, датчиков, насосов и т. д. со временем подвергаются старению и меняют свои технические параметры. Для осуществления калибровки, необходимо пользоваться только качественными контрольными материалами!

ПРОТОЧНЫЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ АНАЛИЗАТОРЫ

Автоматические счетчики крови оценивают размеры, структурные, цитохимические и другие характеристики клеток. Они анализируют около 10000 клеток в одном образце и имеют несколько различных каналов подсчета клеточных популяций и концентрации гемоглобина. На основании количества определяемых параметров и степени сложности их можно условно разделить на 3 основных класса:

I класс- автоматические гематологические анализаторы, определяющие до 20 параметров, включая расчетные показатели красной крови и тромбоцитов, гистограммы распределения лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов по объему, а так же частичную дифференцировку лейкоцитов на три популяции - лимфоциты, средние клетки и гранулоциты.

II класс- высокотехнологичные гематологические анализаторы, позволяющие проводить развернутый анализ крови, в том числе полную дифференцировку лейкоцитов по 5 параметрам (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты и лимфоциты), гистограммы распределения лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов по объему, скатерограммы.

III класс- сложные аналитические системы, выполняющие не только развернутый анализ крови с дифференцировкой лейкоцитов по 5 параметрам, но и подсчет и анализ ретикулоцитов; при необходимости, комплектуются блоком для автоматического приготовления и окраски мазков из заданных образцов крови.

Частичная дифференцировка лейкоцитов

Можно подобрать такую композицию растворителя и гемолитика, что различные формы лейкоцитов претерпевают изменения размеров в разной степени и, благодаря этому, могут разделяться кондуктометрическим методом. Область малых объемов (35-90 фл) формируется лимфоцитами, которые под действием гемолитика значительно уменьшаются в объеме. Нейтрофилы, напротив, расположены в области больших объемов (120--400 фл). Между двумя пиками имеется зона так называемых «средних лейкоцитов» (90-120 фл), в которую попадают моноциты, базофилы, эозинофилы и плазматические клетки.

Некоторые фирмы выпускают гематологические анализаторы, работающие исключительно на кондуктометрическом принципе, но выделяющие помимо 3 стандартных популяций лейкоцитов дополнительные популяции. Размер трансформированных клеток не соответствует размерам клеток при визуальном просмотре их в окрашенном мазке крови (табл. 6).

Таблица №6.

Соотношение размеров клеток в окрашенных мазках крови и в приборах после обработки их лизирующим реагентом

Тип клеток	Размер клеток при визуальном анализе мазков крови	Размер клеток после обработки лизатом
Лимфоциты	наименьший	наименьший
Базофилы	средний	средний
Эозинофилы	средний	средний
Моноциты	наибольший	средний
Нейтрофилы	средний	наибольший
Патологические формы клеток	различный	различный

Все современные гематологические автоанализаторы измеряют концентрацию гемоглобина, для чего у них имеется встроенный гемоглобинометр. При этом измерение концентрации гемоглобина

происходит параллельно с определением концентрации лейкоцитов.

Качество результатов исследования крови на гематологическом анализаторе определяются следующими факторами:

- точностью дозирования цельной или разведенной крови;
- точностью дозирования изотонического раствора при проведении процедуры разведения крови;
- точностью определения объема суспензии, пропущенного через датчики подсчета клеток;
- точностью самого подсчета клеток;
- точностью определения размеров клеток;
- корректностью математических методов обработки первичных результатов измерений.

Высокотехнологичные гематологические анализаторы

Высокотехнологические гематологические анализаторы способны осуществлять дифференцированный счет лейкоцитов по 5 основным категориям: нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты и лимфоциты. Кроме того, они обладают системой «сигналов тревоги», предупреждающей оператора о наличии в исследуемых образцах крови патологических клеток. Принципы, положенные в основу пятичленной дифференцировки лейкоцитов, различаются у разных производителей.

Трехмерный анализ дифференцировки лейкоцитов – VCS

VCS-технология является запатентованным методом дифференцировки лейкоцитов в анализаторах фирмы Beckman-Coulter (США-Франция). Технология VCS (Volume - Conductivity - Scatter) включает одновременный компьютерный анализ клеток по трем направлениям: объем (Volume), электропроводность (Conductivity) и дисперсия лазерного света (Scatter).

Основные характеристики, оцениваемые данным методом:

- Объем клеток (Volume) - определяется сопротивлением (импедансом) для

тока низкой частоты (DC).

- Электропроводность клеток (Conductivity) - определяется при прохождении тока высокой частоты, она зависит от величины и плотности внутренних структур клетки. По результатам математически рассчитывается структурная электропроводность для каждой клетки. Клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением (например, лимфоциты) имеют низкое значение структурной электропроводности, тогда как клетки с большим объемом цитоплазмы (низкое ядерно-цитоплазматическое соотношение, например, нейтрофилы) характеризуются повышенной структурной электропроводностью.
- Способность клеток рассеивать лазерный луч (Scatter) (дисперсия света). Клетки, проходя через поток лазерных лучей, взаимодействуют с ним, в результате чего происходит отражение, поглощение и рассеивание световых лучей. Монохроматический лазерный луч, сталкиваясь с клетками крови, отклоняется на угол, пропорциональный размеру клетки и внутриклеточных компонентов. Поскольку светорассеивание определяется как поверхностными свойствами, так и внутренней структурой клетки, оптические системы используются при дифференцировке лейкоцитов. Свет, рассеянный под средними углами, несет комбинированную информацию о размере клеток, ее гранулярности, поверхностной топографии и отражательной способности. После математической обработки данных светорассеивания и импеданса формируется величина нормированной (на величину объема) рассеивающей способности.

Полученные по трем каналам данные с помощью электроники комбинируются и анализируются, в результате чего происходит распределение клеток по дифференцировочным кластерам и, таким образом, лейкоциты разделяются на пять основных популяций: лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы и базофилы. Клеточные кластеры размещаются на цветной объемной диаграмме, где по оси X - нормированная рассеивающая

способность, по оси Y- объем клеток, по оси Z - структурная электропроводимость.

Результатом отображения данного объемного графика на плоскости является лейкоцитарная скатерограмма, на которой каждый тип клеток (лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы) имеет свою зону расположения.

Изменение дисперсии лазерного света клетками - MAPSS технология

В системах Cell-Dyn фирмы Abbott (США) для дифференцировки лейкоцитов применена технология MAPSS - Multi Angle Polarized Scatter Separation - мультипараметрическая система лазерного светорассеивания - регистрация интенсивности рассеивания клетками поляризованного лазерного луча под разными углами. Этот метод заключается в компьютерном анализе дисперсии лазерного луча клетками крови. Рассеивание клеткой поляризованного лазерного луча под разными углами дает сведения о следующих ее свойствах:

- *размер клеток* - для чего оценивается прохождение поляризованного лазерного луча под малым углом рассеивания (близким к 0°);
- *структура и степень сложности клеток* - оценивается по анализу рассеивания поляризованных лазерных лучей под углом до 7° ;
- *ядерно-цитоплазматическое соотношение* - оценивается по анализу рассеивания поляризованных лазерных лучей под углом до 10° ;
- *оценка формы клеточного ядра* - осуществляется благодаря анализу светорассеивания поляризованных лазерных лучей под углом 90° ;
- *для оценки клеточной зернистости и дифференцировки эозинофилов* используется оценка светорассеивания деполаризованного луча под углом в 90° .

В приборах фирмы Bayer разработан принцип жидкостной цитохимии - реакции на пероксидазу. Использование данной реакции связано с различной активностью ее в лейкоцитах. Так, эозинофилы и нейтрофилы имеют

интенсивную пероксидазную активность, моноциты - слабую, в лимфоцитах она не выявляется. Приборы одновременно измеряют абсорбцию и дисперсию видимого света. Проточная цитохимическая техника включает регистрацию рассеянного и поглощенного светового луча. В лейкоцитарном канале после лизиса эритроцитов и стабилизации лейкоцитов последние окрашиваются цитохимически с выявлением в них активности пероксидазы. Далее лейкоциты дифференцируют по двум признакам: размеру клеток, определяемому методом рассеивания лазерного луча, и пероксидазной активности - по поглощению клеткой светового потока.

Дифференцировка базофилов от других гранулоцитов проводится в базоканале. Все лейкоциты, за исключением базофилов, подвергаются лизису после обработки пробы специфическим лизатом. Затем в канале осуществляется измерение дисперсии лазерного света под углами 2-30 и 5-150, что позволяет различить формы ядер и установить их клеточную принадлежность.

Сравнивая информацию, получаемую с Регох и Vaso каналов, компьютер осуществляет дифференцировку лейкоцитов на 5 основных популяций, а также сигнализирует в виде флагов о присутствии в крови реактивных лимфоцитов, молодых форм гранулоцитов, бластов, эритробластов.

Проточная цитофлюориметрия

В гематологических анализаторах фирмы Sysmex (ХТ-1800, ХТ-2000i, ХЕ-2100) применяется метод проточной цитофлюориметрии с использованием флюоресцентного красителя полиметина. Данный флюоресцентный краситель связывается с ДНК и РНК неизмененных клеток, что позволяет использовать его как для дифференцировки лейкоцитов по 5 параметрам (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты и лимфоциты), так и для подсчета ретикулоцитов. Кроме того, в анализаторе ХЕ-2100 разработана функция подсчета гемопоэтических стволовых клеток.

Анализ клеток происходит в проточной кювете при пересечении луча лазера длиной 633 нм. После контакта лазерного луча с окрашенной клеткой

происходит рассеивание последнего под большим и малым углами и возбуждение флюоресцентного красителя.

Данные сигналы улавливаются фотоумножителями и регистрируются в виде трех параметров:

1. Прямого светорассеяния(FSC)- отклонение лазерного луча под малым (до 10°) углом, которое зависит от размера (объема, только при условии сферической формы частицы) и формы клетки.

2. Бокового светорассеяния(SSC) - отклонение лазерного луча под углом до 90°, зависящее от рефрактерного индекса (или плотности) клетки и характеризующее сложность внутриклеточных структур.

3. Детекции специфического флюоресцентного сигнала(SFL), который регистрируется параллельно с боковым светорассеиванием и позволяет судить о содержании РНК/ДНК в клетках.

На основании полученных сигналов все клетки распределяются по соответствующим кластерам (зонам) в соответствии с их размером, структурой и количеством ДНК. Таким образом, происходит дифференцировка лейкоцитов на 4 популяции: лимфоциты, моноциты, эозинофилы и нейтрофилы вместе с базофилами.

Разделение нейтрофилов и базофилов происходит в базо-канале, где используется метод специфического химического лизиса, основанный на предварительной обработке лейкоцитов реактивом, осуществляющим лизис всех клеток, за исключением базофилов, с последующим дискриминантным анализом всех элементов по размеру и сложности структуры и количеству ДНК.

ОСНОВНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ АНАЛИЗАТОРОВ И ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ИХ ЗНАЧЕНИЕ

WBC (*white blood cells*) - количество лейкоцитов крови ($\times 10^9$ /л). Коэффициент вариации (CV) при автоматическом определении этого показателя составляет 1-3%, в то время как при ручном подсчете 6,5-15% в

зависимости от числа лейкоцитов. Измерение лейкоцитов проводится после полного лизиса эритроцитов в пробе.

Возможные ошибки измерения. Ложное завышение числа лейкоцитов при автоматическом анализе возможно при наличии в крови:

- ядерных красных клеток или устойчивых к лизису эритроцитов;
- агрегатов тромбоцитов;
- криоглобулинов или криофибриногена.

Наличие ядерных красных клеток и агрегатов тромбоцитов в исследуемых образцах крови сопровождается в большинстве современных гематологических анализаторов появлением соответствующих «сигналов тревоги» на бланках анализов.

Ложное занижение количества лейкоцитов наблюдается в результате разрушения клеток при длительном хранении крови (более 24 ч) или грубом перемешивании.

RBC (*red blood cells*) - количество эритроцитов крови ($\times 10^{12}/\text{л}$). Подсчет эритроцитов осуществляется в цельной крови (содержащей помимо эритроцитов еще и тромбоциты и лейкоциты). Поэтому измерению эритроцитов должно предшествовать соответствующее разведение крови для уменьшения интерференции со стороны лейкоцитов. Кроме того, при увеличении числа лейкоцитов ошибка оценки эритроцитов прогрессивно нарастает, при лейкоцитозе более $50 \times 10^9/\text{л}$ может исказить показатель объема эритроцитов (MCV). Коэффициент вариации для данного параметра составляет 1-2%, а для некоторых приборов - менее 1 %.

Возможные ошибки измерения. Ложнозавышенные результаты наблюдаются при наличии в крови:

- гигантских тромбоцитов (с объемом более 30 фл);
- криоглобулинов.

Ложное занижение результатов может быть следствием:

- агглютинации эритроцитов;
- выраженного микроцитоза эритроцитов.

HGB(*hemoglobin*) - концентрация гемоглобина (г/дл или г/л) в большинстве гематологических анализаторов определяется спектрофотометрически гемиглобинцианидным методом. Коэффициент вариации при этом не превышает 2%.

Возможные ошибки измерения.

Завышение данного параметра наблюдается при:

- из-за повышенной мутности сыворотки при гиперлипидемии, гипербилирубинемии, криоглобулинемии и других причин. Различное влияние липемии на определение гемоглобина в приборах связано с техническими особенностями, а не с методологией. Величина результирующей ошибки сильно зависит от оптической геометрии прибора: размера выходного отверстия из кюветы для образцов и расстояния до фотодиода. Наиболее удачно, видимо, эта проблема решена в приборах фирмы Sysmex, поскольку влияние липемии на фотометрическое определение гемоглобина в приборах данной фирмы наименьшее;
- высоких лейкоцитозах (более $50 \times 10^9/\text{л}$);
- присутствии нестабильных гемоглобинов (Hb S, Hb C).

HCT(*hematocrit*) - гематокрит. В автоматических анализаторах крови HCT представлен суммой прямо измеренных объемов эритроцитов в единице объема крови и проблемы «остаточной» плазмы не существует. Коэффициент вариации для автоматического метода - менее 1 %, в сравнении с 1-2% при определении показателя методом центрифугирования.

Возможные ошибки измерения. Ложнозавышенные результаты могут наблюдаться при криоглобулинемии; присутствии гигантских тромбоцитов; гиперлейкоцитозе ($>50 \times 10^9/\text{л}$); гипергликемии (>600 мг/дл).

К ложному занижению получаемых результатов приводят агглютинация

эритроцитов; выраженный микроцитоз <36 фл) эритроцитов.

MCV (*mean corpuscular volume*) - средний объем эритроцита, выражается в кубических микрометрах (мкм^3) или в фемтолитрах (1 фл = 1 мкм^3). MCV определяется большинством гематологических анализаторов благодаря прямой зависимости амплитуды электрического импульса от объема клетки. Вычисляется MCV делением суммы клеточных объемов на число эритроцитов.

В то же время MCV - это средний показатель объема всей популяции клеток. Поэтому необходимо иметь в виду, что MCV может иметь нормальное значение при наличии у пациента одновременно выраженного макро- и микроцитоза. В этом случае особую диагностическую важность приобретает анализ гистограмм.

Возможные ошибки измерения. Ложное завышение MCV может происходить в случае:

- присутствия холодových агглютининов. Агглютинаты эритроцитов воспринимаются прибором как одна большая клетка, если их размер меньше верхнего порога эритроцитарного канала. Сохранение крови *in vitro* и измерение таких проб при 37°C способствует получению правильных результатов;
- диабетического кетоацидоза вследствие гиперосмолярности плазмы.

При разведении *in vitro* изотоническим раствором происходит быстрое набухание эритроцитов. В этом случае измерение гематокрита на гематокритной центрифуге является более точным.

Относительное снижение MCV может быть при повышенном содержании фрагментов эритроцитов в крови вследствие механического гемолиза, коагулопатии потребления и других причин.

MCH(*mean corpuscular hemoglobin*) - среднее содержание гемоглобина в эритроцитах (пг). Рассчитывается по формуле:

$$\text{MHC} = \frac{\text{гемоглобин (г/л)}}{\text{число эритроцитов (млн/мкл)}}$$

Характеризует среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците в абсолютных единицах. Результат выражают в пикограммах (пг), норма составляет 27-31 пг. МСН аналогичен цветовому показателю, но является более объективным параметром. Изменения МСН лежат в основе разделения анемий на нормо-, гипо- и гиперхромные.

Возможные ошибки измерения. Параметр МСН является расчетным, поэтому к ложнозавышенным результатам приводят все факторы, влияющие на завышение значений гемоглобина и занижение количества эритроцитов. Ложнозаниженные результаты мен получают вследствие ошибок, связанных с неправильным определением числа эритроцитов (завышения их количества) и занижения гемоглобина.

МСНС (*mean corpuscular hemoglobin concentration*) - средняя концентрация гемоглобина в эритроците (г/дл). Вычисляется путем деления концентрации гемоглобина в г/100 мл на гематокрит и умножения на 100:

$$\text{МСНС} = \frac{\text{гемоглобин } \left(\frac{\text{г}}{\text{дл}}\right)}{\text{гематокрит } (\%)} * 100(\text{г/дл})$$

Различия между двумя последними индексами заключаются в том, что МСН указывает на массу гемоглобина в одном эритроците и выражается в долях грамма (пикограммах). МСН показывает концентрацию гемоглобина в одном эритроците, т.е. соотношение содержания гемоглобина к объему клетки. Он отражает насыщение эритроцита гемоглобином и в норме составляет 30-38 г/дл. В отличие от МСНС МСН не зависит от клеточного объема и является чувствительным тестом при нарушениях процессов гемоглобинообразования. Предельная концентрация гемоглобина (38 г/дл) встречается редко. Увеличение концентрации гемоглобина может закончиться кристаллизацией его и гемолизом эритроцита.

Снижение значения МСНС наблюдается при заболеваниях,

сопровождающихся нарушением синтеза гемоглобина. Увеличение же параметра МСНС выше нормальных значений свидетельствует об ошибках, допущенных при измерении данной пробы (погрешности определения гемоглобина или MCV), т.к. превышение концентрации гемоглобина выше определенного физиологического уровня привело бы к разрушению (гемолизу) эритроцитов, чего не наблюдалось в данной пробе. Таким образом, данный параметр может быть использован и как индикатор ошибок, допущенных на аналитическом или преаналитическом этапах работы.

Возможные ошибки измерения. Поскольку параметр мене является расчетным, то к ложнозавышенным результатам приводят все факторы, влияющие на завышение значений гемоглобина и занижение гематокрита (последний связан с измерением объема эритроцитов). Ложнозаниженные результаты мене получаются вследствие неправильного определения объема эритроцитов (завышения их значения) и занижения гемоглобина.

Анализаторы серии «Technicon», работающие по принципу проточной цитометрии, непосредственно измеряют концентрацию гемоглобина в каждом отдельном эритроците и строят гистограммы распределения клеток не только по объему, но и по концентрации гемоглобина. При этом не только возрастает точность определения этого параметра, но и вводится новый показатель - ширина распределения эритроцитов по концентрации гемоглобина (**HDW** - hemoglobin distribution width), который характеризует гетерогенность эритроцитарного пула.

RDW (*red cell distribution width*) - показатель гетерогенности эритроцитов по объему, характеризует степень анизоцитоза. Этот показатель вычисляется большинством современных гематологических анализаторов, как коэффициент вариации объема эритроцитов:

$$RDW (\%) = \frac{SD}{MCV} * 100$$

где SD - стандартное среднеквадратическое отклонение объема

эритроцита от среднего значения.

RDW определяет величину колебания эритроцитов по объему, по этому параметру анизоцитоз улавливается прибором значительно быстрее, чем при визуальном просмотре мазка крови. Оценка степени анизоцитоза под микроскопом сопровождается целым рядом ошибок. При высыхании в мазках диаметр эритроцитов уменьшается на 10-20%. В толстых препаратах он меньше, чем в тонких. В то же время, показатель RDW характеризует колебания объема клеток внутри популяции и не связан с абсолютной величиной объема эритроцитов. Поэтому, при наличии в крови популяции эритроцитов с измененным, но достаточно однородным размером (например, микроциты), значения RDW могут быть в пределах нормы (11,5-14,5%).

FRC (*fragment red cells*) - подсчет фрагментов эритроцитов используется для оценки тромботических микроангиопатий

PLT (*platelet*) - количество тромбоцитов ($\times 10^9/\text{л}$). Автоматические счетчики крови анализируют тромбоциты и эритроциты без предварительной обработки. Это создает проблему дифференцирования больших форм тромбоцитов (макротромбоцитов) и сравнимых с ними по объему эритроцитов (микроцитов), их фрагментов (шизоцитов), а также отшнуровавшихся фрагментов цитоплазмы лейкоцитов (клеточный дебрис).

Существует несколько механизмов, предупреждающих подсчет одних элементов вместо других. Например, в приборах, использующих кондуктометрический метод, анализируется не только высота электрического импульса, но и его форма. Существует система дискриминаторов, определяющих высоту электрического сигнала, пропорциональную размеру частицы и ширину (длительность) импульсов. Все импульсы, соответствующие размерам частиц от 1,8 до 30,0 фл подсчитываются как тромбоциты. Если доля частиц с объемами в области 30 фл превышает запрограммированный порог, то выводится на экран сообщение «Micro RBC», либо «Macro PLT». При этом достоверность определения количества тромбоцитов снижена.

Возможные ошибки измерения. Ложное занижение числа тромбоцитов может давать агрегация или агглютинация тромбоцитов при наличии тромбоцитарных агглютининов и прилипанию тромбоцитов к лейкоцитам (тромбоцитарный «сателлизм»), Агрегация тромбоцитов особенно выражена при взятии крови с использованием гепарина в качестве антикоагулянта. Многие исследователи предлагают использовать только один стандартный антикоагулянт - K_2 ЭДТА в концентрации 1,5-2,2 мг на 1 мл крови. Однако и это не спасает от появления артефактов. При наличии аутоантител к тромбоцитам ЭДТА индуцирует агрегацию тромбоцитов, что проявляется псевдотромбоцитопенией. Тщательно выполненный подсчет тромбоцитов методом фазово-контрастной микроскопии обычно используется в качестве референтного метода, но он характеризуется большим коэффициентом вариации 7-23%. Для большинства современных гематологических анализаторов коэффициент вариации этого показателя не превышает 2-4%.

MPV (mean platelet volume) - средний объем тромбоцитов выражается в фемтолитрах (фл) или $мкм^3$. В норме этот показатель варьирует от 7,4 до 10,4 фл и имеет тенденцию к увеличению с возрастом: с 8,6-8,9 фл у детей 1- 5 лет до 9,5-10,6 фл у людей старше 70 лет. «Молодые» кровяные пластинки имеют больший объем, поэтому при ускорении тромбоцитопоэза средний объем тромбоцитов возрастает. Увеличение среднего объема тромбоцитов наблюдается при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре, гипертиреозе, атеросклерозе, сахарном диабете, у курильщиков и лиц, страдающих алкоголизмом. Транзиторная макротромбоцитемия описана у рабочих, контактирующих с асфальтовыми испарениями, лиц, работающих с ракетным топливом. Крупные тромбоциты с аномальной морфологией появляются при миелопролиферативных заболеваниях. Уменьшение этого показателя отмечается после спленэктомии и при синдроме Вискотта-Олдрича. В течение первых двух часов после взятия крови с ЭДТА происходит набухание тромбоцитов с изменением их объема и соответственно увеличение

MPV.

PDW (platelet distribution width) - ширина распределения тромбоцитов по объему, измеряется в процентах (коэффициент вариации тромбоцитометрической кривой) и количественно отражает гетерогенность популяции этих клеток по размерам (степень анизоцитоза тромбоцитов). В норме этот показатель составляет 10-20%. Изменяется при миелопролиферативных заболеваниях.

PCT (platelet crit - тромбокрит) является параметром, который отражает долю объема цельной крови, занимаемую тромбоцитами, выражается в процентах. В норме тромбокрит составляет 0,15-0,40%.

Диагностическое значение тромбоцитарных индексов в настоящее время не определено.

Тестовые задания

Укажите один или несколько правильных ответов

1. К ДЕГЕНЕРАТИВНЫМ ИЗМЕНЕНИЯМ ЛЕЙКОЦИТОВ ОТНОСЯТСЯ
 - 1) токсогенная зернистость
 - 2) анизоцитоз
 - 3) тельца Гейнца
 - 4) гиперсегментация ядер
 - 5) тельца Жолли и кольца Кабо
2. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЛЕЙКОЦИТОЗ НАБЛЮДАЕТСЯ ПРИ
 - 1) инфаркте миокарда
 - 2) пневмонии
 - 3) переломах костей
 - 4) у новорожденных
 - 5) острой постгеморрагической анемии.
3. ОСНОВНЫМ МЕХАНИЗМОМ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ЛЕЙКОЦИТОЗА ЯВЛЯЕТСЯ
 - 1) перераспределение крови в сосудистом русле
 - 2) стимуляция лейкопоэза
 - 3) эмиграция лейкоцитов
 - 4) диапедез лейкоцитов
 - 5) фагоцитоз лейкоцитов
4. ЭОЗИНОФИЛИЯ ХАРАКТЕРНА
 - 1) для острого гнойного процесса
 - 2) для бронхиальной астмы
 - 3) сепсиса
 - 4) для инфекционного мононуклеоза
 - 5) для кори
5. ЭОЗИНОФИЛИЯ ХАРАКТЕРНА ДЛЯ
 - 1) Острого гнойного процесса.

- 2) Глистной инвазии.
 - 3) Сепсиса.
 - 4) Инфекционного мононуклеоза.
 - 5) Инфаркта миокарда.
6. ЭОЗИНОФИЛЬНЫЙ ЛЕЙКОЦИТОЗ НАБЛЮДАЕТСЯ ПРИ
- 1) гнойном воспалении
 - 2) аллергии
 - 3) инфаркте миокарда
 - 4) острой постгеморрагической анемии
 - 5) глистных инвазиях
7. ЛИМФОЦИТОЗ ХАРАКТЕРЕН
- 1) для туберкулеза
 - 2) для гнойно-септических заболеваний
 - 3) для кори
 - 4) для бронхиальной астмы
 - 5) для инфаркта миокарда
8. ЛИМФОЦИТОЗ НАБЛЮДАЕТСЯ ПРИ
- 1) гнойном воспалении
 - 2) острой постгеморрагической анемии
 - 3) туберкулезе
 - 4) глистной инвазии
 - 5) бруцеллезе
9. ПРИ ОСТРОМ ГНОЙНОМ ВОСПАЛЕНИИ НАБЛЮДАЕТСЯ
- 1) эозинофильный лейкоцитоз
 - 2) базофильный лейкоцитоз
 - 3) нейтрофильный лейкоцитоз
 - 4) моноцитарный лейкоцитоз
 - 5) лимфоцитарный лейкоцитоз.

10. ЯДЕРНЫМ НЕЙТРОФИЛЬНЫМ СДВИГОМ ВЛЕВО НАЗЫВАЕТСЯ
УВЕЛИЧЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ В КРОВИ

- 1) агранулоцитов
- 2) гранулоцитов
- 3) незрелых форм нейтрофилов
- 4) зрелых форм нейтрофилов
- 5) гиперсегментированных форм нейтрофилов

11. ЯДЕРНЫЙ СДВИГ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФОРМУЛЫ ВЛЕВО
СВИДЕТЕЛЬСТВУЕТ О (ОБ)

- 1) увеличении процентного содержания сегментоядерных нейтрофилов
- 2) увеличении процентного содержания лимфоцитов и моноцитов
- 3) увеличении процентного содержания молодых нейтрофилов(метамиелоцитов и палочкоядерных)
- 4) снижении процентного содержания молодых форм нейтрофилов
- 5) снижении процентного содержания лимфоцитов и моноцитов

12. НЕЙТРОФИЛЬНЫЙ ЛЕЙКОЦИТОЗ С РЕГЕНЕРАТИВНЫМ ЯДЕРНЫМ
СДВИГОМ ВЛЕВО - ЭТО

- 1) лейкоцитоз с увеличением содержания палочкоядерных нейтрофилов
- 2) лейкоцитоз с преобладанием гиперсегментированных нейтрофилов
- 3) лейкоцитоз с увеличением содержания палочкоядерных нейтрофилов и появлением метамиелоцитов
- 4) появление в гемограмме миелобластов
- 5) появление в гемограмме миелоцитов.

13. НЕЙТРОФИЛЬНЫЙ ЛЕЙКОЦИТОЗ С ГИПЕРРЕГЕНЕРАТИВНЫМ
ЯДЕРНЫМ СДВИГОМ ВЛЕВО ОБЫЧНО РАЗВИВАЕТСЯ ПРИ

- 1) лучевой болезни
- 2) аплазии костного мозга
- 3) отравлении бензолом

4) тяжелых гнойно-септических процессах

5) голодании

14. УВЕЛИЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ В КРОВИ ПАЛОЧКОЯДЕРНЫХ И ПОЯВЛЕНИЕ МЕТАМИЕЛОЦИТОВ НАЗЫВАЮТ

1) ядерным сдвигом вправо

2) дегенеративным ядерным сдвигом влево

3) гиперрегенеративным ядерным сдвигом влево

4) регенеративным ядерным сдвигом влево

5) агранулоцитозом

15. ПОНЯТИЮ "ЛЕЙКОПЕНИЯ" СООТВЕТСТВУЕТ СОДЕРЖАНИЕ ЛЕЙКОЦИТОВ В КРОВИ

1) $5 \times 10^9/\text{л}$

2) $3 \times 10^9/\text{л}$

3) $100 \times 10^9/\text{л}$

4) $8 \times 10^9/\text{л}$

5) $8 \times 10^{12}/\text{л}$.

16. ЛЕЙКОПЕНИЯ НАИБОЛЕЕ ЧАСТО РАЗВИВАЕТСЯ ЗА СЧЕТ УМЕНЬШЕНИЯ

1) лимфоцитов

2) моноцитов

3) нейтрофилов

4) базофилов

5) эозинофилов.

17. ЛЕЙКОПЕНИЯ МОЖЕТ РАЗВИТЬСЯ ПРИ

1) аллергии

2) глистных инвазиях

3) лучевой болезни

4) эмоциональном возбуждении

5) лейкомоидных реакциях

18. ДЛИТЕЛЬНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ЦИТОСТАТИКОВ ПРИВОДИТ К

1) моноцитозу

2) лимфоцитозу

3) эозинофилии

4) базопении

5) нейтропении

19. ЛЕЙКОПЕНИЯ ПРИ ПРИЕМЕ СУЛЬФАНИЛАМИДОВ СВЯЗАНА С

1) разрушением лейкоцитов антителами

2) гиперспленизмом

3) снижением образования гемопоэтических факторов

4) потерей способности клеток-предшественников гемопоэза к дифференцировке

5) перераспределением лейкоцитов.

20. АГРАНУЛОЦИТОЗ - ЭТО

1) увеличение числа лимфоцитов и моноцитов в крови

2) резкое снижение числа нейтрофилов и эозинофилов в крови

3) увеличение числа агранулоцитов

4) увеличение в крови числа гиперсегментированных нейтрофилов

5) резкое снижение числа ретикулоцитов в крови

21. КЛАССИЧЕСКИМ КЛИНИЧЕСКИМ ПРОЯВЛЕНИЕМ

АГРАНУЛОЦИТОЗА ЯВЛЯЕТСЯ

1) язвенная болезнь желудка

2) язвенно-некротическая ангина

3) трофические язвы кожи

4) язвенная болезнь 12-перстной кишки

5) язвенный конъюнктивит.

22. ЛЕЙКОПЕНИЯ МОЖЕТ ПРИВЕСТИ К

- 1) понижению свертывания крови
- 2) понижению резистентности организма
- 3) развитию сенсбилизации организма
- 4) развитию лейкоза
- 5) ретикулоцитозу

23. К ПОСЛЕДСТВИЯМ РЕЗКО ВЫРАЖЕННОЙ ДЛИТЕЛЬНОЙ ЛЕЙКОПЕНИИ ОТНОСЯТСЯ

- 1) усиление фагоцитоза
- 2) нарушение иммунитета
- 3) снижение антибластной резистентности
- 4) генерализация инфекций
- 5) усиление процессов регенерации

24. ЛЕЙКОЦИТЫ- $17,0 \times 10^9/\text{л}$

НЕЙТРОФИЛЫ: МЕТАМИЕЛОЦИТЫ-4%, ПАЛОЧКОЯДЕРНЫЕ-6%, СЕГМЕНТОЯДЕРНЫЕ-60%, ЭОЗИНОФИЛЫ-1,5%, БАЗОФИЛЫ-0%, ЛИМФОЦИТЫ-15%, МОНОЦИТЫ-3,5%. ДАННАЯ ЛЕЙКОГРАММА УКАЗЫВАЕТ НА

- 1) нейтрофильный лейкоцитоз с гипорегенеративным ядерным сдвигом влево, относительной лимфоцитоз
- 2) нейтрофильный лейкоцитоз с регенеративным ядерным сдвигом влево, относительная лимфоцитопения
- 3) лейкопения, агранулоцитоз
- 4) эозинофильный лейкоцитоз
- 5) нейтрофильный лейкоцитоз с гиперрегенеративным ядерным сдвигом влево.

25. ЗАКЛЮЧЕНИЕМ ПО ЛЕЙКОГРАММЕ ЯВЛЯЕТСЯ

ЛЕЙКОЦИТЫ- $3 \times 10^9/\text{л}$, НЕЙТРОФИЛЫ: ПАЛОЧКОЯДЕРНЫЕ-1%, СЕГМЕНТОЯДЕРНЫЕ-69%, ЭОЗИНОФИЛЫ-1%, БАЗОФИЛЫ-0%,

ЛИМФОЦИТЫ-27%, МОНОЦИТЫ-2%. ГИПЕРСЕКМЕНТАЦИЯ ЯДЕР
НЕЙТРОФИЛОВ.

- 1) лейкопения с угнетением гранулоцитопоза
- 2) эозинофильный лейкоцитоз
- 3) лимфоцитоз
- 4) лейкоцитоз с ядерным сдвигом влево
- 5) лейкограмма без отклонений от нормы.

26.КАКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ СОПРОВОЖДАЮТСЯ ЭОЗИНОФИЛИЕЙ

- 1) поллинозы
- 2) эхинококкоз печени
- 3) хронический лимфолейкоз
- 4) бактериальная пневмония
- 5) хронический миелолейкоз

27.КАКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ СОПРОВОЖДАЮТСЯ ЭОЗИНОФИЛЬНЫМ
ЛЕЙКОЦИТОЗОМ

- 1) острый аппендицит
- 2) атопическая бронхиальная астма
- 3) трихинеллез
- 4) описторхоз
- 5) острый гнойный отит

28.КАКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧАСТО СОПРОВОЖДАЮТСЯ РАЗВИТИЕМ
МОНОЦИТОЗА

- 1) корь
- 2) брюшной тиф
- 3) инфаркт миокарда
- 4) инфекционный мононуклеоз
- 5) краснуха

29.УКАЖИТЕ, КАКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ СОПРОВОЖДАЮТСЯ
ОТНОСИТЕЛЬНЫМ ЛИМФОЦИТОЗОМ

- 1) иммунная форма агранулоцитоза
- 2) вирусные инфекции
- 3) туберкулез
- 4) гипопластическая анемия
- 5) инфекционный мононуклеоз

30. ПРИ КАКИХ СОСТОЯНИЯХ НАБЛЮДАЕТСЯ НЕЙТРОФИЛЬНЫЙ ЛЕЙКОЦИТОЗ С РЕГЕНЕРАТИВНЫМ ЯДЕРНЫМ СДВИГОМ ВЛЕВО

- 1) миогенном лейкоцитозе
- 2) пищеварительном лейкоцитозе
- 3) крупозной пневмонии
- 4) аппендиците

31. ПАТОЛОГИЧЕСКИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫЙ ЛЕЙКОЦИТОЗ НАБЛЮДАЕТСЯ ПРИ

- 1) фурункулезе
- 2) беременности
- 3) отите
- 4) чувстве страха
- 5) инфаркте миокарда

32. КАКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В НЕЙТРОФИЛАХ МОЖНО СЧИТАТЬ ПРОЯВЛЕНИЕМ ИХ ДЕГЕНЕРАЦИИ

- 1) наличие в цитоплазме грубо выраженной зернистости +2) наличие в цитоплазме пылевидной зернистости
- 3) палочковидное ядро
- 4) вакуолизация цитоплазмы
- 5) пикноз ядра

33. К ФИЗИОЛОГИЧЕСКИМ ЛЕЙКОЦИТОЗАМ ОТНОСЯТСЯ

- 1) миогенный
- 2) воспалительный
- 3) пищеварительный

4) инфекционный

5) новорожденных

34. КАКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
НАБЛЮДАЮТСЯ ПРИ АГРАНУЛОЦИТОЗЕ

1) значительное уменьшение в крови нейтрофилов

2) нейтрофилия

3) анэозинофилия

4) абсолютный лимфоцитоз

5) относительный лимфоцитоз

Эталоны ответов к тестовым заданиям

1-1,2,4

2-4

3-2

4-2

5-2

6-2,5

7-1

8-3,5

9-3

10-3

11-3

12-3

13-4

14-4

15-2

16-3

17-3

18-5

19-1

20-2

21-2

22-2

23-2,3,4

24-2

25-1

26-1,2,5

27-2,3,4

28-1,4,5

29-1,4

30-3

31-1,3,5

32-1,4,5

33-1,3,5

34-3,5

Рекомендуемая литература

1. Фред Дж. Шиффман. «Патофизиология крови». «Бином», М., 2001.
2. Шитикова А.С. Тромбоцитарный гемостаз. СПб. ГМУ, 2000.
3. Баркаган З.С., Момот А.Л. «Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза». «Ньюдиамед», М., 2001.
4. Клиническая биохимия. Под ред. В.А. Ткачука. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 512с.
5. Лабораторная гематология. – М. Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2006.- 224с.
6. Сидельникова В.М., Шмаков Р.Г. «Механизмы адаптации и дезадаптации гемостаза при беременности». «Триада Х», М., 2004.
7. Папаян Л.П. Новое в представлении процесса свертывания крови// Трансфузиология. 2004. Т. 5, № 3. С. 7-22.