

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

Учреждение образования
«Гродненский государственный медицинский университет»

Кафедра
клинической лабораторной диагностики и иммунологии

Т. П. Стемпень, С. В. Лелевич

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ГЕМАТОЛОГИЯ

*Пособие для студентов
медико-диагностического факультета
(специальность 1-79 01 04 «Медико-диагностическое дело»)
с приложением на компакт-диске*

Гродно
Гродно
2016

УДК 616.15-073(075.8)

ББК 54.11я73

С 79

Рекомендовано Центральным научно-методическим советом
ГрГМУ (протокол № 2 от 10.12.2015)

Авторы: ст. преп. каф. клинической лабораторной диагностики и
иммунологии Т. П. Степень;
доц. каф. клинической лабораторной диагностики и
иммунологии, канд. мед. наук С. В. Лелевич.

Рецензент: зав. каф. патологической анатомии, д-р мед. наук.
проф. В. А. Басинский.

Степень, Т.П.

С 79

Клиническая лабораторная гематология : пособие
для студентов медико-диагностического факультета
(специальность 1-79 01 04 «Медико-диагностическое
дело») с приложением на компакт-диске /
Т. П. Степень, С. В. Лелевич. – Гродно : ГрГМУ, 2016 –
232 с.

ISBN 978-985-558-654-9.

ISBN 978-985-558-655-6 (приложение).

В пособии отражены вопросы общей и частной гематологии, основные правила организации и проведения гематологических исследований. Обсуждаются аспекты лабораторной диагностики заболеваний системы крови с учетом современного уровня развития науки, техники, технологий.

По содержанию пособие полностью соответствует содержанию типовой программы и учебной программе по дисциплине «Общеклинический анализ и лабораторная гематология».

Пособие предназначено для студентов медико-диагностического факультета.

УДК 616.15-073(075.8)

ББК 54.11я73

ISBN 978-985-558-654-9

ISBN 978-985-558-655-6 (приложение)

© Степень Т. П., Лелевич С. В., 2015

© ГрГМУ, 2016

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
Общая гематология	6
Особенности преаналитического этапа гематологических исследований	6
Общие представления о кроветворении	11
Исследование костного мозга	15
Эритропоэз	19
Гранулоцитопоэз	49
Моноцитопоэз	68
Мегакариоцитопоэз.....	75
Лимфоцитопоэз	92
Частная лабораторная гематология	101
Гемобласты	101
Лабораторная диагностика острых лейкозов.....	106
Лабораторная диагностика хронических миелопролиферативных неоплазий	125
Лабораторная диагностика хронических лимфопролиферативных неоплазий.....	142
Лабораторная диагностика миелодиспластических синдромов	165
Анемии	173
Лабораторная диагностика железодефицитных анемий	173
Лабораторная диагностика сидеробластных анемий	182
Лабораторная диагностика мегалобластных анемий	189
Лабораторная диагностика фолиеводефицитной анемии	199
Лабораторная диагностика гемолитических анемий	201
Лабораторная диагностика апластических анемий.....	221
Список использованных источников	231

АВТОРЫ:

СТЕМПЕНЬ

Татьяна Петровна

старший преподаватель кафедры клинической лабораторной диагностики и иммунологии УО «Гродненский государственный медицинский университет». Автор более 20 печатных работ, 2 патентов. Врач высшей квалификационной категории.

ЛЕЛЕВИЧ

Сергей Владимирович

доцент кафедры клинической лабораторной диагностики и иммунологии УО «Гродненский государственный медицинский университет». Автор 250 печатных работ, в том числе 7 монографий, 100 научных статей, 25 учебно-методических пособий, 2 патентов на изобретение. Стипендиат специального фонда Президента Республики Беларусь. Врач высшей квалификационной категории

ВВЕДЕНИЕ

Гематологические методы диагностики традиционно являются самыми массовыми видами исследования. Визуальные исследования с применением микроскопической техники требуют, с одной стороны, индивидуальных навыков, с другой – значимым является субъективный фактор. В последнее время эти виды исследования в нашей стране получили мощное техническое подкрепление в виде компьютеризованных анализаторов изображения на основе данных цифровых видеокамер и программ обработки изображений. В настоящее время для подсчета и анализа клеток крови во многих клиничко-диагностических лабораториях Республики Беларусь используют гематологические анализаторы разного уровня сложности. Преимуществом современных технологий подсчета и оценки форменных элементов крови является: высокая производительность (до 100-120 проб в час), небольшой объем крови для анализа (12-150 мкл), исследование большого массива (десятки тысяч) клеток, определение с высокой точностью и воспроизводимостью двадцати и более параметров анализа крови одновременно, графическое представление результатов исследований (гистограммы, скетограммы). Лабораторные гематологические исследования являются одним из важнейших разделов лабораторной диагностики в учреждениях здравоохранения. Их выполнение проводится как в рамках общеклинических исследований, так и на специализированных гематологических участках клиничко-диагностических лабораторий. Информация, полученная при использовании гематологических методов исследования, позволяет судить о динамике развития патологического процесса, что необходимо для своевременной диагностики заболевания, а также оценки эффективности проводимой терапии.

Наиболее важные из заболеваний, диагностируемые гематологическими методами – опухолевые заболевания кроветворной ткани, анемии и др. Повсеместно гематологические тесты используются для оценки реакции организма на многие заболевания (не самой системы крови), определяя тяжесть течения и эффективность их лечения.

ОБЩАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ГЕМАТОЛОГИЯ

Особенности преаналитического этапа гематологических исследований

Контроль преаналитических факторов в гематологических исследованиях является ключевым для обеспечения качественных результатов тестов. Отклонения от стандартов при взятии пробы, транспортировке и хранении образца, а также факторы, связанные с пациентом, могут привести к неверным или неточным результатам анализов и, следовательно, к постановке ошибочного диагноза. До 70% лабораторных ошибок связаны именно с преаналитическим этапом исследования крови. За счет снижения числа ошибок на любом этапе преаналитической подготовки существенно улучшает качество гематологических исследований, снижает количество повторных проб, сокращает расходы рабочего времени и средств на обследование пациентов.

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 забирается, а в последующем в них хранится и транспортируется кровь. Кровь для клинического анализа берут у пациента из пальца, вены или из мочки уха, у новорожденных – из пятки. Материал следует брать натощак, между 7 и 9 часами утра, при минимальной физической активности непосредственно перед взятием (в течение 20-30 мин.), в положении пациента лежа или сидя. Взятие материала следует проводить в резиновых перчатках, соблюдая правила асептики.

Венозная кровь считается лучшим материалом для клинического исследования. При известной стандартизации процессов взятия, хранения, транспортировки венозной крови удается добиться минимальной травматизации и активации клеток, примеси тканевой жидкости, при этом всегда имеется возможность повторить и/или расширить анализ, например, добавив исследование ретикулоцитов. Достоверность и точность

гематологических исследований, проводимых из венозной крови, во многом определяется техникой ее взятия.

Подготовка пациента к взятию крови из вены включает несколько этапов. Место венепункции нужно продезинфицировать марлевой салфеткой или специальной безворсовой салфеткой, смоченной 70% спиртом и подождать до полного высыхания антисептика (30-60 сек.). Применение ватных тампонов и других волокнистых материалов подобного рода может привести к засорению волокнами счетной и гемоглобиновой камер, что влечет снижение точности и воспроизводимости измерения. Не рекомендуется использовать 96% спирт, так как он дубит кожу, поры кожи закрываются, и стерилизация может быть неполной. Не рекомендуется вытирать и обдуть место прокола, 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. Необходимо следить, чтобы в момент взятия крови кулак пациента был разжат. Жгут следует накладывать не более чем на 1-2

минуты, тем самым обеспечивается минимальный стаз, при котором клетки крови не повреждаются. Игла должна быть достаточно большого диаметра и иметь короткий срез, чтобы не травмировать противоположную стенку вены во избежание тромбоза. После взятия крови необходимо приложить сухую стерильную салфетку к месту венепункции, а затем наложить давящую повязку на руку или бактерицидный пластырь.

У ряда 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. Следует помнить, что применение в качестве антикоагулянтов гепарина или цитрата натрия сопровождается структурными изменениями клеток и поэтому они не рекомендуются для использования как при автоматизированном, так и морфологическом исследовании крови. 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% раствором цитрата натрия в соотношении 4:1. С этой же целью может использоваться венозная кровь, взятая с ЭДТА (1,5 мг/мл) и затем разведенная цитратом натрия в соотношении 4:1. Сразу после заполнения пробирки кровью до указанного на ней объема пробу следует осторожно перемешать плавным переворачиванием и вращением пробирки в течение не менее 2 мин. (пробирку с ЭДТА – 8-10 раз, пробирку с цитратом натрия для определения СОЭ – также 8-10 раз).

Капиллярную кровь для гематологических исследований рекомендуется брать в следующих случаях:

- ✓ при ожогах, занимающих большую площадь поверхности тела пациента;
- ✓ при выраженном ожирении пациента;
- ✓ при установленной склонности к венозному тромбозу;
- ✓ у новорожденных.

Место пункции необходимо просушить для удаления остатков спирта, поскольку он может вызвать гемолиз. Применение ватных тампонов и других волокнистых материалов не рекомендовано, поскольку это приводит к засорению волокнами счетных и гемоглобиновой камер. В результате точность и воспроизводимость измерения падает. Первую каплю крови, полученную после прокола кожи, следует удалить тампоном, поскольку она содержит примесь тканевой жидкости. Кровь должна 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 материала к раневой поверхности прикладывается новый стерильный тампон, смоченный 70% спиртом. Тампон следует удерживать, пока не прекратится кровотечение. При прикосновении края пробирки к месту пункции капли крови начинают стекать в нее под действием капиллярного эффекта. После завершения сбора материала пробирку следует плотно закрыть. Необходимым условием для обеспечения качественной пробы является ее обязательное немедленное перемешивание с антикоагулянтом осторожным переворачиванием пробирки до 10 раз. В случае последовательного взятия капиллярной крови в несколько

микропробирок необходимо соблюдать определенный порядок их заполнения. Последовательность взятия материала такова: в первую очередь заполняются пробирки с ЭДТА, затем с другими реактивами и в последнюю очередь заполняются пробирки для исследования сыворотки крови.

Основные рекомендации при работе с капиллярной кровью:

- ✓ при взятии в пробирку с антикоагулянтом не допускается стекание крови по коже пальца, стенке пробирки и любой другой поверхности, так как мгновенно происходит контактная активация прогресса свертывания;
- ✓ кровь самотеком из прокола должна попадать прямо в антикоагулянт, перемешиваясь с ним;
- ✓ нельзя выдавливать кровь из пальца во избежание спонтанной агрегации тромбоцитов и попадания в пробу большого количества межтканевой жидкости (тканевого тромбопластина).

Следует отметить, что при взятии капиллярной крови возможен ряд особенностей, которые бывает весьма трудно стандартизировать:

- ✓ физиологические (холодные, цианотичные пальцы);
- ✓ методические (малый объем исследуемой крови и в связи с этим необходимость разведения образца для анализа на гематологическом анализаторе и др.)

Доставка, хранение биоматериала и пробоподготовка

Для обеспечения качественного результата исследований нужно четко контролировать время и условия хранения проб до выполнения анализа. Кровь нельзя замораживать. Капиллярную кровь с ЭДТА следует хранить при комнатной температуре и анализировать в течение 4-х часов после взятия. При необходимости проведения отсроченного анализа пробы крови хранят в холодильнике и исследуют в течение 24-х часов. Однако при этом следует учитывать, что 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, но при наличии патологических клеток последние могут изменяться или даже

разрушаться в течение нескольких часов с момента взятия крови. Непосредственно перед исследованием кровь должна быть тщательно перемешана в течение нескольких минут для разведения антикоагулянта и равномерного распределения форменных элементов в плазме.

Кровь, хранившуюся в холодильнике, необходимо согреть до комнатной температуры, так как при низкой температуре увеличивается вязкость, а форменные элементы имеют тенденцию к склеиванию, что в свою очередь приводит к нарушению перемешивания и неполному лизису.

Приготовление мазков крови рекомендуется делать не позднее 1-2 часов после ее взятия. Следует помнить, что при выполнении гематологических исследований на значительном удалении от места взятия крови неизбежно возникают проблемы, связанные с неблагоприятными условиями транспортировки. Тряска, вибрация, постоянное перемешивание, нарушения температурного режима, возможные проливы и загрязнения проб могут оказывать существенное влияние на качество анализов. В таких случаях должен быть четко отработан алгоритм транспортировки материала в клиничко-диагностическую лабораторию.

Влияние преаналитических факторов, зависящих от пациента

На результаты гематологических исследований могут влиять факторы, связанные с индивидуальными особенностями и физиологическим состоянием организма пациента. Изменения клеточного состава периферической крови наблюдаются не только при различных заболеваниях, они также зависят от возраста, пола, диеты, курения и употребления алкоголя, менструального цикла, беременности, физической нагрузки, эмоционального состояния и психического стресса, циркадных и сезонных ритмов; климатических и метеорологических условий; положения пациента в момент взятия крови; приема фармакологических препаратов и др. Так, например, число эритроцитов и концентрация гемоглобина у новорожденных выше, чем у взрослых. С увеличением высоты над уровнем моря значительное повышение наблюдается для гематокрита и

гемоглобина (до 8% на высоте 1400 м). Физические упражнения могут приводить к существенным изменениям числа лейкоцитов, обусловленным гормональными сдвигами. У пациентов 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%. Этот эффект обусловлен переходом жидкости из сосудистого русла в ткани в результате повышения гидростатического давления. Выраженная диарея и рвота могут приводить к значительной дегидратации и гемоконцентрации. После регидратации наблюдается снижение гемоглобина и гематокрита, что может быть ошибочно принято за кровопотерю. Для устранения или сведения к минимуму влияния этих факторов кровь для повторных анализов необходимо брать в тех же условиях, что при первом исследовании.

Общие представления о кроветворении

Гемопоз – это система с плавным, непрерывным обновлением кроветворных клеток за счет сбалансированности процессов их образования и разрушения. Нормальное кроветворение поликлональное, т.е. осуществляется одновременно многими клонами, которые полностью меняются в течение 1-4 месяцев (около 10% клонов существует до полугода). Постоянная замена клонов объясняется истощением пролиферативного потенциала стволовой клетки, так как исчезнувшие клоны никогда не появляются вновь.

В настоящее время предложена иерархическая модель гемопоза, согласно которой все кроветворные клетки происходят из относительно небольшого числа гемопозитических стволовых клеток через последовательные этапы образования промежуточных клеток-предшественников (см. CD-диск). Мультипотентная стволовая клетка обладает способностью к самообновлению и дифференцировке в клетки – предшественники, которые постепенно ограничивают свой дифференцировочный и пролиферативный потенциал в пределах одной клеточной линии. По мере созревания число клеток в пределах одного ростка резко увеличивается. Конечной целью

кровообразования является образование зрелых, функционально полноценных гемопоэтических клеток.

Основным органом гемопоэза является костный мозг. Кровотворный костный мозг располагается среди элементов кости и стромы, являющихся его микроокружением. Костная ткань ограничивает зону кроветворения и представлена остеобластами, остеокластами и остеоцитами. Строму образуют:

- производные мезенхимы, которые представлены большим количеством клеток - адипоцитами, фибробластами, эпителиальными, эндотелиальными, адвентициальными и ретикулярными клетками;

- капиллярная сеть, в которой различают питающие и функциональные капилляры;

- нервные окончания;

- производные стромы – внеклеточный матрикс, включающий коллагеновые, ретикулиновые волокна и нерастворимые белки – ламинин, фибронектин, тромбоспонин, гликозаминогликаны, гликопротеины и другие.

Костные трабекулы, клетки стромы и в первую очередь фибробласты, эндотелиальные, адвентициальные клетки образуют в костях полости, синусоиды, в которых располагаются кроветворные клетки, являющиеся паренхимой костного мозга. Определенная топография кроветворных клеток обусловлена «инстинктом дома» – способностью распознавать соответствующие клетки стромы благодаря наличию рецепторов на поверхности мембраны гемопоэтических клеток. Синусоиды имеют общие стенки с венозными синусами. Со стороны венозного синуса стенки выстланы эндотелием, со стороны синусоида – клетками стромы (адвентициальными, адипоцитами), между эндотелием и стромой находится базальная мембрана. Эндотелиальные клетки образуют поры 1-2 мкм, через которые из костного мозга в кровеносное русло могут проникать только зрелые кроветворные клетки, обладающие эластичностью.

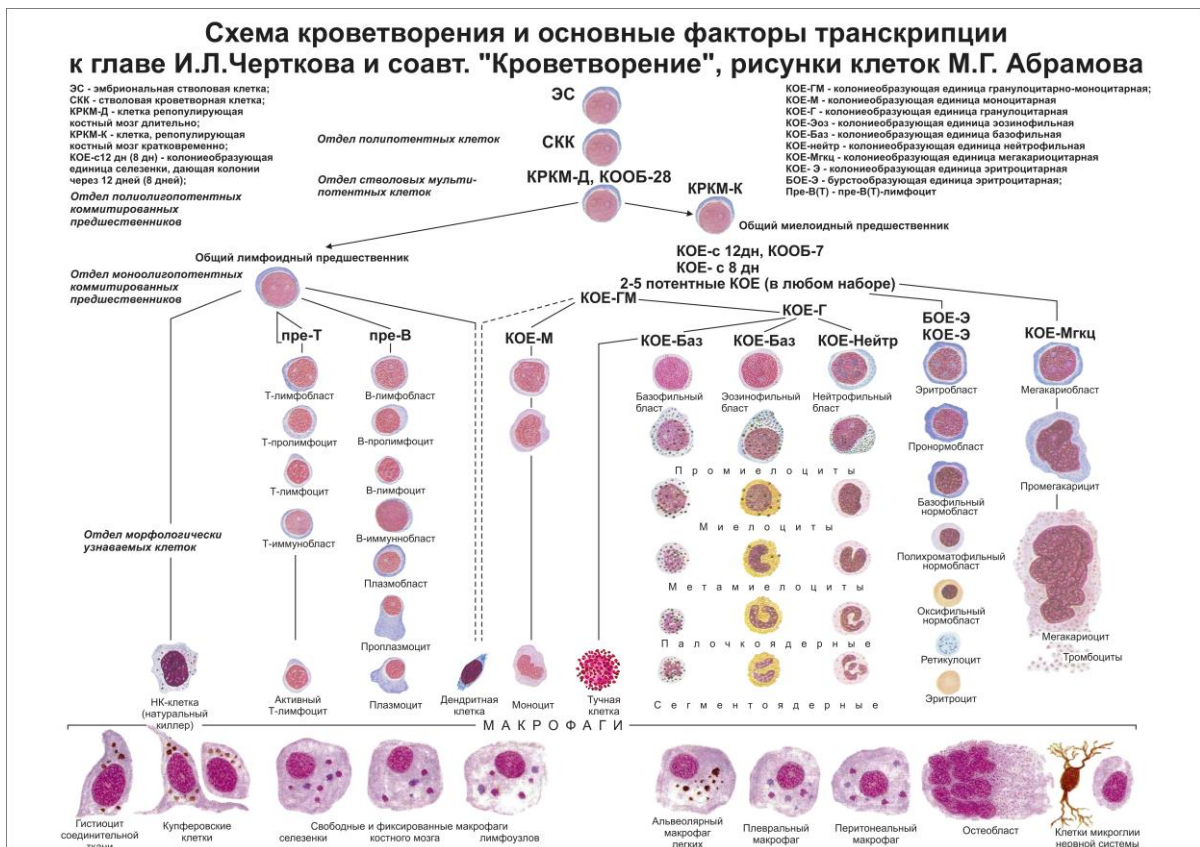


Рисунок 1. – Схема кроветворения

Гемопоэтическая стволовая клетка характеризуется:

- ✓ способностью к самообновлению и самоподдержанию;
- ✓ высоким, но ограниченным пролиферативным потенциалом;
- ✓ способностью к дифференцировке во все без исключения линии гемопоэза;
- ✓ способностью к миграции;
- ✓ наличием характерного иммунофенотипа (СД 34+).

Истинные гемопоэтические клетки представляют собой небольшую популяцию, которая вместе с клетками предшественниками в костном мозге составляет 0,05%. Гемопоэтические клетки способны к формированию колоний из бластных клеток и полному восстановлению гемопоэза. Большинство из них, имея огромный пролиферативный потенциал, находится в состоянии покоя, выход из которого приводит к снижению способности к пролиферации и ограничению дифференцировочных возможностей клетки. Гемопоэтические стволовые клетки после нескольких циклов деления способны вернуться в состояние покоя. По мере

снижения пролиферативного потенциала гемопоэтические клетки дифференцируются в мультипотентные клетки-предшественники, коммитированные к дифференцировке в определенном направлении – в общий предшественник миело- или лимфопоэза. Из общего миелоидного предшественника образуются олигопотентные клетки-предшественники грануло-мономакрофагального ростка. Общий предшественник лимфопоэза дает начало клеткам-предшественникам четырех классов – В-лимфоцитам, Т-лимфоцитам НК-клеткам и дендритным лимфоидным клеткам. Унипотентные коммитированные предшественники являются родоначальниками одного ростка гемопоэза: например, КОЕ-Г – для гранулоцитарного, КОЕ-М – для моноцитарно-макрофагального, КОЕ-Э, БОЕ-Э – предшественники эритроидных клеток, КОЕ-мгкц – предшественники мегакариоцитов и т. д. Все коммитированные клетки-предшественники не обладают способностью к самообновлению, самоподдержанию, не способны возвращаться в состояние клеточного покоя. К морфологически распознаваемым кроветворным клеткам относятся дифференцирующиеся, созревающие и зрелые клетки восьми клеточных линий, начиная с бластов, большинство из которых имеют характерные морфоцитохимические особенности (см. схему кроветворения на компакт-диске.)

Гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники обладают способностью мигрировать в кровотоки и возвращаться обратно в костный мозг, обеспечивая обмен кроветворных клеток между разобщенными кроветворными территориями.

Пролиферация, дифференцировка и апоптоз – основные, генетически обусловленные программы, определяющие существование и функционирование всех клеток организма, в том числе и клеток крови.

Каждая из них имеет механизмы, которые регулируются определенными цитокинами, ростовыми факторами, генами. Клетка начинает дифференцироваться только после взаимодействия с факторами роста, содержание которых определяет количество продуцируемых клеток, число митозов, протеканияемых клеткой, но которые не участвуют в выборе

направления дифференцировки. Учитывая огромную продукцию клеток крови (примерно 5-7 тысяч клеток в течение всей жизни), для поддержания клеточного равновесия должен существовать механизм удаления избыточных, поврежденных и старых клеток. Важным физиологическим регулятором гемопоэза является апоптоз – запрограммированная смерть. Программа самоуничтожения клетки, осуществляемая различными внешними и внутренними сигналами, уравнивается программой антиапоптоза. Самыми мощными антиапоптотическими стимулами для нормального кроветворения являются ростовые факторы. Сфера их действия достаточно широка, начиная от стволовой клетки и заканчивая зрелыми элементами, которым они обеспечивают нормальное функционирование (фактор стволовых клеток, тромбопоэтин, эритропоэтин, колониестимулирующие факторы, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-6 и др.).

Исследование костного мозга

Получение проб костного мозга

Пункция костного мозга выполняется врачом в асептических условиях, с использованием местной инфильтрационной анестезии (1-2% раствор новокаина, лидокаина или другого анестетика), послойно: кожа – подкожная клетчатка – надкостница. Костномозговой пунктат получают путем пункции рукоятки грудины, ребер, гребня или бугристости подвздошной кости, пяточной кости. Наиболее часто костный мозг получают посредством аспирационной биопсии в области тела грудины на уровне третьего-четвертого межреберий. Для аспирационной биопсии используют как многоцветные иглы Сали, Клима, Ислама, имеющие регулируемый ограничитель (щиток), так и одноразовые иглы. Пункционную иглу вводят буравящим движением строго перпендикулярно поверхности грудины в костномозговой канал: щиток иглы располагается на расстоянии 0,8-2 см от грудины, в зависимости от конституции пациента. После извлечения мандрена из иглы на нее насаживают шприц, с помощью которого производится

аспирация 0,1-0,3 мл костного мозга. Костный мозг из шприца помещают на парафинированное часовое или предметное стекло, а остальная часть материала немедленно вносится в пробирки с реагентами для подсчета миело- и мегакариоцитов. Сразу же после этого с помощью шлифованного стекла на предметных стеклах выполняются тонкие мазки (до 10 штук) для оценки клеточного состава костного мозга. Все процедуры с костным мозгом делаются очень быстро во избежание его застывания.

Подсчет количества миелокариоцитов

Подсчет миелокариоцитов производят в счетной камере Горяева с использованием светового микроскопа. В пробирку с 4 мл 3-5% раствора уксусной кислоты вносят 0,02 мл костномозгового пунктата (разведение в 200 раз). Содержимое пробирки тщательно перемешивают и заполняют камеру Горяева. Через 1-2 минуты, используя малое увеличение микроскопа (окуляр х10, объектив х10) подсчитывают количество миелокариоцитов в 1 мкл и с пересчетом в единицы СИ. Подсчет ядросодержащих клеток ведут в 100 больших квадратах, расчет ядросодержащих клеток производят по формуле:

$$X = \frac{n \times 200 \times 250}{100} = n \times 500,$$

где x – количество миелокариоцитов в 1 мкл пунктата;

n – количество миелокариоцитов в 100 больших квадратах сетки счетной камеры;

200 – разведение пунктата;

250 – множитель для приведения к 1 мкл,

или для перевода в единицы системы СИ рассчитывают по формуле:

$$X = n/2 \times 10^9 / \text{л};$$

В норме количество миелокариоцитов составляет 42,0-195,0x10⁹/л;

Подсчет количества мегакариоцитов

Подсчет количества мегакариоцитов производят в счетной камере Фукса-Розенталя. Перед исследованием костномозговой пунктат разводят в 20 раз: в 0,4 мл 3-5% уксусной кислоты вносят 0,02 мл пунктата, перемешивают и заполняют счетную камеру. Подсчет мегакариоцитов проводят через 1-2 минуты по всей камере с использованием малого увеличения светового микроскопа (объектив х 10, окуляр х 10). Расчет количества мегакариоцитов производят по формуле:

$$X = \frac{n \times 20}{3,2},$$

где x – количество мегакариоцитов в 1 мкл пунктата костного мозга;

n – количество мегакариоцитов в счетной камере;

20 – разведение пунктата;

3,2 – объем камеры.

В норме у здоровых людей количество мегакариоцитов колеблется от 50 до 150 в 1 мкл или $0,050-0,150 \times 10^9/\text{л}$.

Миелограмма. Костномозговые индексы

Клеточный состав костномозгового пунктата зависит от разбавленности его периферической кровью, от качества выполненной пункции, от возраста пациента и состояния костного мозга в момент пункции, например фиброзирование костного мозга влияет на клеточный состав миелограммы.

Приготовленные мазки костного мозга окрашивают принятым в лаборатории методом (по Романовскому-Гимзе, Нохту и другие). Просматривают мазки сначала с использованием малого увеличения (объектив $\times 10$, окуляр $\times 10$) с целью ориентировочной оценки клеточности костного мозга, количества мегакариоцитов, обнаружения скоплений миеломных клеток, комплексов опухолевых клеток, клеток Березовского-Штернберга-Рид и другие. Для оценки морфологии клеточных элементов, определения функциональной активности мегакариоцитов и подсчета миелограммы используют

иммерсионный объектив светового микроскопа (увеличение $\times 100$).

Миелограмма – процентное соотношение различных клеток костного мозга. Для подсчета миелограммы анализируют 500-1000 клеток. Подсчитывают все клеточные элементы, встречающиеся в поле зрения. После дифференцировки 500 клеток, число клеток разного вида делят на 5 (при дифференцировке 1000 клеток – на 10), результат выдают в процентах. Клетки гранулоцитарного ряда в норме составляют 60-70%, клетки эритроидного ряда – 20-25%, лимфоидные элементы составляют 7-10%, моноциты – около 2%, в миелограмму также входят плазмоциты, мегакариоциты. Отмечают в миелограмме также и другие клетки, встречающиеся при подсчете (тучные клетки, макрофаги, остеобласты, остеокласты). Помимо процентного соотношения клеточных, при оценке мазков костномозгового пунктата рассчитывают следующие костномозговые индексы.

1. Лейко-эритробластический индекс – соотношение суммы всех клеток лейкоцитарного ряда к сумме клеток эритроидного ряда. В норме Л/Э индекс равен 2,5-4,0:1.

2. Индекс созревания нейтрофилов – соотношение молодых и более зрелых форм нейтрофилов. В норме костномозговой индекс нейтрофилов равен 0,5-0,9.

3. Индекс созревания эритрокариоцитов – отношение гемоглобинсодержащих нормобластов ко всем клеткам эритроидного ряда. В норме этот индекс составляет 0,7-0,9.

После тщательного просмотра мазков, подсчета миелограммы и анализа всех клеточных линий выдается результат аналитического исследования мазков костного мозга в цифровой (содержание клеток в процентах) и описательной форме. В описательной части прежде всего дают оценку клеточности костного мозга, например: костный мозг гиперклеточный, скудный, или клеточность костного мозга нормальная, умеренная, пониженная, повышенная. Далее дается описание каждого клеточного ряда, начиная с количества клеток и их соотношения внутри него, а также дается морфологическое описание клеточных элементов в составе их клеточных рядов.

Результат оформляют, используя следующие выражения: росток сохранен, сужен, угнетен, или, напротив, усилен, раздражен, гиперплазирован. Указывают процент функционально активных мегакариоцитов. В норме количество функционирующих мегакариоцитов, т.е. отшнуровывающих от цитоплазмы тромбоциты, составляет 60-70% от общего количества мегакариоцитов. При описании костномозгового пунктата акцентируют внимание на особенностях морфологии клеток, их созревания, указывают на наличие дегенеративных изменений, признаков дисплазии, наличие патологических включений в цитоплазме (палочки Ауэра в лейкозных клетках и другие).

Эритропоэз

Процесс образования и созревания эритроидных клеток в костном мозге называется *эритропоэзом* (см. CD-диск). Процесс дифференцировки и созревания эритроидных клеток, начиная с эритробласта до эритроцита, занимает 9-14 дней. Из общего миелоидного предшественника образуются родоначальные клетки эритропоэза – бипотентные клетки-предшественники мегакариоцитарно-эритроидного ростка, а затем коммитированные унипотентные клетки-предшественники (бурстообразующие единицы эритропоэза – БОЕ-Э) и колонеобразующие единицы эритропоэза – КОЕ-Э. Последние прodelывают до 5 делений и дифференцируются в морфологически распознаваемые клетки эритроидного ростка – эритробласты, которые в течение 3-5 суток проходят в костном мозге стадии базофильного, полихроматофильного и оксифильного нормобласта. Полихроматофильный нормобласт является последней делящейся клеткой эритроидного ряда. На долю эритрокариоцитов костного мозга приходится 20-25% всех ядросодержащих клеток. Система, объединяющая самые ранние предшественники эритроидного ряда, морфологически идентифицируемые пролиферирующие и непролиферирующие ядросодержащие клетки, ретикулоциты и эритроциты, получила название эритрон. Процесс дифференцировки эритроидных клеток характеризуется постепенным уменьшением размеров клеток, ядра, конденсацией хроматина, накоплением гемоглобина

в цитоплазме. Синтез гемоглобина в эритрокариоцитах начинается на стадии эритробласта и заканчивается в ретикулоците с исчезновением последней рибосомы. Ядро оксифильного нормобласта становится плотным, пикнотичным и выталкивается из цитоплазмы при прохождении клетки через поры синусоидов костного мозга. После удаления ядра из нормобластов образуются костномозговые ретикулоциты, в которых синтез гемоглобина не прекращается еще в течение 3-4 суток. Незрелые ретикулоциты поступают в периферическое русло, где в течение 24-30 часов дозревают и превращаются в зрелые клетки эритроидного ряда – эритроциты.

Часть эритрокариоцитов (5-10%) в физиологических условиях, достигнув критической массы гемоглобина (27 пг.) на стадии базофильного эритробласта, гибнут в костном мозге – неэффективный эритропоэз, уровень которого отражает интенсивность апоптоза. В физиологических условиях неэффективный эритропоэз является одним из регуляторов количества эритроцитов в крови.

Морфология клеток эритроидного ростка

Эритробласт – первая морфологически различимая клетка эритроидного ростка, имеющая округлую форму, диаметр 20-25 мкм, ядерно-цитоплазматическое соотношение в пользу ядра. Ядро имеет правильную форму, нежную мелкозернистую структуру хроматина красно-фиолетового цвета, содержит 1-3 нуклеолы. Эритробласт имеет насыщенно базофильную цитоплазму, расположенную узким ободком, цитоплазма может иметь отростки. Между ядром и цитоплазмой видна перинуклеарная зона просветления.

Пронормобласт – клетка близкая по морфологии к эритробласту, округлой или слегка овальной формы, размером 18-20 мкм в диаметре. Структура хроматина несколько грубее, чем у эритробласта, в ядре отсутствуют ядрышки. Цитоплазма насыщенно базофильная расположена узким ободком.

Базофильный нормобласт – клетка правильной формы, размерами 12-18 мкм в диаметре. Ядро округлой формы красно-фиолетового цвета, ядерно-цитоплазматическое соотношение в пользу ядра. Структура хроматина глыбчатая, за счет уплотнения

хроматиновой сети, с тенденцией к колесовидной структуре рисунка, с чередующимися темными и светлыми участками. Цитоплазма базофильная, располагается в виде небольшого ободка, имеет светлую перинуклеарную зону, которая может иметь розовый оттенок за счет накопления в ней гемоглобина. Накопление гемоглобина обуславливает восприятие цитоплазмой кислой краски эозина, что придает ей розовое окрашивание.

Полихроматофильный нормобласт – клетка округлой формы, 8-12 мкм в диаметре. Ядерно-цитоплазматическое соотношение 1:1 или в пользу цитоплазмы. Ядро красно-фиолетового цвета, расположено центрально или эксцентрично. Структура хроматина грубоглыбчатая, колесовидная. Цитоплазма, за счет накопления гемоглобина, воспринимает кислые и основные краски (полихромазия) и становится полихроматофильной - серой, серо-голубой, серовато-сиреневой окраски. Оттенок обусловлен степенью гемоглобинизации цитоплазмы. Накопление гемоглобина в цитоплазме является причиной прекращения деления клетки. Полихроматофильный нормобласт – последняя делящаяся клетка эритроидного ряда, причем к делению способны более крупные молодые формы клеток.

Оксифильный нормобласт – клетка правильной формы, размерами 8-10 мкм в диаметре. Ядерно-цитоплазматическое соотношение в пользу цитоплазмы. Ядро округлой формы, красно-фиолетового цвета, плотное, пикнотичное, расположенное эксцентрично. Цитоплазма богата гемоглобином имеет светло-розовую окраску. На этой стадии дифференцировки заканчивается гемоглобинизация цитоплазмы. Накапливающийся гемоглобин способствует выталкиванию ядра. После удаления ядра из нормобластов образуются ретикулоциты.

Ретикулоциты – незрелые клетки эритроидного ростка. Диаметр ретикулоцитов составляет 7,7-8,5 мкм. Используя прижизненные методы окраски (например, метиленовый синий, азур или бриллиантовый крезильный синий), в ретикулоцитах обнаруживается базофильная сетчатая субстанция (*substantia reticulofilamentosa*) – агрегаты митохондрий, рибосомной рибонуклеиновой кислоты, остатков эндоплазматической сети и

других. По мере созревания ретикулоцитов количество сетчатой субстанции в них уменьшается.

По степени зрелости различают пять групп ретикулоцитов в соответствии с классификацией Гейльмейера:

0 группа – венчикообразные ретикулоциты, являющиеся, по сути, оксифильными нормобластами, в которых вокруг ядра в виде венчика располагается базофильная сетчатая субстанция.

I группа – клубкообразные ретикулоциты, содержащие в цитоплазме ретикулярную сетчатую субстанцию в виде клубка, расположенного в центре клетки или эксцентрично.

II группа – полносетчатые ретикулоциты, в цитоплазме которых базофильная сетчатая субстанция располагается по всей клетке.

III группа – неполносетчатые ретикулоциты, имеющие отдельные нити сетчатой субстанции в цитоплазме.

IV группа – пылевидные ретикулоциты, в которых базофильная сетчатая субстанция располагается в цитоплазме в виде единичных пылевидных зерен.

Подсчет количества ретикулоцитов

Исследование ретикулоцитов используют с целью:

- оценки степени активности эритропоэза при состояниях, сопровождающихся гемолизом или кровопотерей;

- определения нарушения регенераторной способности костного мозга при дефиците железа, витаминов В12, В6, фолиевой кислоты, меди и мониторинга соответствующей терапии;

- оценки состояния эритропоэза на фоне лечения эритропоэтином;

- оценки способности костного мозга к регенерации после цитостатической терапии и трансплантации костного мозга;

- оценки восстановления синтеза эритропоэтина после трансплантации почки;

- допингового контроля спортсменов (прием ЭПО).

Для подсчета и морфологического исследования ретикулоцитов используют прижизненные методы окраски, т. е. окрашивание живых, нефиксированных клеток.

Реактивы и оборудование для окраски ретикулоцитов с использованием 1% раствора метиленового синего:

1) 1% раствор метиленового синего в изоосмическом растворе фосфатного буфера;

2) пробирки;

3) предметные стекла;

4) микроскоп;

5) пипетки.

Взятие и хранение образцов:

1) для подсчета можно использовать как цитратную кровь, так и с ЭДТА;

2) при комнатной температуре образцы можно хранить не более 8 ч, при 4-8 °С – не более 24 ч.

Техника выполнения исследования:

1. В пробирке смешивают краситель метиленовый синий и исследуемую кровь в соотношении 4:1.

2. Кровь с красителем тщательно перемешивают и через 20-30 мин. готовят мазки. Мазкам дают высохнуть и подписывают, отмечая фамилию пациента, номер образца, дату.

3. После полного высыхания мазка проводят его микроскопию, используя масляно-иммерсионный объектив с увеличением $\times 100$.

4. Контроль качества проводят ежедневно, используя стандартные контрольные образцы, которые готовят так же, как и кровь пациента. Результаты исследования вносят в отчет, только если число ретикулоцитов контрольного образца не выходит за границы нормы. В правильно сделанном препарате сетчатая субстанция окрашивается в синий цвет, а все остальные клетки окрашиваются в бледные желто-зеленые, зеленовато-голубые тона.

Подсчитывают ретикулоциты на 1000 эритроцитов. Результат выражают в промилле или процентах. В норме в периферическом русле количество ретикулоцитов колеблется в пределах 2-12 ‰ (0,2-1,2%, у детей – 2,5-6,5%) – это преимущественно ретикулоциты III-IV групп (около 60% ретикулоцитов относится к IV группе, 30% – к III, 7 – ко II и около 0,1% – к I группе).

Ретикулоцитоз отражает повышенную регенераторную активность костного мозга и степень активности эритропоэза. Ретикулоцитоз наблюдается при постгеморрагической анемии, гемолизе, терапии эритропоэтином, витамином В12, фолиевой кислотой. Увеличение фракции незрелых ретикулоцитов более чем на 20% является чувствительным индикатором успешной трансплантации костного мозга и часто предшествует повышению количества нейтрофилов. Сохраняющийся ретикулоцитоз может наблюдаться при продолжающемся кровотечении, гемолизе. При проведении допингового контроля у спортсменов используют показатели ретикулоцитов и гематокрита. Ретикулоцитоз более 2,4% и гематокрит более 47% могут быть обусловлены приемом ЭПО.

Ретикулоцитопения свидетельствует об угнетении эритропоэза и наблюдается при апластической, В12-дефицитной анемии, парциальной красноклеточной аплазии, при метастазах рака в костный мозг, лейкозах, миелодиспластических синдромах, при параксизмальной ночной гемоглобинурии, при снижении уровня ЭПО.

Ретикулоциты в периферическом русле через 24-30 ч полностью утрачивают базофильную сетчатую субстанцию и превращаются в зрелые клетки эритроидного ряда – эритроциты.

Эритроцит имеет форму двояковогнутого диска. Диаметр зрелых эритроцитов колеблется в пределах от 6 до 8 мкм, диаметр наибольшего числа эритроцитов составляет 7,2 мкм. Благодаря дисковидной двояковогнутой форме эритроцит имеет большую поверхность (площадь поверхности эритроцита составляет 140 мкм^2). Толщина эритроцита в норме составляет 2,1-2,4 мкм, объем – 90 мкм^3 . В мазках, окрашенных по Романовскому – Гимзе, эритроцит окрашен в розовый цвет, более интенсивно по периферии, в центре имеется просветление. Эритроцит состоит из мембраны и стромы. Мембрана имеет двойной слой фосфолипидов с встроенными белками гликопротеинами, углеводная часть которых образует надмембранный слой – гликокаликс. Строма представлена сетью миофиламентных белков, формирующих спектрин-актиновый цитоскелет. Внутренняя сторона мембраны связана с сетью миофиламентных белков цитоскелета, что придает

эритроциту вид двояковогнутого диска. Благодаря дисковидной форме, высокой пластичности и деформируемости мембраны, эритроцит способен проходить через поры, диаметр которых составляет 0,5-0,7 мкм. В ячейках цитоскелета находятся молекулы гемоглобина.

Молекула гемоглобина состоит из следующих основных частей:

1. *Гем*. Молекула гемоглобина имеет 4 гема, в состав которого входят четыре атома двухвалентного железа, окруженные протопорфирином IX. Образование протопорфирина IX начинается с превращения сукцинил-КоА в дельта-аминолевулиновую кислоту. Последующие промежуточные продукты включают порфобилиноген, уропорфириноген и копропорфирин. Связывание атома железа с протопорфирином IX завершает реакцию синтеза гема. Гем одинаковый у всех видов гемоглобина, на его долю приходится 4% сухой массы гемоглобина. Гем обеспечивает функциональную активность гемоглобина.

2. *Глобин*. На долю глобина приходится 96% сухой массы гемоглобина. Эта часть молекулы гемоглобина состоит из двух пар полипептидных цепей, построенных из аминокислот. Все типы нормальных гемоглобинов содержат по две одинаковые альфа-цепи и различаются по второй паре полипептидных цепей, которые и определяют вид гемоглобина.

3. *2,3-ДФГ* – фермент анаэробного гликолиза, дополнительный компонент, скрепляющий молекулу гемоглобина и оказывающий прямое влияние на сродство гемоглобина к кислороду.

Около 65% гемоглобина синтезируется в ядросодержащих клетках – предшественниках эритропоэза, остальные 35% – в незрелых ретикулоцитах. На конечной стадии созревания ретикулоцит теряет способность синтезировать гемоглобин.

В первые три месяца внутриутробного развития синтезируются гемоглобины Gower I и Gower II, Portland. Фетальный гемоглобин начинает синтезироваться на 3-м месяце эмбрионального развития и остается основным типом гемоглобина до рождения ребенка. У новорожденных фетальный гемоглобин составляет 70-90%. На первом году жизни ребенка,

между 3 и 6 месяцев, начинается синтез гемоглобина А. В эритроцитах взрослых людей на HbA (альфа-2, бета-2) приходится 95-98%; 2-3% – на HbA2 (альфа-2, дельта-2); 1-2% – HbF (альфа-2, гамма-2).

Основные параметры для оценки эритропоэза, определяемые на гематологических анализаторах

1. *Количество эритроцитов крови* ($\times 10^{12}/л$) (RBC – red blood cells). В гематологических анализаторах подсчитываются все частицы размером более 36фл кондуктометрическим методом. Количество эритроцитов вычитается из общего числа клеток цельной крови. В норме количество эритроцитов:

- у мужчин – $4,0-5,0 \times 10^{12}/л$;
- у женщин – $3,9-4,7 \times 10^{12}/л$.

Ложное завышение результатов исследования при кондуктометрическом подсчете возможно за счет криоглобулинемии, высокого лейкоцитоза, аличия в периферическом русле гигантских тромбоцитов. Ложное занижение результатов исследования – за счет гемолиза образца крови, агглютинации эритроцитов, наличия микроцитов.

Изменение количества эритроцитов может быть связано с заболеваниями органов кроветворения (первичная патология) или наблюдаться в результате целого ряда причин, которые возникают на фоне какого-либо заболевания – вторичное, относительное изменение.

Эритроцитоз – увеличение количества эритроцитов в крови более $5 \times 10^{12}/л$ может иметь реактивный и опухолевый характер (таблица 1).

Таблица 1. – Эритроцитозы

Патогенетическая группа	Клиническая форма
1. Абсолютные эритроцитозы за счет усиления эритропоэза:	
1.1 Первичные	– истинная полицитемия (эритремия), наследственные эритроцитозы (обусловлены генетически закрепленными дефектами на разных стадиях гуморальной регуляции эритропоэза)
1.2 Вторичные: – эритроцитозы, вызванные гипоксией; – эритроцитозы, связанные с увеличенной продукцией эритропоэтина; – эритроцитозы, связанные с избытком ряда гормонов, стимулирующих продукцию ЕРО	– физиологические: повышенная физическая нагрузка, ожирение, пребывание на большой высоте, после приема эритропоэтинового допинга; – патологические: постинфарктный период у пациентов с ИБС, заболевание легких, пороки сердца, наличие аномального гемоглобина, эритроцитов, при синдроме ночного апноэ; – почечно-клеточный рак, поликистоз почек, гидронефоз; – непочечные опухоли, продуцирующие эритропоэтин: печеночно-клеточный рак, опухоли матки, гемангиобластома мозжечка; – феохромоцитома, гипертиреоз, гиперальдостеронизм;
2. Относительные эритроцитозы	– дегидратация (формирование отеков, неукротимая рвота, понос, постоянный прием диуретиков), алкоголизм, курение (повышение уровня окиси углерода), артериальная гипертензия, неврастения, длительная адинамия (в частности у космонавтов);
3. Смешанный эритроцитоз вследствие сгущения крови и плацентарной трансфузии	– физиологический эритроцитоз новорожденных

Эритроцитопения – снижение количества эритроцитов менее $4 \times 10^{12}/л$ в единице объема крови. Причиной снижения количества эритроцитов могут быть кровопотери, угнетение кроветворения (радиационное облучение, аплазия костного мозга), усиленный гемолиз эритроцитов (гемолитические анемии), дефицит гемопоэтических факторов (железо, витамин В12 и другие), заболевания печени, почек, гиперспленизм, гипергидратация, хронические инфекции.

2. Нормобласты (*normoblasts*)

Большинство гематологических анализаторов подсчитывают все ядросодержащие клетки, в том числе и нормобласты, которые, имея размер малого лимфоцита, могут быть причиной увеличения количества лейкоцитов и лимфоцитов. В некоторых современных анализаторах, например Sysmex (XE-2100, XT-2000i) Bayer (ADVIA120), при наличии нормобластов в периферическом русле, коррекция количества лейкоцитов производится автоматически. Однако в большинстве случаев необходим визуальный контроль нормобластов, которые подсчитывают на 100 сосчитанных в лейкоцитарной формуле лейкоцитов. В норме на 100 лейкоцитов встречается не более 5 нормобластов при подсчете лейкоцитарной формулы. Для коррекции истинного количества лейкоцитов составляется пропорция исходя из данных по общему количеству лейкоцитов, подсчитанных на анализаторе, количества нормобластов на 100 лейкоцитов. Например, общее количество лейкоцитов составляет $60,0 \times 10^9/л$, количество нормобластов – 20 на 100 лейкоцитов:

120 клеток (общее количество лейкоцитов и нормобластов, полученное при подсчете лейкоцитарной формулы)	-----	$60,0 \times 10^9/л$;
100 клеток (лейкоциты)	-----	X (истинный лейкоцитоз)

$$X = \frac{100 \times 60 \cdot 10^9/л}{120} = 50,0 \cdot 10^9/л - \text{истинный лейкоцитоз крови.}$$

В периферическом русле нормобласты появляются при онкогематологической патологии, при тяжелых гемолитических, В12- и/или фолиеводефицитных анемиях, при септических состояниях, интоксикациях, метастатическом поражении костного мозга. Появление нормобластов в периферической крови может расцениваться как маркер гипоксии и воспаления.

3. *Гемоглобин (HGB - hemoglobin)* – концентрация гемоглобина в гематологических анализаторах может определяться фотометрическим как гемиглобинцианидным, так и негемиглобинцианидным методами. Ложнозаниженные результаты могут быть обусловлены образованием микросгустков в неправильно взятой пробе крови, ложнозавышенные – за счет гемолиза, парапротеинемии, криоглобулинемии, гиперлипидемии, гипербилирубинемии, высокого лейкоцитоза, присутствия нестабильных гемоглобинов.

Повышение концентрации гемоглобина наблюдается при первичных, вторичных эритроцитозах. Снижение концентрации – при анемиях, гипергидратации.

4. *Гематокрит (HCT - hematocrit)* – показатель, отражающий объем эритроцитов в единице объема крови, выраженный в процентах. Ложное завышение гематокрита может быть при наличии гигантских тромбоцитов, криоглобулинемии, высокого лейкоцитоза, гипергликемии, диабетического кетоацидоза. Ложное занижение наблюдается при агглютинации, микроцитозе эритроцитов. Увеличение гематокрита наблюдается при первичных, вторичных эритроцитозах, снижение – при анемиях, гипергидратации, во втором триместре беременности.

5. *Средний объем эритроцитов (MCV - mean corpuscular volume)* – показатель, выражаемый в кубических микрометрах (мкм^3) или в фемтолитрах (1 фемтолитр равен 1 мкм^3), отражает прямую зависимость между амплитудой электрического импульса и объемом клетки. Определяется MCV путем деления суммы клеточных объемов на количество эритроцитов. MCV – средний показатель объема всей популяции эритроцитов в диапазоне от 36 до 360 фл, поэтому, когда наблюдается смешанный анизоцитоз или выраженный пойкилоцитоз, этот показатель остается в пределах нормы. В этом случае большое диагностическое значение приобретает микроскопический анализ

морфологии эритроцитов и анализ гистограмм. Ложное завышение MCV наблюдается при диабетическом кетоацидозе, гипернатриемии, высоком (более $50 \times 10^9/\text{л}$) лейкоцитозе, ретикулоцитозе, наличии макроформ тромбоцитов, холодových агглютининов, ложное занижение – при наличии шизоцитов, при коагулопатии потребления. MCV используется для разделения анемий на нормоцитарные (объем эритроцитов составляет 80-100 фл.), микроцитарные (объем эритроцитов составляет менее 80 фл.), макроцитарные (объем эритроцитов составляет более 100 фл.). В период новорожденности MCV составляет 128 фл., в течение первой недели жизни снижается до 100 фл., к году – до 77-79 фл., к 3-4 годам жизни показатель стабилизируется и составляет 87 ± 5 фл.

6. *Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH – mean corpuscular hemoglobin)* – это расчетный показатель, отражает массу гемоглобина в одном эритроците и выражается в пикограммах. MCH рассчитывается по формуле:

$$\text{MCH} = \frac{\text{Гемоглобин (г/л)}}{\text{Количество эритроцитов} \times 10^{12}/\text{л}}$$

В норме среднее содержание гемоглобина в отдельно взятом эритроците составляет 27-31 пг. MCH используется для разделения анемий на нормохромные, гипохромные (MCH менее 27пг) и гиперхромные (MCH более 31пг). Этот показатель более объективный, чем устаревший цветовой показатель. Снижение MCH наблюдается при железодефицитной анемии, повышение – при B12- и/или фолиеводефицитной анемиях.

7. *Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC – mean corpuscular hemoglobin concentration)* рассчитывается по формуле:

$$\text{MCHC} = \frac{\text{Гемоглобин (г/дл)}}{\text{Гематокрит (\%)}} \times 100 \text{ (г/дл)}$$

МСНС отражает насыщение эритроцита гемоглобином, в норме МСНС составляет 30-38 г/дл. Так как МСНС чувствителен к нарушениям синтеза гемоглобина, то его снижение наблюдается при заболеваниях, сопровождающихся нарушением процессов гемоглобинообразования. Ложное понижение или завышение МСНС, как правило, связано с погрешностями при исследовании пробы – погрешностями в определении гемоглобина, MCV, неправильным измерением объема эритроцитов. Этот показатель тесно связан с работой, выполненной на пре- и аналитическом этапе и является индикатором ошибок, допущенных на данных этапах.

8. *Показатель разнородности эритроцитов по объему (RDW – red cell distribution width)* – это расчетный показатель, отражающий степень анизоцитоза эритроцитов и представляет собой отношение стандартного среднеквадратического отклонения объема эритроцитов от среднего значения (SD) к показателю среднего объема эритроцитов (MCV), умноженное на 100. В норме RDW составляет 11,5-14,5% и свидетельствует о наличии гомогенной по объему популяции эритроцитов (нормо-, микро- или макроцитов). При наличии смешанной популяции клеток (нормоцитов и микроцитов или нормоцитов и макроцитов и другие) наблюдается увеличение RDW. Изменение размера эритроцитов быстрее улавливается прибором, чем при визуальном просмотре мазка крови. При высыхании мазка диаметр эритроцитов уменьшается на 10-20%, кроме того, в толстых мазках диаметр эритроцитов меньше, в тонких – больше. Следует также помнить, что наличие в периферическом русле популяции измененных эритроцитов, но однородных по размеру (показатель MCV изменен) не влияет на показатель RDW и он может быть в пределах нормы. В то же время при выраженном анизоцитозе показатель MCV, отражающий средний объем эритроцитов всей популяции, остается в пределах нормы, а показатель RDW повышен. Поэтому для более полной характеристики изменений клеток эритроидного ростка в периферическом русле необходимо оценивать параллельно данные двух параметров – RDW и MCV, эритроцитарные гистограммы в сочетании с морфологическим исследованием мазка крови.

9. Эритроцитарная гистограмма – графическое распределение эритроцитов по их количеству и объему в результате анализа нескольких тысяч частиц объемом от 24 до 360 фл. Нормальная эритроцитарная гистограмма имеет форму симметричного колокола. Изображение гистограммы может изменяться:

- при наличии разных по объему эритроцитов колокол имеет более широкое основание, что сочетается с увеличением RDW более 15%;

- при наличии двух популяций эритроцитов (микро- и макроцитов, нормо- и макроцитов и другие) гистограмма имеет два пика;

- наличие плато справа от пика говорит о присутствии макроформ или агрегатов тромбоцитов, большого количества фрагментов эритроцитов;

- при хроническом лимфолейкозе в области 200 фл на гистограмме появляется дополнительный пик за счет большого количества малых лимфоцитов.

Рисунок на гистограмме позволяет также оценить положительную динамику изменения количества и объемов эритроцитов при лечении анемий.

10. Современные гематологические анализаторы дают возможность оценить помимо основных параметров, дополнительные – *ретикулоцитарные параметры*:

10.1 классические параметры ретикулоцитов:

- относительное количество ретикулоцитов (RET%);

- абсолютное количество ретикулоцитов (RET#);

10.2 объемные параметры ретикулоцитов:

- MCVr (mean cell volume reticulocytes) – средний объем ретикулоцитов(фл);

- MSCV (mean sphere cell volume) – средний объем сферических клеток, включающих эритроциты и ретикулоциты (фл);

10.3 параметры, характеризующие степень зрелости ретикулоцитов:

- LER% – популяция малых зрелых ретикулоцитов (87-99%);

- IRF% – фракция незрелых ретикулоцитов (2-14%);

10.4 ретикулоцитарные индексы:

– CRC (corrected reticulocyte count) – скорректированный подсчет ретикулоцитов в случае изменения только гематокрита по формуле:

$$\text{CRC} = \text{RET}(\%) \times \frac{\text{Ht}}{0,45 \text{ (идеальный гематокрит)}}$$

– RPI (reticulocyte production index) – индекс продукции ретикулоцитов в случае сочетания присутствия незрелых ретикулоцитов в периферическом русле с низким значением гематокрита рассчитывается по формуле:

$$\text{RPI} = \frac{\text{RET}(\%) \times \text{Ht}}{0,45 \times \text{дни циркуляции RET в крови}}$$

Исследование ретикулоцитов позволяет оценить активность эритропоэза при состояниях, сопровождающихся гемолизом или кровопотерей; выявить нарушения регенераторной способности костного мозга при дефиците железа, витаминов В12, В6, фолатов, меди; оценить способность костного мозга к регенерации после цитостатической терапии и трансплантации костного мозга; оценить состояние эритропоэза на фоне терапии эритропоэтином; используется с целью допингового контроля у спортсменов; для оценки восстановления синтеза эритропоэтина после трансплантации почки. Искажать результаты исследования ретикулоцитов может недавнее переливание крови, наличие в эритроцитах включений, которые могут быть приняты анализатором за ретикулоциты (тельца Гейнца, тельца Жолли, включения гемосидерина).

Снижение количества ретикулоцитов наблюдается при апластической анемии, хронической инфекции, на фоне лучевой терапии, приема некоторых химиотерапевтических препаратов. Увеличение количества ретикулоцитов наблюдается после острой кровопотери, на фоне подъема на большую высоту, приема лекарственных препаратов, во время беременности, характерно для гемолитических анемий.

Приготовление, фиксация, окраска мазков для морфологического исследования эритроцитов

В тех случаях, когда результаты автоматического исследования эритроцитов не соответствуют требованиям программы анализатора или выходят за рамки программы, проводится исследование клеток вручную. Для этого последовательно выполняют следующие действия:

- каплю исследуемой крови помещают в центре предметного стекла на расстоянии около 1 см от края узкого ребра предметного стекла;

- на 1-2 мм перед каплей под углом 45° помещают шлифованное стекло (спредер), более узкое, чем предметное стекло (на 2-3 мм);

- сдвигают шлифованное стекло к капле таким образом, чтобы капля растеклась вдоль ребра шлифованного стекла;

- с помощью шлифованного стекла каплю правильно распределяют по предметному стеклу:

1. Капля должна быть полностью исчерпана и заканчиваться перистым краем.

2. Мазок должен занимать $\frac{3}{4}$ предметного стекла, иметь начало, хорошо выраженные края и тонкую часть, где клетки располагались бы в один слой, содержащий около 200 неповрежденных эритроцитов в одном поле зрения.

Толщину мазка можно регулировать путем изменения силы давления, угла наклона и скорости проведения шлифованного стекла. При анемии необходимую толщину достигают увеличением угла наклона, при полицитемии – уменьшением;

- мазок высушивают на воздухе;

- в толстой части мазка или на матовом конце предметного стекла карандашом указывают фамилию и инициалы пациента, номер мазка, дату; позже на мазок закрепляют бумажный ярлык или, если лаборатория компьютеризирована, наклейку со штрихкодом.

- мазок фиксируют для предотвращения гемолиза эритроцитов под действием воды, содержащейся в красителях, а также для закрепления мазка на предметном стекле. В качестве фиксатора могут быть использованы этиловый спирт 96°

(фиксация составляет 30 мин.), формалин (фиксация составляет 1 мин.), ацетон (фиксация составляет 5 мин.), наиболее часто мазки крови фиксируют раствором эозинметиленового синего по Май – Грюнвальду в течение 3-5 мин.;

– окрашивание мазков выполняется смесью двух красителей – кислого (эозин калия) и основного (метиленовый синий, азури I и азури II). Наиболее часто для окрашивания используется модификация по Романовскому - Гимзе.

Процесс окрашивания в лабораториях выполняется вручную или в автоматическом режиме гематологическим анализатором, оснащенным системой подготовки и окраски мазков или автономным автоматическим устройством. Аппараты для автоматической окраски мазков применяют при необходимости обработки большого количества стекол, однако они могут быть запрограммированы на приготовление и окрашивание только одного мазка из одной пробы крови, а также для выполнения и окрашивания большого количества мазков из одного образца крови. В некоторых автоматических системах красящий раствор наносят на стекла, расположенные горизонтально (планшетное окрашивание), в других – стекла опускают в ванну с красящим раствором (техника погружения-окрашивания) либо распыляют краски на предметное стекло в центрифуге. К недостаткам данных методов относится чрезмерное прокрашивание фона, недостаточное окрашивание гранул нейтрофилов, дегрануляция базофилов, синее или зеленое окрашивание эритроцитов, выпадение осадка краски на стекло. При условии применения качественных красителей, тщательного соблюдения времени проведения процедуры и других параметров, как правило, результаты окрашивания удовлетворительные.

В обязательном порядке оценивается качество выполненных мазков. С этой целью специалист, ответственный за контроль качества, в случайном порядке выбирает стекло с окрашенным мазком. Затем, просматривая мазок с помощью микроскопа, оценивает качество окраски эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов и распределение клеток в мазке. Использование двух красителей обеспечивает окраску разных клеточных структур в зависимости от pH: щелочные клеточные структуры окрашиваются кислым эозином в розово-красные тона, кислые –

щелочным азуром и/или метиленовым синим в синие тона. Ядра клеток, богатые нуклеиновыми кислотами, окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, цитоплазма молодых клеток, содержащая РНК, воспринимает синюю или голубую краску. Цитоплазма нейтрофилов, эритроциты, содержащие щелочные белки, воспринимают кислый эозин и окрашиваются в розовый цвет, а зернистость эозинофилов – в красно-оранжевый цвет. Специфическая зернистость нейтрофилов слабо воспринимает щелочную часть красителя, поэтому имеет темно-голубую, синюю окраску, токсогенная зернистость имеет насыщенный фиолетовый цвет.

Морфологию эритроцитов оценивают при выполнении процедуры подсчета лейкоцитарной формулы. Мазок исследуют, используя увеличение объектива $\times 100$ под масляной иммерсией. Оценивают размер, цвет, форму, интенсивность окраски, отмечают наличие включений. Морфологически нормальные эритроциты – нормоциты: имеют размер в пределах 7,2-7,5 мкм в диаметре, форму двояковогнутого диска; нормохромные эритроциты – эритроциты с розовым окрашиванием цитоплазмы, более интенсивным по периферии, с центральным просветлением и без включений.

Морфологические особенности патологических эритроцитов. Эритроцитометрия

Анизоцитоз – наличие в крови эритроцитов разного размера. В норме в периферическом русле содержится 68-70% нормоцитов, около 15,5% микроцитов, размер которых менее 6,5 мкм и около 16,5% макроцитов, размер которых более 8 мкм. Состояние, при котором в крови преобладают микроциты, называется микроцитозом, макроциты – макроцитозом. Эритроциты с диаметром, равным или более 12 мкм, – мегалоциты, характеризующиеся наличием округлой или овальной формы, гиперхромией, отсутствием центрального просветления.

Анизоцитоз в отчете представляют в виде слов, плюсов или в процентах:

- незначительный анизоцитоз – +, примерно 25% эритроцитов отличаются размерами от нормоцитов;

- умеренный анизоцитоз – ++, примерно 50% эритроцитов имеют размер, отличный от нормоцитов;
- выраженный анизоцитоз – +++, примерно 70-75% эритроцитов отличаются размерами от нормоцитов;
- резко выраженный анизоцитоз – +++++, почти все эритроциты отличаются размерами от нормоцитов.

В отчете обязательно необходимо указывать, за счет каких размеров эритроцитов обусловлено преобладание, например, смешанный анизоцитоз, анизоцитоз за счет микроцитов или макроцитов. Макроциты образуются в результате нарушения созревания ядер эритрокариоцитов, обнаруживаются при регенерации крови, стимуляции эритропоэза – дефицит витамина В12 и/или фолиевой кислоты, заболеваниях печени, в том числе и алкогольном поражении печени, недостаточной функции щитовидной железы, лейкозах, на фоне терапии иммунодепрессантами, цитостатическими препаратами. Микроцитоз обусловлен снижением синтеза гемоглобина, что характерно для железодефицитных, сидеробластных, гемолитических анемий, наблюдается при опухолевых заболеваниях.

Пойкилоцитоз – наличие в периферическом русле эритроцитов с измененной формой. Форма пойкилоцитов может быть разной, например:

Овалоциты (эллиптоциты) – пойкилоциты вытянутой, овальной формы. Образуются при дефектах мембраны. Овалоциты характерны для наследственного овалоцитоза, могут быть при талассемии, при тяжелом течении железодефицитных, мегалобластных анемий.

Стоматоциты – эритроциты, имеющие щелевидную зону просветления, расположенную в центре клетки, по форме напоминающую рот. Образуются при нарушении обмена ионов в цитоплазме эритроцитов – повышении концентрации натрия и снижении концентрации калия. Стоматоциты появляются в периферическом русле после гемотрансфузии, при наследственном стоматоцитозе, при иммунных формах гемолитических анемий, наблюдаются при заболеваниях печени, алкогольном поражении печени, при инфекционном мононуклеозе.

Сфероциты – эритроциты, утратившие двояковогнутую форму и не имеющие зоны просветления в центре. Сфероциты имеют форму шара, обладают большой толщиной, могут быть обычных размеров и микросфероциты, диаметр которых менее 6 мкм. Сфероциты появляются в крови при наследственном микросфероцитозе, гемолитических анемиях, вызванных ожогами, бактериальными токсинами, при несовместимом переливании крови по системе АВ0, протезировании искусственных клапанов сердца, искусственных сосудов, при ДВС-синдроме.

Акантоциты – эритроциты с зоной просветления в центре, с неровными зубчатыми выростами цитоплазмы. Акантоциты обнаруживаются в крови при наследственном акантоцитозе, абетаполипротеинемии, заболеваниях печени (цирроз), алкогольном поражении печени, на фоне лечения гепарином, после спленэктомии.

Эхиноциты – эритроциты, имеющие равномерные шиповидные выросты цитоплазмы. Эхиноциты появляются в крови при тяжелом течении анемий, при раке желудка, язвенной болезни желудка, почечной недостаточности, уремии, при дефиците пируваткиназы.

Каплевидные эритроциты (дакриоциты) – эритроциты, по форме напоминающие каплю. Каплевидные эритроциты обнаруживаются в крови при первичном миелофиброзе, тяжелом течении анемий, токсическом поражении печени.

Мишеневидные эритроциты – эритроциты, имеющие в центре скопление гемоглобина и напоминающие мишень или бычий глаз. Окрашенная в розовый цвет центральная зона эритроцита окружена светлым ободком, который, в свою очередь, – ободком красного цвета. Мишеневидные эритроциты характерны для талассемии, обнаруживаются в периферическом русле при тяжелом течении железодефицитной анемии, при заболеваниях печени, после спленэктомии.

Анулоциты – эритроциты в виде пустых колец за счет резко выраженного центрального просветления появляются в периферической крови при тяжелой железодефицитной анемии.

Серповидные эритроциты (дрепаноциты) – эритроциты в виде полумесяца, серпов – обнаруживаются в крови при серповидноклеточной анемии.

Шизоциты – фрагменты эритроцитов неправильной формы, разных размеров появляются в крови при гемолитической анемии, обусловленной ожогом, развившейся после протезирования, после трансплантации почки, при гемолитико-уремическом синдроме, ДВС-синдроме, при васкулитах.

Шлемовидные эритроциты (дегмациты) – пойкилоциты, образующиеся за счет удаления телец Гейнца-Эрлиха из эритроцитов при прохождении их через синусы селезенки.

Окраска эритроцитов обусловлена концентрацией гемоглобина, которая в норме составляет 32-36%. Нормально насыщенные гемоглобином, нормохромные эритроциты имеют розовую окраску, с несколько бледнее окрашенным центром за счет двояковогнутой формы. Изменение окраски эритроцитов:

- гипохромия – уменьшение содержания гемоглобина в отдельных эритроцитах, которое сопровождается более бледным их окрашиванием и увеличением центрального просветления;

- гиперхромия – более интенсивное окрашивание эритроцитов обусловлено увеличением их толщины, является показателем объема эритроцитов;

- полихромазия – появление эритроцитов различных оттенков: серовато-фиолетового, серовато-сиреневого цвета за счет восприятия как кислых, так и щелочных красителей; такие эритроциты называются полихроматофилами; изменение цвета у них обусловлено сохранением базофильных элементов и наличием гемоглобина в цитоплазме;

- анизохромия – появление в периферическом русле эритроцитов разной интенсивности окрашивания.

Изменение окраски эритроцитов используется для дифференциальной диагностики анемий. Нормохромия эритроцитов наблюдается в первые дни после острой кровопотери, при апластических анемиях, анемиях на фоне хронических заболеваний, инфекций, при несфероцитарных гемолитических анемиях. Гипохромия наблюдается при железодефицитных, сидеробластных анемиях, талассемиях, гиперхромия – при дефиците витамина В12 и/или фолиевой

кислоты, наследственном сфероцитозе. Анизохромия может появиться на фоне лечения анемий, при постгеморрагических, железодефицитных анемиях.

Полихроматофилия наблюдается после гемолитического криза, через 3-5 дней после острой кровопотери, развивается на фоне эффективного лечения В12 и/или фолиеводефицитной анемии и обусловлена присутствием в периферическом русле большого количества ретикулоцитов и является показателем хорошей регенераторной функции костного мозга;

В норме эритроциты, как правило, не содержат в цитоплазме включений. Включения появляются при патологических состояниях или количество их возрастает, если в норме они встречаются в виде единичных в препарате.

1. Тельца Гейнца-Эрлиха – округлые включения, размером 1-2 мкм, располагаются по периферии эритроцитов, состоят из денатурированного гемоглобина. Тельца Гейнца – Эрлиха выявляются при использовании прижизненных методов окраски:

Метод Дейчи

Принцип метода заключается в инкубации эритроцитов с 0,5% раствором метилового фиолетового в изотоническом растворе хлорида натрия и появлением в большом количестве окрашенных телец в патологических эритроцитах.

Ход определения: исследуемую кровь и 0,5% раствор метилового фиолетового смешивают 1:1, после тщательного перемешивания смесь инкубируют при комнатной температуре 10 минут и затем делают мазки. Для микроскопии используют масляную иммерсию, увеличение $\times 100$. Тельца Гейнца-Эрлиха окрашиваются в пурпурно-красный цвет.

Интерпретация: в норме лишь единичные эритроциты могут содержать тельца. Большое количество телец Гейнца - Эрлиха появляется при дефиците эритроцитарных ферментов, в частности Гл-6-ФД, при отравлении анилиновыми красителями, при передозировке сульфаниламидами, нитроглицерином, нитробензолом и другими веществами, при лучевой болезни.

Также для окраски телец Гейнца - Эрлиха могут быть использованы суправитальные методы, применяемые для окраски ретикулоцитов.

2. Базофильная пунктация – остатки РНК и митохондрий, диффузно распределенных в цитоплазме эритроцитов и оксифильных нормобластов в виде точечной зернистости темно-синего цвета разной величины. Выявляется как при использовании обычных методов окраски, так и при использовании специального метода окраски по Фрейфельд.

Метод Фрейфельд

Принцип метода: остатки РНК, митохондрий хорошо воспринимают щелочной раствор метиленового синего.

Ход исследования: после фиксации обычным способом, мазок окрашивают в течение часа водным раствором метиленового синего (5 капель 1% раствора метиленового синего смешивают с 20 мл дистиллированной воды). Мазок после окраски промывают проточной водой, высушивают и просматривают, используя масляную иммерсию и увеличение $\times 100$ микроскопа.

Интерпретация: в норме количество эритроцитов с базофильной пунктацией не превышает 3-4 на 10 000 эритроцитов. Базофильная пунктация может появляться при токсическом поражении костного мозга, например, отравлении солями тяжелых металлов, при мегалобластных анемиях, талассемии, на фоне лучевой терапии, терапии цитостатическими препаратами, при активации эритропоэза. Появление эритроцитов с базофильной пунктацией обязательно отражается в клинико-диагностическом заключении, при необходимости ведется целенаправленный подсчет на 10 000 эритроцитов (см. CD-диск).

3. Тельца Жолли – Говелла представляют собой остаточную ДНК в виде округлых включений диаметром 1-2 мкм красно-фиолетового цвета в цитоплазме эритроцитов. Это остатки ядерного вещества нормобластов, которые обнаруживаются при обычных методах окрашивания мазков. Тельца Жолли – Говелла обнаруживаются при мегалобластных анемиях, при отравлении гемолитическими ядами, после спленэктомии, на фоне активации эритропоэза.

4. Кольца Кебота – это остатки оболочки ядра в виде восьмерки, окружности красно-фиолетового цвета, расположенные в цитоплазме эритроцита. Выявляются при

обычной окраске мазков на фоне отравления солями тяжелых металлов, при мегалобластных анемиях, лейкозах.

5. Зернистость Шюффнера – мелкие красно-фиолетовые точечные включения в эритроцитах (в среднем 20-30 включений), выявляются при трехдневной малярии. Пораженные эритроциты увеличиваются в размерах, их окраска становится бледнее.

6. Пятнистость Маурера – крупные разной величины пятна розово-фиолетового цвета (10-15 пятен) в эритроцитах у пациентов с тропической малярией. Характерно то, что эритроциты не увеличиваются в размерах и не изменяют окраски.

7. Сидеротические гранулы – мелкие (0,5-1,5 мкм) гранулы негемоглобинового железа (ферритин, гемосидерин) синего цвета. Выявляются при цитохимическом исследовании.

Метод выявления сидеротических гранул при использовании специальной окраски в реакции на берлинскую лазурь.

Принцип метода: гранулы негемоглобинового железа в реакции на берлинскую лазурь окрашиваются в синий цвет. Ход исследования: мазки крови после фиксации и подсушивания помещают в смесь, состоящую из равных частей 1% раствора железосинеродистого калия и 0,1 N раствора соляной кислоты (8,2 мл концентрированной HCl доводят дистиллированной водой до 1000 мл) на 20 минут на водяной бане (температура 50-56 ° C). Затем в течение 10 минут мазок промывают проточной, дистиллированной водой и докрашивают 1% раствором сафранина в течение нескольких секунд. Мазок промывают, просушивают и просматривают, используя масляную иммерсию, увеличение x 100 объектива микроскопа.

Эритроциты с гранулами негемоглобинового железа называются сидероциты; эритрокариоциты, содержащие в цитоплазме гранулы ферритина и гемосидерина – сидеробласты. В норме в периферическом русле можно обнаружить 0,8-1% сидероцитов, в костномозговом пунктате – 20-40% сидеробластов, содержащих в цитоплазме не более 5 гранул негемоглобинового железа.

При железодефицитных анемиях в периферическом русле сидероциты отсутствуют, количество сидеробластов в костном мозге снижено. Увеличение количества сидероцитов,

сидеробластов наблюдается при сидеробластных анемиях, миелодиспластических синдромах, на фоне усиленного гемолиза эритроцитов, после спленэктомии.

Качественные пробы на ферментопатию

К наиболее частым ферментопатиям относится наследственный дефект глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах. Лабораторное подтверждение энзимопатии основано на использовании качественных проб и биохимическом определении активности фермента в гемолизате.

1. Качественный метод Мотульского-Кемпбеля основан на обесцвечивании краски бриллиант-крезилового синего в присутствии глюкозо-6- фосфата, НАД и трис-буфера. При наличии в исследуемых эритроцитах глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы образуется НАД-Н, который обесцвечивает краску. В норме обесцвечивание бриллиант-крезилового синего происходит при температуре 37⁰ С в течение 40-55 минут. Замедление обесцвечивания более 90 минут свидетельствует о дефиците глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, более длительная задержка обесцвечивания говорит об отсутствии глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и наличии у пациента гемолитической анемии за счет энзимопатии.

2. Качественный метод по Бернштейну основан на обесцвечивании 2,6-дихлорфенилиндофенола в присутствии глюкозо-6-фосфата, НАД, феназинметасульфата, буферного раствора и исследуемых эритроцитов. В норме при наличии в эритроцитах глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы через 20 минут после смешивания компонентов пробы происходит обесцвечивание краски и содержимое пробирки приобретает красный цвет. В случае снижения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы обесцвечивание 2,6-дихлорфенилиндофенола неполное, а при дефиците глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы обесцвечивания не происходит.

3. Флуоресцентный скрининг-тест на дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы Бейтлера и Митчелла, основан на том, что появление НАДФН, обусловленное глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой, присутствующей в лизате клеток исследуемой крови, флуоресцирует под действием длинноволнового ультрафиолетового света. При дефиците

глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы клетки не способны произвести достаточное количество НАДФН, это приводит к отсутствию флуоресценции. Эритроциты с активностью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы менее 20% не производят флуоресценции. В качестве контроля положительной флуоресценции всегда необходимо исследовать образец нормальной крови. При ретикулоцитозе (например, во время эпизода острого гемолиза) флуоресцентный скрининг-тест может быть ложноположительным, так как в молодых клетках активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы высокая. В этом случае кровь исследуют повторно, когда количество ретикулоцитов вернется к исходному значению. Ложный дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и соответственно низкая флуоресценция, могут быть обусловлены анемией из-за относительно низкого количества эритроцитов в используемом для исследования образце крови (10 мкл). Каждое из вышеописанных обстоятельств можно скорректировать, однако в случае возникновения сомнений лучше перейти к количественному определению активности фермента.

Количественный метод определения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы

Принцип определения активности фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы типичный для биохимических исследований: определение при длине волны 340 нм кинетики изменения кофакторов НАДФ/НАДФН в реакционной смеси, в которую добавляют избыток субстратов таким образом, чтобы реакцией, лимитирующей скорость, была реакция с исследуемым ферментом.

В каждой лаборатории необходимо определять диапазон нормальной активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, которые не должны сильно отличаться от значений Международного совета по стандартизации в гематологии. В норме активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы составляет примерно:

- 11,0 \pm 1,6 мкмоль субстрата/г Hb в 1 минуту;
- 30,6 \pm 4,5 мкмоль субстрата/ 10¹¹ эритроцитов в минуту.

Следует помнить, что вместе с исследуемой пробой или в серию проб необходимо включать образец нормальной крови и кровь с дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (баранья

кровь) для обеспечения контроля качества выполняемых исследований.

Цитохимическое исследование фетального гемоглобина Метод Бетке

Принцип метода: фетальный гемоглобин не элюируется кислотой и докрашивается 1% раствором метилового фиолетового в розовый цвет в отличие от гемоглобина А. Это позволяет отличить эритроциты, содержащие фетальный гемоглобин, по их окраске от обесцвеченных эритроцитов, содержащих гемоглобин А. При использовании этого метода ретикулоциты, которые также устойчивы к вымыванию кислотой, окрашиваются в синий цвет.

Реактивы и оборудование:

- 80% этиловый спирт;
- смесь 0,1 М раствора лимонной кислоты в цитратно-фосфатном буфере;
- 1% раствор метилового фиолетового;
- термостат на 37⁰ С;
- микроскоп.

Ход исследования: после выполнения мазков из периферической крови обычным способом, их фиксируют 5 минут в 80% растворе этилового спирта, промывают дистиллированной водой и высушивают. Затем мазки погружают в предварительно прогретый в течение 30 минут до 37⁰С цитратно-фосфатный буфер с лимонной кислотой на 5 минут (для элюции гемоглобина), промывают дистиллированной водой, высушивают и докрашивают 1% раствором метилового фиолетового.

Интерпретация результатов исследования. В норме у взрослых встречаются в мазке единичные эритроциты, содержащие фетальный гемоглобин (эритроциты, окрашенные в розовый цвет). У новорожденных и у детей до 5 месячного возраста количество окрашенных эритроцитов увеличено, что связано с преобладанием эритроцитов содержащих фетальный гемоглобин. В дальнейшем происходит смена фетального гемоглобина на гемоглобин взрослых и количество окрашенных эритроцитов снижается. Патологическое увеличение количества

эритроцитов содержащих фетальный гемоглобин наблюдается при талассемии.

Эритроцитометрия

Принцип метода: измерение диаметра эритроцитов в окрашенном мазке с помощью окуляр-микрометра.

Оборудование:

- микроскоп;
- окуляр-микрометр с круглой стеклянной пластиной-шкалой, разделенной на 50 делений;
- объект-микрометр – предметное стекло имеющее шкалу длиной 2 мм, разделенную на 200 делений (каждое деление 10 мкм).

Ход исследования. Прежде чем приступить к измерению диаметра эритроцитов следует определить цену одного деления шкалы окуляр-микрометра, которая зависит от длины тубуса, на который насаживается окуляр, и от увеличения объектива. С этой целью на предметный столик устанавливают объект-микрометр таким образом, чтобы шкалы окуляр-микрометра и объект-микрометра совпали. Затем отсчитывают число делений шкалы окуляр-микрометра и определяют цену одного деления, учитывая то, что каждое деление объект-микрометра соответствует 10 мкм. Например, 20 делений окуляр-микрометра совпали с 40 делениями объект-микрометра, что соответствует 40 мкм, таким образом, одно деление – $40/20 = 2$ мкм. Оценивают одно деление шкалы один раз для определенного микроскопа, с помощью которого измеряют диаметр эритроцитов. Измерение диаметра эритроцитов в мазке выполняют, используя иммерсионный объектив и увеличение микроскопа $\times 100$ при максимальном освещении поля зрения. Измеряют диаметр 100-200 эритроцитов расположенных в поле зрения изолированно. Результаты измерения распределяют по группам в зависимости от величины диаметра. Зная цену одного деления и количество эритроцитов с одинаковым числом делений, относительную величину каждой группы представляют в процентах. Средний диаметр эритроцитов вычисляют умножением процента эритроцитов с определенным

диаметром на величину диаметра данной группы. Сумму всех произведений делят на 100.

Построение эритроцитометрических кривых: в координатной системе по оси абсцисс откладывают величины диаметров эритроцитов в микрометрах, по оси ординат – относительную величину каждой группы эритроцитов определенного диаметра, выраженную в процентах.

Интерпретация результатов исследования: в норме эритроциты распределяются по размеру в виде так называемой кривой Прайс-Джонса, которая имеет форму правильного колокола с основанием, границы которого колеблются в пределах от 5 до 9 мкм. Высота кривой достигает 70% и соответствует среднему диаметру эритроцитов, который определяется в пределах от 7,2 до 7,5 мкм. При наличии макро- или микроцитов эритроцитометрическая кривая имеет широкое основание, растянута. В случае преобладания макроцитов кривая сдвинута вправо, в сторону больших диаметров, в случае преобладания микроцитов – влево, в сторону меньших диаметров.

Оценка физико-химических свойств эритроцитов

Для оценки физико-химических свойств эритроцитов исследуют их стойкость к воздействию различных факторов. Наибольшее применение в медицине получил метод определения осмотической резистентности эритроцитов в модификации Л.И. Идельсон.

Принцип метода: количественное определение степени гемолиза эритроцитов в забуференных гипотонических растворах хлорида натрия.

Реактивы и оборудование:

- 10% забуференный раствор хлорида натрия (раствор может храниться при температуре +4 - +8⁰С в течение одного месяца), дистиллированная вода. Из основного раствора перед исследованием получают 1% раствор хлорида натрия, используемый для приготовления рабочих растворов следующих концентраций: 0,85; 0,8; 0,75; 0,7; 0,65; 0,6; 0,55; 0,5; 0,45; 0,4; 0,35; 0,30; 0,20; 0,10%.

- фотоэлектроколориметр;

- термостат на 37⁰С;
- дозаторы, наконечники.

Ход исследования:

- В 2 пробирки, содержащие по 2 капли гепарина вносят по 1,5 мл крови, перемешивают. Кровь одной из пробирок исследуют не позднее 2 часов с момента взятия, либо в течение 6 часов, если кровь хранилась в при +4⁰ С. Кровь из второй пробирки – через сутки после инкубации в термостате при температуре 37⁰ С.

В ряд пробирок (14 штук) вносят по 5 мл рабочих растворов хлорида натрия концентраций от 0,85 до 0,1%. В каждую пробирку с рабочим раствором вносят по 0,05 мл исследуемой крови, перемешивают и оставляют на 30 минут при комнатной температуре. Затем пробирки центрифугируют 5 минут при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость из каждой пробирки исследуют на фотоколориметре при длине волны 500-560 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см против холостой пробы. В качестве холостой пробы используют 1% раствор хлорида натрия. Вычисляют процент гемолиза, сравнивая экстинкции надосадочной жидкости в каждой пробирке с экстинкцией принятой за 100% гемолиз. За 100% гемолиз принимают гемолиз в пробирке, содержащей 0,1% раствор хлорида натрия. Расчет степени гемолиза ведут по формуле:

$$\frac{E_x}{E_1} \times 100;$$

где E₁ – экстинкция надосадочной жидкости в пробирке с 0,1% раствором хлорида натрия,

E_x – экстинкция исследуемой пробы,

100 – процент гемолиза в пробирке с 0,1% раствором хлорида натрия.

Через сутки исследуют кровь, инкубированную при температуре 37⁰С. Результаты исследования наносят на систему координат: на оси абсцисс отмечают концентрацию растворов хлорида натрия, на оси ординат – результаты расчетов. Кривая нормальной осмотической резистентности имеет S- образную

форму. Это говорит о том, что осмотическая резистентность нормальных эритроцитов в гипотонических растворах различается, постепенно изменяется с возрастом клеток. У самых молодых клеток она наивысшая, в то время как самые старые клетки наиболее хрупкие. Причиной этого является более высокое содержание натрия в старых эритроцитах при сниженной способности к его выведению.

Интерпретация результатов исследования. Осмотическая резистентность эритроцитов определяется отношением их объема к площади поверхности и соответственно отражает их способность захватывать определенное количество воды до наступления лизиса. Способность нормального эритроцита выдерживать пребывание в гипотонической среде обусловлена двояковогнутой формой, которая позволяет клетке увеличивать свой объем почти на 70% до критического натяжения поверхностной мембраны, преодоление этого предела сопровождается лизисом. В норме начало гемолиза отмечают при концентрации хлорида натрия 0,5-0,45% (минимальная резистентность), а полный гемолиз – при 0,4-0,35% (максимальная резистентность) растворе хлорида натрия. Понижение осмотической резистентности (появление гемолиза эритроцитов при более высокой концентрации хлорида натрия, чем в норме) наблюдается при наследственном микросфероцитозе и других наследственных аномалиях мембраны эритроцитов, аутоиммунных гемолитических анемиях. Повышение осмотической резистентности – при талассемии, наследственном ксероцитозе.

Гранулоцитопоз

В костном мозге из общего предшественника миелопоэза образуются коммитированные клетки-предшественники – КОЕ-ГМ, КОЕ-Г (колониеобразующие единицы грануломоноцитопоза, гранулоцитопоза), которые в результате дифференцировки и созревания превращаются в клетки гранулоцитарного ряда. В костном мозге выделяют два пула клеток гранулоцитарного ряда – пролиферирующий, состоящий из миелобластов, промиелоцитов, миелоцитов и пул

созревающих клеток – метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных гранулоцитов. Процесс созревания представляет собой изменение морфологии клеток: уменьшение размеров ядра, уплотнение хроматина, исчезновение ядрышек, сегментация ядра, увеличение объема цитоплазмы, исчезновение ее базофилии, появление в цитоплазме специфической зернистости. Регуляция гранулоцитопоэза до конечной стадии созревания гранулоцитов обеспечивается колониестимулирующими грануло- и грануломоноцитарными факторами (ГМ-КСФ, Г-КСФ).

Морфология клеток гранулоцитарного ряда

Миелобласт – первая морфологически различимая клетка гранулоцитарного ряда размерами 12-20 мкм в диаметре, округлой формы. Ядерно-цитоплазматическое соотношение 4:1. Ядро расположено центрально, имеет округлую или слегка овальную форму, по Романовскому-Гимзе окрашивается в красновато-фиолетовый цвет. Структура хроматина нежносетчатая. В ядре хорошо различаются от 2 до 5 ядрышек голубоватого цвета. Цитоплазма голубая, обычно без включений. На поверхности миелобласта располагаются следующие кластеры дифференцировки: CD45; CD13; CD33; CD34; CD38, антигены главного комплекса гистосовместимости HLA-DR. В норме количество миелобластов в среднем составляет 1% всех миелокариоцитов.

Промиелоцит имеет размеры 18-25 мкм в диаметре и является самой крупной клеткой гранулоцитарного ряда. Клетка имеет округлую форму. Ядерно-цитоплазматическое соотношение 3:1, ядро округлое или слегка бобовидное, часто расположено эксцентрично, окрашивается в красновато-лиловый цвет. Структура хроматина нежносетчатая, но на узловых точках сетки образуются утолщения базихроматина, поэтому она выглядит несколько грубее, чем у миелобласта. Ядрышки в ядре видны нечетко («угасающие нуклеолы»). Цитоплазма несколько шире, чем у миелобласта, голубовато-синего цвета с обильной азурофильной (красновато-фиолетового цвета) зернистостью, которая активно образуется на этой стадии. Иногда на стадии

промиелоцита цитоплазма может содержать уже сформированную специфическую зернистость: нейтрофильную, базофильную, эозинофильную. Для стадии промиелоцита характерны следующие кластеры дифференцировки: CD45; CD13; CD33; CD15. Содержание промиелоцитов в костном мозге в норме составляет 1-4%.

Миелоцит – клетка следующей стадии созревания гранулоцитов имеет размеры 12-18 мкм в диаметре, округлой или овальной формы. Ядерно-цитоплазматическое соотношение 2:1. Ядро располагается в центре или слегка эксцентрично. Форма ядра округлая или слегка бобовидная, при этом выемка в ядре не достигает предполагаемого центра клетки. Структура хроматина более грубая, чем у промиелоцита, неоднородная, с разделением на окси- и базихроматин. Молодые формы миелоцитов имеют более рыхлую структуру хроматина, более зрелые миелоциты – компактную. Ядрышек в ядре нет. Цитоплазма имеет розовый, розовато-фиолетовый или голубовато-розовый цвет, содержит азурофильную и в зависимости от дифференцировки специфическую зернистость. Дифференцировка клеток гранулоцитарного ряда на нейтрофилы, эозинофилы и базофилы начинается на стадии миелоцита. Нейтрофильная зернистость мелкая, пылевидная сине-фиолетового цвета. Эозинофильная зернистость крупная, округлая, одинакового размера, желто-розово-оранжевого, красно-коричневого цвета. Базофильная зернистость представляет собой разного размера гранулы (от крупных до пылевидных), темно-фиолетового цвета, которые наслаиваются на ядро. Кластеры дифференцировки миелоцита – CD45; CD13; CD15; CD33; CD11b/11c. Миелоцит – последняя клетка гранулоцитарного ряда, способная к делению. Содержание миелоцитов в костном мозге колеблется от 7 до 12%

Метамиелоцит имеет размеры 10-16 мкм в диаметре, округлую или слегка овальную форму. Ядерно-цитоплазматическое соотношение 1:1. Ядро имеет бобовидную или почковидную форму, вдавление в метамиелоците более выражено, чем у миелоцита, и достигает или выходит за пределы предполагаемого центра ядра, окрашивается в красно-фиолетовый цвет. Структура хроматина глыбчатая, компактная, ядрышек нет. Цвет цитоплазмы от бледно-голубого до розового,

цитоплазма содержит мелкую азурофильную и специфическую зернистость в зависимости от дифференцировки – нейтрофильную, эозинофильную, базофильную. Кластеры дифференцировки метамиелоцита такие же, как и у миелоцита. Содержание метамиелоцитов в костном мозге – 8-15%.

Палочкоядерный гранулоцит имеет размеры 10-14 мкм в диаметре, округлую форму. Ядерно-цитоплазматическое соотношение 1:1. Ядро темного красно-фиолетового цвета, имеет палочковидную форму с одинаковым диаметром по длине, может быть изогнуто в виде подковы, закручено. Поперечник ядра палочкоядерного гранулоцита, в отличие от метамиелоцита, укладывается в длинник ядра более 3 раз (у метамиелоцита менее 3 раз). Структура хроматина неравномерная крупноглыбчатая, плотная, ядрышек нет. Цитоплазма розового цвета, содержит специфическую зернистость в зависимости от дифференцировки. На стадии палочкоядерного гранулоцита заканчивается процесс формирования специфической зернистости. Кластеры дифференцировки палочкоядерного гранулоцита - CD45; CD13; CD15; CD11b/11c. В норме в периферическом русле количество палочкоядерных нейтрофилов составляет 0-5%. Увеличение количества палочкоядерных нейтрофилов в периферической крови является чаще всего следствием воспаления, бактериальной инфекции.

Сегментоядерный гранулоцит имеет размеры 9-15 мкм в диаметре, округлой формы. Ядро темного красно-фиолетового цвета, расположено центрально. Ядерно-цитоплазматическое соотношение низкое, в пользу цитоплазмы. Структура хроматина в сегментах неравномерная, крупноглыбчатая. Цитоплазма розовая, содержит специфическую зернистость. Гранулоцит, содержащий в цитоплазме эозинофильную зернистость, является эозинофилом, базофильную зернистость - базофилом, при наличии пылевидной, сине-фиолетового цвета зернистости, гранулоцит является нейтрофилом. Сегментоядерный нейтрофил состоит из 2-5 сегментов, которые связаны между собой тонкими перемычками, в которых не определяется вещество ядра. В тех случаях, когда наблюдается нагромождение частей ядра друг на друга и невозможно различить палочкоядерный и

сегментоядерный нейтрофил, клетку причисляют к наиболее встречающейся группе – к сегментоядерным нейтрофилам.

Процесс формирования зрелого нейтрофила из миелобласта занимает 10-12 дней. Зрелые нейтрофильные гранулоциты не сразу выходят в периферическое русло, а образуют костномозговой резерв (составляет 60-70% всех нейтрофилов), в котором в течение 5-7 дней повышается их функциональная активность. В кровоток поступают только зрелые полностью дифференцированные клетки, имеющие полный набор поверхностных рецепторов (в том числе молекул, являющихся рецепторами для хемотаксических сигналов), цитоплазматических гранул и биологически активных веществ. Основными маркерами зрелых нейтрофилов являются - CD45; CD50; CD32; CD33; CD18; CD16; CD13; CD11c; CD10, специфическим маркером зрелых нейтрофилов является сочетание нескольких гликопротеинов на мембране CD w 18, образующий мембранный гликопротеиновый комплекс.

В периферическом русле часть нейтрофилов располагается пристеночно, образуя пристеночный или маргинальный пул, часть образует циркулирующий пул. Соотношение пристеночного пула к циркулирующему пулу составляет 1,5-2,0:1. Нейтрофильные гранулоциты периферического русла составляют примерно 1% от всех нейтрофилов. В норме зрелая клетка циркулирует в кровотоке 2-10 часов, а затем поступает в ткани, образуя тканевый пул, клетки которого составляют 30-40% от всех нейтрофильных гранулоцитов. В тканях протекает главный этап нейтрофилов – выполнение своих функций. Продолжительность жизни нейтрофилов в тканях составляет 2-3 дня, затем происходит их гибель по механизму апоптоза.

Клеточная мембрана нейтрофилов имеет множество рецепторов, которые регулируют функциональную активность нейтрофилов и обуславливают связь нейтрофилов с их микроокружением. На поверхности нейтрофилов расположены рецепторы для Fc-фрагмента иммуноглобулинов, компонентов комплемента (C3, C5a, CR1), а также интегрины, селектины, которые обеспечивают взаимодействие нейтрофилов с эндотелиальными клетками и последующую миграцию нейтрофилов из кровеносного русла в ткани. Под клеточной

мембраной располагается сеть микротрубочек, миофиламентов, которые обеспечивают подвижность нейтрофилов. Цитоплазма нейтрофилов имеет несколько видов гранул – первичные «неспецифические», вторичные «специфические» и третичные, содержимое гранул включает следующие вещества:

- пероксидазу, более 20 различных протеолитических ферментов, бактерицидные белки (лактоферрин, дефензины, катионные антимикробные белки – катепсин G, азуроцидин A), лизоцим, кислую, щелочную фосфатазу, обуславливающие протеолиз и переваривание микроорганизмов;

- эластазу – фермент, который при увеличении количества нейтрофилов, может приводить к деструкции тканей в очаге воспаления;

- металлопротеиназы (коллагеназа, желатиназа), которые могут вызвать разрушение внеклеточного матрикса и другие.

Нейтрофилы относятся к неспецифическим факторам защиты от внешних и внутренних агентов, действие которых направлено на поддержание постоянства внутренней среды организма.

Основной функцией нейтрофилов является фагоцитоз, который проходит в несколько этапов. Интегрины – молекулы адгезии, к которым нейтрофилы экспрессируют рецепторы на поверхности мембраны, способствуют прикреплению нейтрофилов к эндотелию сосудов. Под действием цитокинов происходит быстрая миграция нейтрофилов в ткани через сосудистую стенку и их хемоаттрактантная активация (направленное движение к очагу воспаления). В тканях, после встречи нейтрофилов с антигеном, происходит захват чужеродного объекта. Нейтрофилы захватывают только опсонизированные (с помощью опсонинов адсорбированные на поверхность) частицы. Опсонины (некоторые компоненты системы комплемента, иммуноглобулины, фибронектин, липополисахарид-связывающий белок и другие) обволакивают антигены, готовя их к фагоцитозу. Затем нейтрофил путем инвагинации мембраны формирует фагосому, которая окружает и замыкает объект в полости. В результате контакта лизосом с фагосомой, гранулы нейтрофилов проникают в фагосому, где происходит их внутриклеточная дегрануляция, и далее киллинг

объекта фагоцитоза. Последняя стадия фагоцитоза – переваривание. В результате эффективного фагоцитоза нейтрофил разрушается путем физиологической, генетически запрограммированной смерти – апоптоза.

Нейтрофильные гранулоциты выполняют дезинтоксикационную функцию, так как вырабатывают ферменты против конкретных токсинов и веществ (например, липоксины – противовоспалительные медиаторы, ацил-оксиацилгидралазу – фермент, разрушающий липид А, являющийся активным компонентом грам-отрицательной микрофлоры).

Нейтрофилы синтезируют и секретируют целый ряд цитокинов (ФНО α , ИЛ-1альфа, ИЛ-1бета, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12), колониестимулирующих факторов (ГМ - КСФ, Г-КСФ, М – КСФ, TGF бета), которые участвуют в их созревании, обеспечивают их функциональную активность, участие в реакции воспаления, а также определяют влияние нейтрофилов на эффекторные функции других клеток;

Кроме того, нейтрофилы принимают участие в реакциях свертывания крови, так как являются источниками мембранного активатора внутреннего пути свертывания, выделяют прекалликреин, входят в состав белого тромба.

В норме в периферическом русле количество сегментоядерных нейтрофилов составляет 47-72%. Мобилизация клеток из костномозгового резерва в периферическое русло и перераспределение клеток из пристеночного в циркулирующий пул и обратно происходит под влиянием различных факторов. При интенсивной мышечной нагрузке, при беременности и родах, приеме большого количества белковой, жирной пищи, сильных эмоциях, после ванн, физиопроцедур, после судорожных состояний и в других случаях происходит перераспределение нейтрофилов из маргинального пула в циркулирующий пул – перераспределительный нейтрофилез. При этом количество нейтрофилов в циркулирующем пуле возрастает в 1,5-2 раза. Глубокий сон, переохлаждение, шоковое состояние, длительное голодание, длительное пребывание на солнце способствует переходу нейтрофилов из циркулирующего пула в пристеночный пул, обуславливая перераспределительную нейтропению. Такие

изменения количества нейтрофилов в периферической крови кратковременны и называются относительными, так как общее количество лейкоцитов при этом не изменяется.

Абсолютный нейтрофилилез – увеличение количества нейтрофилов более $6 \times 10^{12}/л$ на фоне лейкоцитоза – часто наблюдается при острых бактериальных инфекциях, экзо- и эндогенных интоксикациях (уремия, гемолиз, лизис клеток, отравления и другие), травматическом повреждении тканей. В этом случае в периферической крови отмечается умеренный лейкоцитоз – $15-20 \times 10^9/л$, сдвиг лейкоцитарной формулы влево до единичных миелоцитов и дегенеративные изменения нейтрофилов.

Истинное увеличение числа циркулирующих нейтрофилов наблюдается в том случае, когда повышенная продукция и выход в периферическое сосудистое русло наблюдается в результате стимуляции костномозгового кроветворения. Воздействие любого из этиологических факторов стимулирует выход клеток из костного мозга и снижение костномозгового гранулоцитарного резерва. Выход клеток из костного мозга приводит к увеличению циркулирующего пула нейтрофилов и параллельному снижению пристеночного пула. Активация системы комплемента, выработка интерлейкинов и повышенная трансмиграция клеток в ткани повышает пролиферацию костным мозгом клеток гранулоцитарного ряда. Крайне выраженный нейтрофильный лейкоцитоз (общее число гранулоцитов может превышать 50 тысяч на мкл крови) с гиперрегенераторным сдвигом влево, при поликлональном характере гранулоцитов, наблюдается при так называемых миелоидных лейкоидных реакциях. Глубина сдвига влево отражает тяжесть патологического процесса. В крови при миелоидной лейкоидной реакции появляются миелоциты и даже промиелоциты. Это – крайнее проявление реактивной нейтрофилии. Термин «лейкемоидные реакции» был предложен в 1926 г. Крумбхаром для обозначения изменений в крови и органах кроветворения, напоминающих неопластические заболевания системы кроветворения, но имеющие реактивный характер. Дифференциальная диагностика нейтрофильного лейкоцитоза и хронического миелолейкоза (табл. 2).

Таблица 2. – Дифференциальная диагностика нейтрофильного лейкоцитоза и хронического миелолейкоза (ХМЛ)

Признак	Лейкемоидная реакция нейтрофильного типа	ХМЛ
клиника	клинические проявления основного заболевания	длительное состояние относительного благополучия
количество лейкоцитов	умеренный лейкоцитоз	высокий лейкоцитоз, реже количество лейкоцитов не изменено или снижено
лейкоцитарная формула	сдвиг влево до единичных миелоцитов, поликлональный характер гранулоцитов, дегенеративные изменения ядер и цитоплазмы гранулоцитов	сдвиг влево до промиелоцитов, миелобластов, наличие цитологических особенностей неоплатических миелоидных элементов (например, тельца Ауэра)
количество эозинофилов	снижение до полного отсутствия	эозинофильно-базофильная ассоциация
картина костного мозга	клеточность нормальная или некоторое увеличение клеток гранулоцитарного ростка, лейко-эритробластический индекс 5:1	гиперплазия гранулоцитарного ростка, лейко-эритробластический индекс 50:1
цитохимическое исследование	высокая или нормальная активность щелочной фосфатазы	низкая активность щелочной фосфатазы
цитогенетическое исследование	не выявляет хромосомных аномалий	наличие Ph- хромосомы, положительный тест на химерный белок АВ/ВСА
динамика состояния периферической крови	преходящий характер изменений, быстрая динамика картины крови.	тенденция нарастания лейкоцитоза, нарастание анемии

Абсолютная нейтропения – состояние, при котором в периферической крови нейтрофильных гранулоцитов насчитывается менее $1,84 \times 10^9/\text{л}$. Помимо перераспределительной нейтропении различают также нейтропению селективную:

1. Врожденную:

1.1 семейная нейтропения Глассена – аутосомно-доминантная особенность, которая может считаться расовой и присуща индивидам негроидной расы, у которых количество нейтрофилов колеблется в пределах $2,0-2,5 \times 10^9/\text{л}$;

1.2 синдром Швахмана-Даймонда-Оски – панцитопения в сочетании с панкреатической недостаточностью;

- другие врожденные наследственные формы селективной нейтропении.

2. Приобретенную нейтропению, которая обусловлена угнетением продукции, ускорением гибели, либо выраженной маргинацией и трансмиграцией нейтрофилов в результате:

2.1 инфекции:

- наиболее часто нейтропенические состояния связаны с вирусными инфекциями (инфекционный мононуклеоз, вирусный гепатит, краснуха, ветряная оспа, грипп, ВИЧ-инфекции и большинство ОРИ);

- нейтропения наблюдается при отдельных бактериальных инфекциях (сальмонеллез, особенно – брюшной тиф, коклюш), на фоне пиогенной бактериальной инфекции, после длительной нейтрофилии, при тяжелом генерализованном течении бактериальных инфекций – «нейтропения истощения»;

2.2 аутоаллергии к нейтрофильным антигенам, например, при системной красной волчанке, ревматоидном артрите, синдроме Фелти, при системных иммунопатологических васкулитах (болезнь Шенлейн-Геноха, гранулематоз Вегенера), под действием лекарств-гаптенов и других случаях;

2.3 токсического поражения нейтрофилов, которое развивается под действием лекарственных препаратов или их комбинаций (антидифтерийные препараты, аминогликозиды, бета-лактамовые, макролидные антибиотики, сульфаниламиды, неспецифические противовоспалительные средства и другие). При лекарственной нейтропении степень поражения часто

тяжелая, вплоть до агранулоцитоза (менее $0,75 \times 10^9$ /л нейтрофилов в периферическом русле);

2.4 метаболических расстройств (кетоацидоз, болезнь Гоше и другие).

Изменение морфологии гранулоцитов

Качественные изменения, которые могут затрагивать ядро, цитоплазму нейтрофилов, бывают врожденными и приобретенными. Под действием инфекций, тяжелых интоксикаций, воспалительных процессов нейтрофилы могут претерпевать морфологические изменения – дегенеративные изменения, которые выявляются на фоне увеличения числа нейтрофилов или сдвига лейкоцитарной формулы влево.

1. Токсогенная зернистость

В норме нейтрофилы в зависимости от метода окраски содержат в цитоплазме мелкие пылевидные сине-фиолетовые или красные гранулы. При токсическом изменении в цитоплазме нейтрофилов выявляется грубая, обильная черно-синего цвета зернистость, обусловленная усилением синтеза лизосомальных ферментов. При подсчете лейкоцитарной формулы оцениваем токсогенную зернистость, выражая результат в процентах или плюсами:

- 25% нейтрофилов содержат токсогенную зернистость - +;
- 50% нейтрофилов содержат токсогенную зернистость - ++;
- 75% нейтрофилов содержат токсогенную зернистость - +++;
- 100% нейтрофилов содержат токсогенную зернистость - ++++.

2. Вакуолизация ядер и цитоплазмы

При патологических состояниях может наблюдаться вакуолизация ядер нейтрофилов, а также наличие крупных, неравномерно распределенных вакуолей в цитоплазме – проявление жировой дегенерации клеток.

3. Тельца Деле

Тельца Деле – цитоплазматические включения в виде бледно-голубых палочковидных пятен, локализирующихся вблизи клеточной мембраны, состоят из рибосомальной РНК.

4. Пельгеризация ядер

Появление нейтрофилов с гипосегментированными ядрами – ранний морфологический признак нарушения гранулоцитопоеза - процесс созревания гранулоцитов заканчивается на стадии палочкоядерных нейтрофилов. Ядра гранулоцитов имеют вид пенсне, гантели, боба, арахиса, короткой толстой палочки.

5. Гиперсегментация ядер

Ядро нормальных сегментоядерных нейтрофилов разделено на 3-5 сегментов. Появление значительного количества нейтрофилов, ядра которых состоят более чем из 5 сегментов, говорит о гиперсегментации ядер или нейтрофильном сдвиге вправо. Гиперсегментация ядер характерна для заболеваний, состояний, сопровождающихся нарушением синтеза ДНК (мегалобластная анемия, лечение цитостатиками).

6. Пикноз ядра

Пикноз ядра – морфологическое проявление апоптоза, усиливающегося при патологических состояниях. Ядро или его отдельные участки становятся более темными, плотными и бесструктурными.

К дегенеративным изменениям нейтрофилов относятся также кариорексис (фрагментация ядра), лизис ядра или всей клетки, асинхронность созревания ядра и цитоплазмы, гипогрануляция (уменьшение количества гранул в цитоплазме нейтрофилов), анизоцитоз нейтрофилов (наличие микро- и макроформ).

К наследственным морфологическим изменениям нейтрофилов относятся:

1. Аномалия Олдера – редкое наследственное заболевание, которое проявляется наличием крупных темных гранул в цитоплазме не только нейтрофилов, но и других лейкоцитов, что позволяет дифференцировать это заболевание от токсогенной зернистости, для которой характерно появление гранул только в нейтрофилах. При аномалии Олдера снижается продукция мукополисахаридов, что сопровождается образованием и отложением в цитоплазме липидов.

2. Синдром Чедиака-Хигаси – редкое заболевание, которое наследуется аутосомно-рецессивному типу и характеризуется образованием гигантских зеленовато-серого и красного цвета

гранул в цитоплазме нейтрофилов. Заболевание обусловлено дефектом белка, который принимает участие в слиянии лизосом с эндосомами, что приводит к нарушению высвобождения содержимого лизосом, также наблюдается нарушение функций нейтрофилов и тромбоцитов.

3. Аномалия Пельгера-Хьюета наследуется по доминантному типу – это доброкачественное заболевание, при котором ядра нейтрофилов теряют способность к сегментации. Носители аномалии – практически здоровые люди, так как лейкоциты полноценные в функциональном отношении, поэтому аномалия называется невинной. Основными признаками аномалии являются: гипосегментированное ядро с грубой, плотной, почти пикнотичной структурой хроматина на фоне зрелой цитоплазмы. Зрелые нейтрофилы содержат ядра с двумя сегментами (очки, пенсне) или имеют форму боба, гимнастических гирь, песочных часов, иногда можно видеть круглые ядра. При аномалии Пельгера-Хьюета 70-95% нейтрофилов содержат гипосегментированные ядра, остальная часть при этом полноценными клетками. При подсчете лейкоцитарной формулы в отчете обязательно указывается на то, что лейкоциты представлены пельгеровскими клетками или дается заключение о том, что картина крови характерна для наследственной невинной пельгеровской аномалии лейкоцитов. Для подтверждения наследственной природы заболевания исследуют кровь ближайших родственников.

Эозинофильные гранулоциты

Распознавание клеток этой линии начинается на стадии миелоцита, когда активно формируются специфические гранулы. Далее эозинофилы проходят все последующие стадии дифференцировки, не отличающиеся от таковых у нейтрофильных гранулоцитов. Зрелые клетки эозинофильного ряда имеют округлую форму, размеры 10-16 мкм в диаметре, ядерно-цитоплазматическое соотношение 1:1. Ядро темно-фиолетового цвета состоит обычно из 2 сегментов, структура хроматина неравномерная, крупно-глыбчатая. Цитоплазма оксифильная, заполнена крупными, одинакового размера, желто-

розово-оранжевыми или красно-коричневыми округлыми гранулами – это вторичные или специфические гранулы.

Процесс образования эозинофилов в костном мозге занимает 5-7 суток, где также как и у нейтрофильных гранулоцитов различают два пула – пролиферирующий и созревающий. Ростовым фактором эозинофилов является ИЛ-5. В отличие от нейтрофилов, зрелые неделящиеся клетки эозинофильного ряда созревают быстрее и сразу же выходят в периферическое русло, где циркулируют 6-12 часов, не образуя маргинального пула. Затем эозинофилы мигрируют в ткани, продолжительность жизни тканевых эозинофилов составляет 4-30 часов. Тканевый пул эозинофилов значительно превышает их количество в сосудистом русле. Эозинофилы в тканях распределены неравномерно. Наибольшее количество эозинофилов находится в подслизистом слое дыхательного, пищеварительного и частично мочеполового тракта. По некоторым данным эозинофилы способны возвращаться из тканей в периферическую кровь, тем самым увеличивая период полужизни в крови до 44 часов. Продукция эозинофилов в костном мозге и их выход в кровь стимулируется цитокинами - ИЛ-3, ИЛ-5.

На поверхности мембраны эозинофилов имеются кластеры дифференцировки CD52; CD69; CD40 и другие; рецепторы к Fc-фрагменту молекулы иммуноглобулина, рецепторы для компонентов комплемента, молекулы адгезии, рецепторы к гистамину и другим вазоактивным кининам. В цитоплазме эозинофилов содержатся гранулы. На стадии промиелоцита наблюдаются 2 вида гранул: преобладающие первичные крупные почти базофильные и вторичные эозинофильные. Вторичные гранулы более выражены на стадии миелоцита и обуславливают специфичность эозинофильного гранулоцита. Основными компонентами гранул зрелых эозинофилов являются – главный щелочной белок (катионный белок), также перекиси, обладающие бактерицидным действием. Помимо катионного белка гранулы эозинофилов содержат кислую фосфатазу, коллагеназу, эластазу, катепсин, простагландины, гистаминазу, фосфолипазу, арилсульфатазу и другие. Главный щелочной белок обладает цитотоксическим действием, повреждает некоторые личинки

гельминтов, нейтрализует гепарин. Простагландины препятствуют дегрануляции тучных клеток, ферменты гранул эозинофилов инактивируют гистамин, гепарин и тем самым нейтрализуют продукты секреции тучных клеток. Арилсульфатаза подавляет анафилактоидные вещества, уменьшая реакцию гиперчувствительности немедленного типа.

Функциональными активаторами эозинофилов являются липиды (лейкотриены), белки (иммуноглобулины, в частности Ig G), компоненты комплемента (C3a, C5a), цитокины (ИЛ-3, ИЛ-5) и колониестимулирующий фактор для грануло-моноцитопоэза (КСФ - ГМ). Движение эозинофилов в тканях к месту поражения обусловлено такими хемоаттрактантами, как гистамин, иммунные комплексы, ИЛ-8, воспалительный белок макрофагов (MIP-1a). Одним из основных хемотаксических факторов для эозинофилов является регулятор активации, экспрессируемый и секретлируемый Т-лимфоцитами (RANTES), который наиболее эффективно мобилизует эозинофилы в очаг поражения.

Функции эозинофилов заключаются в участии в следующих важных механизмах защиты организма:

- Играют важную роль в аллергических реакциях немедленного типа, так как предупреждают генерализацию иммунного ответа, контролируют и нейтрализуют избыточное выделение гистамина. Эозинофилы способны быстро мигрировать в ткани, концентрироваться, ограничивая очаг аллергической реакции с помощью местного некроза и фиброобразования вокруг очага.

- В механизмах защиты при паразитозах, участие в противогельминтном иммунитете (являются эффекторами), в реакциях антителозависимой клеточной цитотоксичности. Благодаря экспрессии на мембране рецепторов Fc-фрагменту IgE, наличию в гранулах цитоплазмы основного щелочного белка, эозинофилы способны лизировать личинки. Соприкосновение эозинофилов с личинками, покрытыми IgE, IgG- антителами и активированными белками системы комплемента C3, вызывает дегрануляцию и проникновение содержимого гранул в цитоплазму личинок с отложением основного щелочного белка и эозинофильной пероксидазы на поверхности личинок, что вызывает их гибель.

- обладая, хотя и слабой по сравнению с нейтрофилами, фагоцитарной активностью, обуславливают внеклеточный цитолиз объектов фагоцитоза, которыми могут быть бактерии, грибы, продукты распада тканей, иммунные комплексы. Механизмы фагоцитоза у эозинофилов такие же, как и у нейтрофилов, но переваривание и бактерицидная способность у эозинофилов значительно уступает нейтрофилам.

- Продукция и секреция цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5), фактора некроза опухоли (ФНО), гамма - интерферона (ИНФ – гамма), кроме того, цитоплазматические гранулы секретируют большое количество ферментов, обуславливающих характерные свойства эозинофилов. Эозинофилы способны синтезировать серотонин, простагландины, факторы активации тромбоцитов (ФАТ) и некоторые другие медиаторы воспаления.

- Участие в воспалительных процессах: являются понижающими регуляторами гиперергического воспаления, так как секретируют противовоспалительные медиаторы – фосфолипазы В и D (разрушают ФАТ), гистаминазу (инактивируют гистамин секреторных гранул тканевых базофилов), арилсульфатазу ПВ (разрушают лейкотриены), карбоксипептидазу N (инактивирует анафилотоксины), кининазу (снижает активность кининов);

- секреция ферментов, биологически активных веществ обуславливает участие эозинофилов в процессах свертывания крови.

При подсчете лейкоцитарной формулы количество эозинофилов в норме составляет 0,5-5% или в абсолютных цифрах - $0,02-0,3 \times 10^9/\text{л}$. Увеличение количества эозинофилов более 5% – эозинофилия. Причинами эозинофилии являются:

1. Предприступный период анафилактических состояний при бронхиальной астме, атопическом дерматите, крапивнице, синдроме Стивенса-Джонсона, Лайелла так как в этом случае мастоциты и макрофаги слизистых оболочек и соединительной ткани кожи и стромы органов выделяют хемоаттрактанты для эозинофилов – эотоксины.
2. Паразитарные заболевания – анкилостомоз, стронгилоидоз, филяриоз, шистосомоз, трихинеллез, токсокароз, аскаридоз, описторхоз, эхинококкоз, пневмоцистная пневмония,

лямблиоз, менее характерна эозинофилия для для дифиллоботриоза, цистицеркоза, энтеробиоза.

3. Начальный период выздоровления при многих бактериальных инфекциях, инфекции небактериального характера (хламидийная пневмония, энтеровирусные, респираторно-синтициальные инфекции, кокцидиомикоз и другие).
4. Иммунопатологические заболевания – ревматоидный артрит, синдром Шегрена, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, синдром Дресслера, аутоиммунный гепатит и другие.
5. Иммунодефицитные состояния (синдром Иова, синдром Вискотта-Олдрича и другие).
6. Гемобластозы и другие неоплазии (лимфогранулематоз, Т-клеточные лимфомы – грибовидный микоз/ синдром Сезари, хронический миелолейкоз, гистиоцитоз, рак носоглотки, бронхов, желудка, толстого кишечника, щитовидной железы, остеосаркома и другие).
7. Эндокринопатии (болезнь Аддисона, пангипопитуитаризм).
8. Хронические кожные болезни.

Выраженная, продолжительная эозинофилия независимо от причин, вызвавших ее, приводит к вторичным системным нарушениям, которые связаны с цитотоксическим действием продуктов эозинофилов на собственные клетки, особенно – нервные и эпителиальные с формированием эозинофильных инфильтратов. Эозинофильные инфильтраты формируются в малых артериях мозга, легких, печени, селезенки, сердца и других органов, нарушая их функцию (неспецифический эозинофильный миокардит Абрамова-Фидлера, болезнь Леффлера, гепатопатии, асцит, эозинофильный гранулематозный васкулит Чарга-Стросса, сердечная недостаточность и другие).

Снижение количества эозинофилов менее 0,2% – эозинопения – наблюдается при стрессовых состояниях, при интоксикациях, аллергических реакциях, на фоне нейтропении, в послеприступном периоде анафилактических состояний, при высоком уровне кортикостероидов, например, при гиперкортицизме, характерно для острого периода инфекций.

Базофильные гранулоциты

Базофилы и мастоциты дифференцируются из колониеобразующих единиц тучных клеток (Mast-CFC). Дифференцировка базофилов в костном мозге происходит под действием ростовых факторов – ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ГМ - КСФ и занимает от 1,5 до 5 суток. В ходе дифференцировки выделяют два пула - пролиферирующий и созревающий. Количество базофильных бластов, промиелоцитов и миелоцитов в миелограмме составляет 0,1-0,5%, т.е. это довольно редкие клетки костного мозга. Зрелые базофильные гранулоциты имеют округлую форму, в диаметре составляют 8-15 мкм, содержат ядра неправильной, неопределенной формы, лопастные, иногда разделенные на 2-3 доли, окрашенные в фиолетово-розовый цвет. Контуры ядер и структура хроматина нечеткие, расплывчатые из-за обилия гранул, наслаивающихся на ядро. Базофилы содержат в цитоплазме круглые разнокалиберные темно-фиолетового или черно-синего цвета гранулы. Созревшие базофилы из костного мозга поступают в периферическую кровь, где циркулируют около 6 часов, затем мигрируют в ткани, где через 1-2 суток, после дегрануляции и выполнения основной эффекторной функции, погибают. Гранулы базофилов содержат гистамин, гистидин, гепарин, хондроитинсульфат А и С, серотонин, ферменты (трипсин, химотрипсин, пероксидазу, РНКазу, арилсульфатазу, бета-глюкуронидазу), лейкотриены, тромбоксаны, простагландины, фактор хемотаксиса эозинофилов, фактор активации тромбоцитов, фактор хемотаксиса нейтрофилов, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ФНО-альфа, ГМ-КСФ и другие.

В развитии тучных клеток принимают участие ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-11, гамма-интерферон (ИНФ-гамма), трансформирующий рост фактор, ГМ-КСФ, IgE. Тучные клетки имеют размеры от 5 до 30 мкм в диаметре, неопределенной формы ядро и обилие гранул темно-фиолетового цвета, наслаивающихся на ядро. В гранулах содержатся полисахариды, амины, металлы, ферменты, белки. Мастоциты на поверхности мембраны экспрессируют рецепторы к IgE, IgG, CD28, CD34 – маркер ранних миелоидных предшественников, CD123 – специфический маркер мастоцитов, молекулы адгезии. Тучные

клетки локализуются в эпителии, подслизистом слое дыхательного, урогенитального и желудочно-кишечного тракта, в коже, соединительной ткани, серозных оболочках. На формирование окончательного фенотипа тучных клеток влияет микроокружение. На дифференцировку, активность, продолжительность жизни мастоцитов оказывают влияние белки внеклеточного матрикса. Тучные клетки в отличие от базофилов способны к делению, кроме того, продолжительность жизни в тканях у тучных клеток больше и может составлять месяцы и годы.

Базофилы и тучные клетки выполняют ряд функций:

- Влияют на проницаемость сосудистой стенки (вырабатывают вазоактивные вещества) и тем самым регулируют микроциркуляцию и трофику тканей.

- Принимают участие в реакциях гиперчувствительности немедленного типа, так как экспрессируют на поверхности рецепторы к IgE. В случае сенсибилизации в организме вырабатываются антитела IgE, которые адсорбируются на поверхности базофилов, мастоцитов. Аллергены, попадая в организм, образуют с IgE комплексы антиген-антитело на поверхности тучных клеток, базофилов, вызывая их активацию, слияние мембраны гранул с цитоплазматической мембраной и выброс содержимого гранул наружу. Тучные клетки способны восстанавливать гранулы после дегрануляции.

- Продуцируют и секретируют хемокинины и цитокины – ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-13, ГМ-КСФ, ФНО (характерно для тучных клеток), макрофагальный воспалительный протеин MIP-1альфа (характерно для базофилов), фактор стволовых клеток (ФСК). ИЛ-4, секретируемый мастоцитами, является регулятором В-лимфоцитов, базофилов, моноцитов, дендритных клеток, участвует в аллергических, противоопухолевых и противовоспалительных процессах. Базофилы также секретируют лейкотриены, тромбоксаны, простагландины, серотонины, фактор хемотаксиса эозинофилов и нейтрофилов, фактор активации тромбоцитов и другие.

- Принимают участие в процессах свертывания крови, так как в гранулах базофилов содержится гепарин (антикоагулянт).

- Участвуют в метаболизме триглицеридов (гепарин активирует липазу).

В лейкоцитарной формуле на долю базофилов приходится не более 0-1%, а в абсолютных цифрах не более $0,065 \times 10^9/\text{л}$. Увеличение количества базофилов более 1% – базофилия. Увеличение количества базофилов наблюдается при аутоиммунных заболеваниях (неспецифический язвенный колит, коллагенозы), анафилактических аллергических реакциях, при некоторых гельминтозах (анкилостомидоз), при аутоиммунных эндокринопатиях (тиреоидит, сахарный диабет 1 типа, микседема), при миелопролиферативных неоплазиях (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, хронический миелолейкоз). Базофилия может наблюдаться при лимфогранулематозе. Избыток соединительнотканых тучных клеток наблюдается при идиопатическом системном мастоцитозе. Базофилия также может наблюдаться перед менструацией, во время беременности, на фоне лечения эстрогенами, после спленэктомии.

Моноцитопоз

В 1969 г. клетки моноцитoidного ряда – ранние костномозговые предшественники моноцитов и макрофагов, пул циркулирующих в периферическом русле моноцитов и тканевые макрофаги – были объединены в систему мононуклеарных фагоцитов (СМФ), что официально утверждено в бюллетене ВОЗ 1972 г. Ранние предшественники мононуклеарных фагоцитов развиваются из полипотентных стволовых кроветворных клеток (СКК), коммитированных в общие предшественники грануломоноцитопоза (КОЕ - ГМ). Коммитированные общие предшественники грануломоноцитопоза дают начало колониеобразующим единицам макрофагов (КОЕ – М), дифференцирующимся и пролиферирующим в монобласты и промиелоциты. В костном мозге клетки моноцитарного ряда представлены преимущественно пролиферирующим пулом, лишь небольшое количество моноцитов дифференцируется в резидентные или оседлые макрофаги костного мозга. В костном мозге количество моноцитов составляет 1-2% от всех миелокариоцитов (см. CD-диск).

Процесс регуляции роста и дифференцировки клеток моноцитарной линии осуществляется рядом ростовых факторов – стимуляторов (ИЛ-3, ГМ-КСФ, М-КСФ) и ингибиторов (интерферон – альфа и бета, простогландины, ИЛ-10). По мере дифференцировки монобласта в промоноцит, моноцит и далее в макрофаг клетка претерпевает целый ряд морфологических и функциональных изменений.

Морфология клеток моноцитарного ряда

Монобласт – одна из ранних морфологически различимых клеток моноцитарного ряда. Клетка имеет округлую форму диаметром 15-20 мкм. Ядерно-цитоплазматическое соотношение 4:1. Ядро красно-лилового цвета, округлой, овальной или слегка бобовидной формы, имеет нежносетчатую структуру хроматина, содержит 2-4 нуклеолы голубоватого цвета. Цитоплазма монобласта узкая, голубого цвета, не содержит включений. Дифференцируют монобласт с другими бластами в соответствии с клеточным фоном препарата, а также используя современные методы дифференцировки (цитохимические, иммунохимические методы).

Промоноцит – клетка округлой формы, диаметром 11-15 мкм. Ядерно-цитоплазматическое соотношение 3:1. Ядро промоноцита имеет овальную, бобовидную форму со слегка волнистым контуром, более грубую, чем у монобласта структуру хроматина, содержит остатки ядрышек. Цитоплазма серо-голубого цвета может содержать нежную пылевидную азурофильную зернистость.

Моноцит – зрелая клетка моноцитарного ряда, округлой формы, диаметром 12-20 мкм. Ядерно-цитоплазматическое соотношение 1:1. Ядро моноцита имеет неправильную форму (бобовидную, лопатную, дольчатую, палочковидную), неровный, фестончатый контур и рыхлую, в виде крупнопетлистых нитей структуру хроматина. Оксихроматин, присутствующий в структуре ядра, делает ядро моноцита более светлым по сравнению с ядрами нейтрофилов и лимфоцитов. Цитоплазма моноцита голубовато-серая, дымчатая, непрозрачная, может содержать мелкую азурофильную зернистость, которая

более четко видна при использовании красителя-фиксатора по Май-Грюнвальду.

Дифференцировка моноцитов из монобласта в костном мозге занимает 5-10 дней, после чего они, не образуя костномозгового резервного пула, поступают в кровоток, где распределяются в виде двух пулов – пристеночного и циркулирующего. Соотношение этих пулов составляет 2,5-3,5:1 соответственно. Моноциты циркулируют в периферическом русле от 36 до 104 часов, затем покидают сосудистое русло, вне которого происходит их окончательная специализация, они образуют субпопуляцию дифференцированных органо- и тканеспецифических макрофагов. Миграция моноцитов через сосудистую стенку обусловлена наличием на моноцитах и эндотелиальных клетках специализированных адгезивных молекул, благодаря которым моноциты прилипают к активированным эндотелиоцитам и выходят в ткани. Этот процесс является обычной стадией жизненного цикла моноцитов. Тканевый пул мононуклеарных фагоцитов в 25 раз больше количества моноцитов в крови. Наибольшее количество макрофагов содержится в печени – клетки Купфера (56%), легких (15%), селезенке (15%), перитонеальной полости (8%), несколько меньше макрофагов содержится в центральной нервной системе (клетки микроглии и астроциты), костной ткани (остеокласты) и других тканях. Продолжительность жизни тканевых макрофагов исчисляется от нескольких часов до нескольких месяцев, лет. Тканевые макрофаги при необходимости способны делиться, в результате чего образуются такие формы макрофагов, как эпителиоидные клетки, многоядерные клетки инородных тел. Кроме того, макрофаги способны возвращаться в периферическую кровь в виде своеобразных моноцитоидных клеток – гистиоцитов. Единичные гистиоциты в норме могут встречаться в мазке крови здоровых людей. В большом количестве гистиоциты появляются при септических состояниях, тяжелых интоксикациях.

Макрофаги – функционально разнородная популяция клеток СМФ, что объясняет их морфологическое разнообразие. Под влиянием микроокружения и специализации функций макрофаги органов и тканей приобретают выраженные морфологические и

функциональные особенности, благодаря которым выделяют два основных класса клеток:

- антигенперерабатывающие (профессиональные фагоциты);
- антигенпредставляющие (дендритные клетки, участвующие в реализации иммунного ответа - иммунные аксессоры).

Антигенперерабатывающие или резидентные макрофаги имеют неправильную форму, диаметр клеток колеблется от 15 до 80 мкм. Ядерно-цитоплазматическое соотношение смещено в пользу цитоплазмы. Ядро имеет округлую или овальную форму, сетчатую структуру хроматина. Цитоплазма макрофага обильная, светло-серого цвета, без четких контуров, содержит разнообразные включения, гранулы различного цвета и размеров, вакуоли, разрушенные клетки, ядра клеток. Такое разнообразие включений обусловлено функциональной активностью макрофагов и в первую очередь способностью к фагоцитозу. Макрофаги, имеющие пенистую цитоплазму, фагировавшие липиды называются липофагами, фагировавшие гемоглобин – пигментофаги, фагировавшие другие клетки, например, эритроциты – эритрофаги (явление гемофагоцитоза). Эти клетки, обладая различными морфологическими характеристиками и функциональными особенностями, имеют ряд общих свойств, подтверждающих их моноцитарное происхождение – они содержат большое количество лизоцима (мурамидазы), неспецифическую альфа-нафтил-эстеразу, кислую фосфатазу, и имеют сходные иммунофенотипические признаки (CD11; CD14, HLA-DR I и II классов). Основной функцией резидентных макрофагов является фагоцитоз микроорганизмов, фрагментов клеток, циркулирующих иммунных комплексов и других частиц. Кроме того, они осуществляют пиноцитоз – поглощение растворимого антигена. Киллинг и переваривание фагированных объектов происходит при участии протеолитических ферментов, в первую очередь лизоцима. В процессе фагоцитоза наблюдается повышенное потребление кислорода и продукция микробицидных кислородных радикалов, перекиси водорода, обладающих цитотоксическим и бактерицидным свойствами, которые, однако, уступают таковым у нейтрофилов – за счет отсутствия у макрофагов миелопероксидазы, бактерицидных белков, вырабатывающих гипохлорит - анионы. Это создает для

ряда микроорганизмов возможность ускользнуть от микробицидного действия макрофагов и длительно персистировать в клетках, что способствует формированию хронического течения воспаления, фиброплазии и формированию очагов ГЗТ, в том числе – гранулем продуктивного воспаления.

К антигенпредставляющим (антигенпрезентирующим) макрофагам в настоящее время относят в основном дендритные клетки. Иммунные акцессоры включают эпидермоциты или клетки Лангерганса, интердигитальные и интерстициальные дендритные клетки. Клетки Лангерганса располагаются в эпидермисе, имеют диаметр 14-20 мкм, широкую светлую цитоплазму, округлое или бобовидное ядро, экспрессируют CD1a и S-100 протеин и содержат аденозинтрифосфатазу. В то же время клетки Лангерганса не экспрессируют характерный для моноцитов антиген CD14, имеют слабую фагоцитарную активность, не содержат лизоцим и не могут превращаться в макрофаги. Связываясь с антигеном, они поступают в региональные лимфатические узлы, где дифференцируются в интердигитальные дендритные клетки, способные представлять антиген Т-лимфоцитам.

Большинство дендритных клеток имеет звездчатую форму с множеством тонких отростков – дендритров. Звездчатая форма, подвижность позволяют дендритным клеткам задерживать и фиксировать антигены, а также взаимодействовать с Т-лимфоцитами. Дендритные клетки, кроме того, продуцируют ИЛ-12, ИЛ-8, МIP-альфа и бета. Антигенпредставляющие клетки и профессиональные фагоциты имеют сходные рецепторы на клеточной мембране, в том числе рецепторы для компонентов системы комплемента (C3; C4), Fc-фрагментов иммуноглобулинов, цитокинов, трансферрина, многих гормонов, а также антиген CD14, выявляемый на антигенперерабатывающих макрофагах, но отсутствующий на иммунных акцессорах.

Активаторами дендритных клеток являются антигены (микроорганизмы, липополисахариды микробов, продукты воспаления), ИЛ-1, GM-CSF, ФНО-альфа. Презентация антигенов включает несколько этапов: захват антигена дендритными клетками, ферментативную обработку антигена,

транспортировку пептидных фрагментов антигена – эпитопов в соединении с главным комплексом гистосовместимости I и II типов на поверхность дендритной клетки для распознавания Т-лимфоцитами. Активированные дендритными клетками Т-лимфоциты запускают иммунные реакции, стимулируя В-лимфоциты к продукции антител.

Интерстициальные дендритные клетки могут иметь как миелоидное, так и лимфоидное происхождение. Интерстициальные дендритные клетки миелоидного происхождения экспрессируют CD14, под влиянием ГМ – КСФ, М – КСФ могут превращаться в макрофаги, в отличие от клеток Лангерганса стимулируют непосредственно В-лимфоциты к продукции антител. Дендритные клетки лимфоидного происхождения морфологически сходны с плазматическими клетками, имеют низкую экспрессию миелоидных маркеров, положительный эффект на клеточный рост под влиянием ИЛ-3 и отсутствие эффекта при действии ГМ – КСФ. Кроме того, дендритные клетки лимфоидного происхождения могут принимать участие в процессах индукции иммунной толерантности – способны подавлять незрелые Т-лимфоциты тимуса и зрелые Т-лимфоциты лимфоузлов, действия которых направлено против собственных антигенов.

Таким образом, клетки системы мононуклеарных фагоцитов принимают участие в реализации неспецифической резистентности организма, обеспечивают инициацию специфического иммунного ответа организма на антиген.

Мононуклеарные фагоциты синтезируют и выделяют цитокины и другие биологически активные вещества, регулирующие пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность различных клеток, участвуют в репаративных процессах:

- провоспалительные цитокины (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, ИЛ-18, ФНО – альфа, интерферон-альфа, моноцитарный хемотаксический протеин, ингибирующий миграцию фактор);
- противовоспалительные цитокины (ИЛ-10, TGF- бета);
- протеазы;
- адгезивные молекулы;
- факторы ангиогенеза;

- факторы роста фибробластов и другие.

Клетки СМФ играют важную роль в регуляции гемопоэза, так как продуцируют как стимуляторы (ГМ – КСФ, М – КСФ, ИЛ-1), так ингибиторы (TGF –альфа, TNF –альфа) гемопоэза.

Мононуклеарные фагоциты участвуют в метаболизме металлов: железа, меди, цинка. Клетки СМФ поддерживают постоянный уровень железа в организме, обеспечивая регуляцию рециркуляции железа, катаболизм состарившихся эритроцитов, высвобождение железа из гемоглобина и формирование, и хранение основных фондов запасного железа в виде ферритина. Кроме того, макрофаги продуцируют железосвязывающие белки – трансферрин и ферритин. Помимо участия в метаболизме металлов, мононуклеарные фагоциты принимают участие в обмене белков, жиров и углеводов, участвуют в реакциях свертывания крови, так как продуцируют биологически активные вещества. Клетки макрофагальной системы обладают цитотоксической активностью против опухолевых, инфицированных и других измененных клеток.

В норме количество моноцитов при подсчете лейкоцитарной формулы составляет 3-11%, а в абсолютных цифрах - 0,09-0,6 x 10⁹/л. Увеличение количества моноцитов – моноцитоз.

Причины моноцитоза:

1. Инфекции и воспалительные процессы, вызванные возбудителями, фагоцитируемыми, в основном, макрофагами (туберкулез, бруцеллез, сифилис, сальмонеллез, листериоз, микозы, сап, протозойные инфекции -токсоплазмоз, амебиаз, лейшманиоз, септический эндокардит, обусловленный грамотрицательной микрофлорой и другие); вирусные инфекции, период выздоровления от острых инфекций.

2. Неинфекционные причины, например, неспецифический язвенный колит, аутоиммунный тиреоидит, иммунопатологический цирроз печени и другие иммунопатологические заболевания, протекающие с реакцией ГЗТ.

3. Неопластические заболевания (гемобластозы – острый мелобластный лейкоз, острый миеломонобластный лейкоз, острый монобластный лейкоз, хронический миелолейкоз, лимфогранулематоз; множественная миелома; лимфомы; злокачественные опухоли; рак легкого и другие.

4. Тяжелые отравления, состояние восстановления костного мозга после его подавления.

При тяжелом течении инфекций, воспалительных процессов, на фоне отравлений моноциты претерпевают морфологические изменения (появление вакуолизации цитоплазмы, токсогенной зернистости), а также в периферическом русле появляются промоноциты, гистиоциты.

Мегакариопоэз

Клеточные элементы мегакариоцитарного ростка дифференцируются и созревают в костном мозге из коммитированных клеток-предшественников мегакариоцитарно-эритроидных клеток-предшественников (MEP) и мегакариоцитарных колониеобразующих клеток (Meg-CFC). Основными стимуляторами мегакариопоэза являются: ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-11, фактор стволовых клеток, ГМ – КСФ, Г – КСФ, эритропоэтин, тромбопоэтин, ингибиторами - тромбоцитарный фактор 4, трансформирующий фактор роста бета-1, интерфероны - альфа и - гамма и другие. Регуляция мегакариопоэза осуществляется по принципу обратной связи: избыток тромбоцитов в крови тормозит тромбопоэз, тромбоцитопения стимулирует образование тромбоцитов. В костном мозге клеточные элементы мегакариоцитарного ростка претерпевают несколько морфологически дифференцируемых стадий. Среди них различают следующие стадии: мегакариобласта, промегакариоцита и мегакариоцита. Количество мегакариоцитов составляет 75-85% всей популяции клеток мегакариоцитарного ростка, на долю мегакариобластов приходится около 10%, промегакариоцитов – около 15%. Процесс дифференцировки и созревания мегакариобласта в мегакариоцит занимает 24 часа. Отличительной особенностью мегакариопоэза является способность мегакариоцитов к эндомитозу. В результате последовательного удвоения хромосомного набора - полиплоидизации (деление ядра без деления цитоплазмы и деления клетки) образуется клетка гигантских размеров. Количество эндомитозов может достигать от 3 до 6, что соответствует ploидности зрелого мегакариоцита

от 8 до 64 гаплоидных наборов хромосом (n). Время созревания мегакариоцита, т.е. время достижения максимальной ploидности ($128n$), составляет 54 часа, после чего эндомитоз прекращается и происходит апоптоз клетки.

Морфология клеток мегакариоцитарного ряда

Мегакариобласт – первая морфологически различимая клетка мегакариоцитопоэза, имеет округлую форму, 17-25 мкм в диаметре. Ядерно-цитоплазматическое соотношение смещено в пользу ядра. Ядро гиперхромное, темно-фиолетового цвета, имеет округлую форму, сетчатую структуру хроматина, несколько слабо различимых нуклеол, окруженных валиком уплотненного хроматина. Цитоплазма мегакариобласта узкая, базофильная, без включений, с перинуклеарной зоной просветления.

Промегакариоцит имеет 30-50 мкм в диаметре. Ядерно-цитоплазматическое соотношение смещено в пользу ядра. Ядро темно-фиолетового цвета, имеет тенденцию к полиморфизму: может быть бобовидным, сегментированным, с бухтообразными вдавлениями. Структура хроматина ядра грубоглыбчатая. Цитоплазма узкая, синяя, может иметь отростки, содержать азурофильную зернистость.

Мегакариоцит – полиплоидная клетка гигантских размеров, достигающая 60-120 мкм в диаметре. И ядро и цитоплазма больших размеров. Большой размер этих клеток обусловлен очень высоким содержанием в них ДНК. Среди мегакариоцитов различают более молодые базофильные и более зрелые гранулярные формы, среди которых выделяют полихроматофильные и оксифильные мегакариоциты. Базофильный мегакариоцит имеет нелобулярное ядро с плохо различимыми нуклеолами, узкую базофильную цитоплазму, не содержащую зернистость. В норме от цитоплазмы базофильных мегакариоцитов не отделяются тромбоциты. Ядро полихроматофильного мегакариоцита темно-фиолетового цвета, лопастное, с бухтообразными вдавлениями, имеет плотную, многодольчатую, грубопетлистую, с множеством вырезов и резких углублений структуру хроматина, не имеет нуклеол.

Цитоплазма может быть серого, светло-синего, голубого, сиренево-розового цвета, содержит обилие розовато-сиреневых гранул. Полихроматофильный мегакариоцит – главная клетка, отделяющая тромбоциты. Оксифильный мегакариоцит характеризуется слабой функциональной активностью. Это крупная клетка с грубым полиморфным ядром, с широкой розового цвета цитоплазмой, содержащей скудную зернистость, от которой, как правило, не отделяются пластины. Созревание мегакариоцитов сопровождается накоплением в цитоплазме гранул. Гранулы содержат большое количество белков: фактор Виллебранда, тромбоспондин, тромбоцитарный фактор 4, фибронектин, тромбоцитарный ростовой фактор, IV и V факторы свертывания крови и другие. Тромбоцитарная пероксидаза присутствует на всех стадиях созревания клеток мегакариоцитарного ряда, включая тромбоциты.

Основной функцией мегакариоцитов является репопуляция тромбоцитов, отшнуровка тромбоцитов от цитоплазмы и поддержание их количества в кровотоке на постоянном уровне. От одного мегакариоцита отшнуровывается до 5000 тромбоцитов, при этом происходит полное растрачивание цитоплазмы, остаются голые ядра мегакариоцитов. В дальнейшем происходит фрагментация ядер и их фагоцитоз макрофагами костного мозга. В норме функционально активными, т.е. отшнуровывающими тромбоциты, являются 60-70% мегакариоцитов. Ежедневно мегакариоцитарная линия производит до 10^{11} тромбоцитов. Тромбоциты не депонируются в костном мозге – около 80% из них циркулируют в крови, а около 20% – находятся в красной пульпе селезенки. В кровеносном русле тромбоциты распределяются в виде двух пулов – пристеночного и циркулирующего. Продолжительность их жизни в сосудистом русле составляет 7-11 суток.

Тромбоциты – кровяные пластины, имеющие округлую, овальную форму. В тромбоцитах различают периферическую бесструктурную, окрашенную в сиреневый цвет часть – гиаломер и центральную часть – грануломер, которая представлена обилием гранул розово-фиолетового цвета. Популяция тромбоцитов неоднородна, в ней различают:

- зрелые тромбоциты, имеющие диаметр 2-4 мкм, четкий грануломер и сиреневого цвета гиаломер;

- юные тромбоциты с нечеткими контурами, нежно-розовым скудным грануломером и голубоватым гиаломером; диаметр юных тромбоцитов составляет 3-5 мкм;

- старые тромбоциты, имеющие диаметр 0,5-2 мкм, содержат плотный насыщенного фиолетового цвета грануломер и узкий розового цвета гиаломер;

- формы раздражения – микроформы или гигантских размеров пластины, могут быть веретенообразной формы, в виде цепочек;

- дегенеративные формы тромбоцитов могут иметь вакуолизированный гиаломер, не содержать грануломер, либо он комковатый, плотный, либо пылевидный.

Количество различных форм тромбоцитов отражено в формуле, согласно которой в норме зрелых тромбоцитов содержится 90-95%, юных – 0-0,8%, старых – 2,2-5,6%, форм раздражения – 0,8-2,3%, дегенеративных форм – 0-0,2%.

В тромбоцитах выделяют несколько функциональных зон:

- Периферическая зона, которая играет важную роль в адгезии и агрегации тромбоцитов.

- Зона золя-геля, которая представляет собой матрикс цитоплазмы, область локализации цитоскелета с расположенными в ней микротрубочками, микрофиламентами и другими структурами, обеспечивающими образование псевдоподий, внутреннюю контракцию и секрецию. Эта зона играет важную роль в формировании контактов между активированными тромбоцитами.

- Зона органелл, которая состоит из беспорядочно расположенных митохондрий, пероксисом и гранул хранения – альфа-гранул, дельта-гранул (плотные тельца) и гамма-гранул (лизосомы). Альфа-гранулы хранят белки, большинство из которых синтезированы еще на стадии мегакариоцита: фактор Виллебранда, тромбоспондин, тромбоцитарный фактор 4, фибронектин, тромбоцитарный ростовой фактор (PDGF), IV и V факторы свертывания крови, альфа₂-антиплазмин, альфа-1 антитрипсин, протеин-S, лейкоцитарный хемотаксический фактор и другие. Белки альфа-гранул принимают участие во

многих физиологических и патологических процессах: вызывают митогенный, хемотаксический и иммунный эффекты, принимают участие в адгезии и агрегации тромбоцитов, в плазменном гемостазе, оказывают вазоактивное действие.

Плотные тельца хранят адениловые нуклеотиды (АТФ, АДФ, АМФ, цАМФ, ГДФ), серотонин, адреналин, норадреналин, дофамин, гистамин, Ca^{++} и другие, которые вызывают сосудистые реакции и агрегацию тромбоцитов.

В лизосомах хранятся гидролитические ферменты – пероксидаза, глюкозидаза, бета-глицерофосфатаза, кислая фосфатаза, неспецифическая эстераза, секреция которых происходит при необратимой активации. Содержимое гранул может секретироваться как частично, что происходит при обратимой активации, так и полностью - при необратимой активации. После секреции гранулы тромбоцитов не восстанавливаются, в результате чего тромбоциты теряют свою физиологическую активность, подвергаются апоптозу и элиминируются макрофагальной системой;

- Зона системы мембран, которая представлена электроноплотными трубочками, которые содержат ферменты, необходимые для синтеза простагландинов.

Тромбоциты выполняют ряд важных функций:

1. Ангиотрофическая функция обуславливает нормальную проницаемость и резистентность сосудистой стенки. Тромбоциты посредством участия в реэндотелизации места повреждения, восстанавливают сосудистую стенку. Примерно 15% циркулирующих тромбоцитов израсходуется на выполнение ангиотрофической функции. Снижение количества тромбоцитов ведет к дистрофии эндотелия и, как следствие - к повышенной проницаемости сосудистой стенки для плазмы и эритроцитов, что сопровождается образованием мелких кровоизлияний (петехий). При выраженной тромбоцитопении развивается геморрагический синдром.

2. Адгезивно-агрегационная функция обусловлена способностью тромбоцитов прилипать к поврежденной стенке, активироваться с выбросом из гранул медиаторов и агрегировать. Адгезия опосредована двумя механизмами:

- Непосредственная адгезия тромбоцитов через рецепторы GP Ia и IIa GPVI к коллагену субэндотелия. Данный механизм неэффективен при высокой скорости кровотока (в артериях и артериолах).

- Опосредованная адгезия тромбоцитов через молекулы адгезии - фактор Виллебранда (плазменный и тромбоцитарный), фибронектин, витронектин, ламинин, тромбоспондин и другими, эффективно удерживает тромбоциты при высокой скорости кровотока. При отсутствии фактора Виллебранда развивается болезнь Виллебранда, при которой адгезированные тромбоциты не способны удерживаться на поврежденной поверхности сосудистой стенки, что проявляется спонтанными кровотечениями из слизистых оболочек, удлинением времени кровотечения из ран, меноррагиями, гематурией, послеродовыми кровотечениями.

В результате контакта рецепторов адгезии тромбоцитов с субстратом и выработки в месте повреждения сосуда тромбина начинается процесс активации тромбоцитов. Тромбоциты меняют форму, у них появляются псевдоподии, увеличивается площадь поверхности, изменяется соотношение различных фосфолипидов между внутренним и наружным листками клеточной мембраны. Это сопровождается появлением на наружной поверхности тромбоцитов фосфолипидов с прокоагулянтными свойствами – тромбоцитарный фактор 3, повышением экспрессии интегринов и секрецией содержимого гранул наружу. Активированные тромбоциты, находящиеся в токе крови прилипают к ранее фиксированным тромбоцитам в области повреждения, способствуя дальнейшей агрегации тромбоцитов. Адгезия тромбоцитов к месту повреждения сосуда, агрегация тромбоцитов стимулируются АДФ, которая в большом количестве содержится в тромбоцитах, эритроцитах, стенке сосудов, в тканях. Активаторами тромбоцитов, помимо АДФ, являются тромбин, тромбоксан А2, серотонин, адреналин и арахидоновая кислота.

Таким образом, тромбоциты обеспечивают тромбоцитарное звено гемостаза. Повреждение сосудистой стенки сопровождается спазмом сосуда и адгезией тромбоцитов к месту повреждения. Под влиянием многих факторов происходит

первичная или обратимая агрегация тромбоцитов с образованием тромбоцитарной пробки. Дальнейшая агрегация и уплотнение пробки сопровождается вторичной необратимой агрегацией - обеспечением первичного гемостаза. Основным рецептором агрегации является рецептор GP IIb- IIIa. Активации тромбоцитов повышает аффинность рецептора GP IIb- IIIa по отношению к фибрину. На основе первичного тромба происходит соединение тромбоцитов, опосредованное фибрином и фактором Виллебранда с образованием тромбоцитарно-фибриновой пробки, обеспечивающей окончательный или вторичный гемостаз.

3. Секретируя многие факторы (I, V, VIII), влияющие на плазменный гемостаз, тромбоциты принимают непосредственное участие в плазменно-коагуляционных механизмах. Кроме того, выделяя ряд биомодуляторов, тромбоциты влияют на ход воспаления и иммунопатологические процессы.

4. Сорбционно-транспортная функция тромбоцитов заключается в их способности адсорбировать на своей поверхности и транспортировать к месту кровотечения плазменные факторы свертывания, биологически активные вещества, антикоагулянты. Кроме того, тромбоциты способны переносить на своей мембране циркулирующие иммунные комплексы.

5. Ретракция сгустка – способность активированных тромбоцитов за счет актина и миозина «сжимать» цитоплазму, способность выделять тромбастенин и прилипать к нитям фибрина, которые в результате взаимодействия с тромбоцитами сокращаются, что приводит к уплотнению всего сгустка крови, выделению из него избытка сыворотки и образованию первичного тромба. Ретракция способствует улучшению механических характеристик сгустка и снижению активности фибринолиза внутри него, что обеспечивает надежный гемостаз. При врожденной недостаточности GP IIb- IIIa - тромбастенин Гланцмана нарушается агрегация тромбоцитов и как следствие нарушается ретракция сгустка крови, что приводит к качественному дефекту образовавшегося сгустка и грубому дефекту тромбоцитарного гемостаза.

6. Антигемостатическая функция связана с накоплением и высвобождением таких антикоагулянтов, как антитромбин III, протеин S, протеин C.

7. Запуск процессов репарации тканей и ангиогенеза посредством факторов роста для клеток сосудистой стенки и стромы органов. Процесс регенерации сосудов, организации тромбов осуществляется медиаторами пролиферативно-репарационных процессов – тромбоцитарными факторами роста для фибробластов, для гладкомышечных клеток и эндотелия.

Методы определения количества тромбоцитов в периферической крови

Различают прямые и непрямые методы определения количества тромбоцитов. Непрямой метод подсчета количества тромбоцитов проводится в окрашенных мазках крови. Прямые методы включают подсчет тромбоцитов в камере Горяева и с помощью автоматических гематологических анализаторов.

1. Подсчет количества тромбоцитов в окрашенном мазке периферической крови (по Фонию)

Реагенты:

Наиболее часто в клинико-диагностических лабораториях используют 6% раствор этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА).

Ход исследования:

Раствор ЭДТА (6%) смешивают с исследуемой кровью в соотношении 1:4. Из смеси крови и раствора ЭДТА готовят тонкие мазки, высушивают их и подписывают. Мазки фиксируют общепринятым способом и окрашивают по Романовскому-Гимзе в течение 30-40 минут. Окрашенные мазки просматривают с помощью микроскопа, используя иммерсионный объектив x 100, окуляр x 10. Тромбоциты окрашиваются в розовато-фиолетовый цвет.

Техника подсчета:

Для подсчета тромбоцитов используется специальный ограничитель поля зрения (по Фонию), имеющий форму круга. Диаметр круга должен совпадать с диаметром окуляра, так как ограничитель помещается под верхнюю линзу окуляра.

Ограничитель выполняется из материала черного цвета и имеет в центре ромбовидное отверстие. В ограниченном поле зрения должно быть видно примерно 50 эритроцитов. Подсчет ведут в тонких участках мазка, где клетки располагаются в один ряд. В каждом поле зрения подсчитывают число эритроцитов и тромбоцитов до тех пор, пока не будут сосчитаны 1000 эритроцитов.

Расчет количества тромбоцитов:

Умножив число встретившихся в мазке тромбоцитов на цифру эритроцитов в миллионах и на 10^9 /л, получают количество тромбоцитов в литре крови.

2. Подсчет количества тромбоцитов в камере Горяева:

Реагенты:

- 1% раствор оксалата аммония.

Ход исследования:

В 4 мл 1% раствора оксалата аммония вносят 0,02 мл исследуемой крови (разведение в 200 раз). Разведенную кровь перемешивают без вспенивания и оставляют на 30 минут для гемолиза эритроцитов. Перед исследованием кровь перемешивают, равномерно заполняют ею камеру Горяева, которую помещают во влажную камеру. Через 5 минут ведут подсчет тромбоцитов в 25 больших квадратах камеры с помощью микроскопа, используя объектив $\times 40$, окуляр $\times 10$.

Расчет количества тромбоцитов:

Количество тромбоцитов рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \times 200 \times 4000}{400} = A \times 2000,$$

где А – количество тромбоцитов сосчитанное в 25 больших квадратах (400 малых) камеры Горяева, 200 – разведение крови, 4000 – множитель (приведение результата к объему в 1 мкл, исходя из объема малого квадрата), 400 – число малых квадратов, X – количество тромбоцитов в 1 мкл крови. Для выражения количества тромбоцитов в 1 литре крови, формулу упрощают, полученный результат умножают на 2×10^9 /л.

3. Подсчет количества тромбоцитов (Pletelets, PL, PLT) с помощью автоматического счетчика:

В современных гематологических анализаторах тромбоциты распознаются по размерам в диапазоне от 2,0 до 30,0 фл. Выход количества тромбоцитов за референтные пределы отражается на бланке в виде флагирования. Следует помнить, что флагирование на бланке может наблюдаться не только при патологических процессах, сбоях в работе анализатора, но и быть результатом ложного завышения или занижения количества тромбоцитов, связанным с особенностями исследуемой крови (табл. 3).

Таблица 3. – Именения количества тромбоцитов

Причины ложного занижения числа тромбоцитов	Причины ложного завышения числа тромбоцитов
<ul style="list-style-type: none"> - агрегация тромбоцитов; - агглютинация тромбоцитов под действием антител, аутоантител; - адгезия тромбоцитов к лейкоцитам при высоком лейкоцитозе; - при повышении числа (более 15-35%) гигантских форм тромбоцитов, которые анализатор считает вместе с эритроцитами 	<ul style="list-style-type: none"> - при микроцитозе: - при фрагментации эритроцитов (наличии большого количества шизоцитов)

Число тромбоцитов в норме составляет $180-320 \times 10^9/\text{л}$ (допустимые референтные границы составляют $150-450 \times 10^9/\text{л}$). Такое количество тромбоцитов обеспечивает их полноценное и эффективное функционирование.

Истинное снижение количества тромбоцитов (тромбоцитопения) может быть обусловлено следующими причинами:

1. Снижение продукции тромбоцитов в результате наследственных и приобретенных заболеваний:

- генетические заболевания и синдромы (синдром Фанкони, циклическая амегакариоцитарная тромбоцитопения, синдром Вискотта - Олдрича и другие);

- гематологические заболевания - апластическая, мегалобластная анемия, лейкомиозис злокачественных новообразований;

- инфекционно-воспалительные заболевания (вирусные и бактериальные инфекции, сепсис, заболевания печени);

-экзогенные и эндогенные интоксикации (цитотоксическое действие химических веществ, лекарственных препаратов, включая химиотерапевтические средства, воздействие ионизирующего излучения, алкоголя).

2. Повышенная деструкция тромбоцитов в кровеносном русле и селезенке (посттрансфузионная тромбоцитопения, иммунные тромбоцитопении, тромбоцитопеническая пурпура, на фоне миелопролиферативных, лимфопролиферативных заболеваний, системная красная волчанка, портальная гипертензия, цирроз печени, эклампсия беременных, гемолитико-уремический синдром, синдром гиперспленизма, синдром Фелти, талассемия и других).

3. Повышенное потребление тромбоцитов (ДВС синдром, гигантская гематома, тромбозы).

Помимо истинного снижения количества тромбоцитов в периферическом русле может наблюдаться ложная тромбоцитопения, так называемая тромбоцитопения разведения (на фоне гипергидратации, возмещения кровопотери плазмой, эритроцитарной массой), перераспределительная тромбоцитопения, которая чаще всего наблюдается на фоне первичной спленомегалии.

Повышение количества тромбоцитов в периферической крови более $450 \times 10^9/\text{л}$ может быть реактивным и неопластическим. Различают тромбоцитоз и тромбоцитемию.

Тромбоцитоз – поликлональное неопухоловое увеличение количества тромбоцитов в результате активации мегакариоцитарного ростка кроветворения тромбопоэтином и другими цитокинами. Как правило, носит временный, преходящий характер. Тромбоцитоз может быть:

- реактивным острым, развивающимся после острой кровопотери, в послеродовом периоде, после спленэктомии, при стрессе, может быть лекарственным, инфекционным;

- реактивным хроническим, например, при коллагенозах, железодефицитных состояниях, инфаркте или атрофии селезенки, хронических воспалительных процессах, при новообразованиях.

Тромбоцитемия – стойкое моноклональное неопластическое увеличение количества тромбоцитов в периферическом русле, имеющее атономный характер. Наиболее часто тромбоцитемия наблюдается при хронических миелопролиферативных неоплазиях – истинной полицитемии, хроническом миелолейкозе, эссенциальной тромбоцитемии, первичном миелофиброзе.

Тромбоцитарные индексы.

1. Средний объем тромбоцитов (mean platelet volume, MPV) в норме составляет 6,0-12,0 фл. Показатель находится в обратной зависимости от количества тромбоцитов, увеличивается с возрастом, несколько выше у мужчин по сравнению с женщинами. На величину показателя влияет ЭДТА – в течение первого часа после взятия крови средний объем тромбоцитов увеличивается на 10-12%, затем показатель стабилизируется. Показатель чувствителен к изменениям температуры окружающей среды. Интерпретировать показатель необходимо вместе с коэффициентом вариации объема тромбоцитов (гистограммой). Увеличение среднего объема тромбоцитов и смещение гистограммы вправо, в сторону макроформ тромбоцитов, наблюдается при миелодисплазиях, мегалобластных анемиях, тромбоцитопатиях, идиопатической тромбоцитопенической пурпуре, талассемии, сахарном диабете, ХОБЛ, сепсисе, в предродовом периоде, на фоне табакокурения и других.

Снижение среднего объема тромбоцитов и смещение гистограммы влево, в сторону микроформ, наблюдается при апластических анемиях, циррозе печени, тромбоцитозах, на фоне цитостатической, лучевой терапии.

2. Дисперсия распределения тромбоцитов по объему (platelet distribution width, PDW) – мера анизозитоза (гетерогенности размеров) тромбоцитов. В норме величина PDW составляет 15-17%. Показатель находится в обратной зависимости от числа тромбоцитов и периода их жизни. Показатель необходимо интерпретировать в динамике и вместе с другими тромбоцитарными показателями. Увеличение PDW и одновременное снижение среднего объема тромбоцитов говорит о преобладании микроформ среди общей популяции тромбоцитов

(угнетение тромбоцитопоза). Сочетание повышения PDW с повышенным показателем среднего объема тромбоцитов, говорит о преобладании макроформ среди общей популяции тромбоцитов (усиление тромбоцитопоза). Увеличение PDW на фоне нормального показателя MPV наблюдается в случае присутствия в периферическом русле, как микро - так и макроформ тромбоцитов.

3. Тромбокрит (platelet crit, PCT) – показатель, отражающий процент тромбоцитарной массы в объеме крови. Определяется путем суммирования прямо измеренных объемов тромбоцитов или произведением среднего объема тромбоцитов на их количество.

$PCT = (MPV \times PLT) / 100$. В норме величина тромбокрита составляет 15-35%. У здорового человека этот показатель остается стабильным, за счет динамического равновесия. Так при уменьшении числа тромбоцитов, усиливается тромбоцитопоз и в периферическое русло выбрасывается большое количество макроформ (молодых форм) тромбоцитов. При тромбоцитозе продукция тромбоцитов в костном мозге снижается, что сопровождается снижением в периферическом русле макроформ и соответственно уменьшением MPV. При нарушении равновесия развивается патология первичного гемостаза: при уменьшении PCT возрастает риск возникновения кровотечений, при повышении – риск развития тромбозов.

Исследование функции тромбоцитов можно разделить на 6 основных групп: тесты адгезии, тесты агрегации, оценка содержимого гранул, оценка реакции высвобождения, исследование простогландинового пути и тесты коагуляционной активности тромбоцитов. В клинико-диагностических лабораториях общего профиля наиболее часто исследуют агрегацию тромбоцитов.

Агрегационную способность тромбоцитов можно оценивать методом проточной цитометрии, оптической, импедансной, люминесцентной и РОСТ (point-of-care testing) агрегатометрии. Метод проточной цитометрии используется редко, так как является трудоемким и требует применения дорогостоящей аппаратуры. Импедансная, люминесцентная, РОСТ

агрегатометрии позволяют исследовать агрегацию тромбоцитов в цельной крови, где процессы агрегации максимально приближены к физиологическим условиям *in vivo*, что обеспечивает высокую специфичность и достоверность результатов исследования. Недостатком этих методов является их дороговизна, поэтому в клиничко-диагностических лабораториях используются преимущественно оптический метод исследования агрегации.

Исследование индуцированной агрегации тромбоцитов фотометрическим методом по Born G. (1967 г.)

Условия проведения агрегации:

Пациенты, которым назначено исследование агрегации тромбоцитов, как минимум 10 дней не должны употреблять лекарственных препараты, напитки и пищевые продукты, влияющие на агрегацию (табл. 4).

Таблица 4. – Вещества, влияющие на агрегацию тромбоцитов

<p>1. Вещества, нарушающие синтез простагландинов:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ацетилсалициловая кислота - НПВС -глюкокортикоиды
<p>2. Вещества, связывающиеся с рецепторами на мембране тромбоцитов:</p> <ul style="list-style-type: none"> - альфа- и бета- адреноблокаторы - антигистаминные препараты - трициклические антидепрессанты - тиклопидин - клопидогрель - блокаторы П₂У₁
<p>3. Антибиотики:</p> <ul style="list-style-type: none"> - пенициллины - цефалоспорины
<p>4. Вещества, увеличивающие концентрацию цАМФ:</p> <ul style="list-style-type: none"> - дипиридамол - аминофиллин - простаноиды

5. Другие:

- гепарин
- декстран
- этанол
- клофибрат
- фенотиазин
- чеснок

Исследование необходимо проводить натощак, так как наличие хиломикроннов может нарушать характер агрегации. Для исследования агрегации венозную кровь берут в стандартные пробирки с антикоагулянтом (3,8% цитрат натрия) в соотношении кровь/антикоагулянт 9:1. Кровь нельзя охлаждать, так как это вызывает активацию тромбоцитов.

Подготовка пробы к исследованию:

Для получения плазмы, обогащенной тромбоцитами, кровь центрифугируют при комнатной температуре в течение 10 минут при 1000 об/мин. Плазму забирают, не допуская ее контаминации эритроцитами или лейкоконцентратом, хранят до исследования в пластиковых пробирках при комнатной температуре. Для получения плазмы бедной тромбоцитами, плазму богатую тромбоцитами центрифугируют 20 минут при 3800 об/мин. Полученная плазма стабильна в течение 3 часов при комнатной температуре.

Принцип метода:

С помощью фотооптического агрегометра регистрируют изменения светопропускания плазмы обогащенной тромбоцитами. Поглощение света плазмой, обогащенной тромбоцитами, уменьшается при формировании тромбоцитарных агрегатов. На графике регистрируется падение оптической плотности и увеличение светопропускания плазмы крови за счет потребления тромбоцитов в агрегатах под действием индуктора агрегации.

В качестве индуктора агрегации используют следующие вещества:

1. Аденозин-5 дисульфат (АДФ).
2. Коллаген.
3. Ристоцетина сульфат.
4. Адреналин (эпинефрин).

5. Арахидоновая кислота.

Для каждого исследуемого образца плазмы обогащенной тромбоцитами проводится калибровка: за 100% принимается светопропускание бедной тромбоцитами плазмы, за 0% – светопропускание плазмы, обогащенной тромбоцитами.

Показатели агрегатограммы:

1. Степень агрегации. Оценивают по максимальной амплитуде агрегатограммы, которая соответствует максимальному уровню светопропускания плазмы после внесения индуктора (единицей измерения является %).
2. Скорость агрегации. Оценивают по амплитуде агрегатограммы через 1 минуту после начала агрегации (единицей измерения является % светопропускания в минуту).
3. Время агрегации – время достижения максимальной агрегации (единицей измерения является минута).

Агрегация с АДФ проводится для исследования первой фазы – фазы обратимой агрегации и частичной секреции и второй фазы – фазы необратимой агрегации и полной дегрануляции. Характер агрегации тромбоцитов определяется дозой агониста. При использовании малых доз АДФ (0,5-1,0 мкмоль/л) возникает обратимая агрегация. При концентрации 1,5-2,0 мкмоль/л – двухфазная необратимая агрегация, при большей концентрации, от 2,5-5,0 до 10,0 мкмоль/л – необратимая однофазная агрегация (переход 1 волны во 2 неразличим). При использовании малых доз АДФ, первая волна на агрегатограмме отражает начальную агрегацию тромбоцитов, обусловленную введением агониста. АДФ связываясь с рецепторами на поверхности тромбоцитов, активирует их, что приводит к экспрессии на мембране тромбоцитов комплекса Пв/Ша и развитию первичной Ca^{2+} зависимой агрегации. Вторичная агрегация обусловлена внутриклеточной передачей сигнала через G-белки с повышением внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} и активацией простогландин-тромбоксановой системы. В результате чего происходит секреция из альфа-гранул бета-тромбомодулина, тромбоспондина, фибронектина и других активных компонентов. На агрегатограмме вторичная волна отражает реакцию высвобождения из тромбоцитов биологически

активных веществ. Отсутствие вторичной волны на агрегатограмме при использовании малых доз АДФ говорит об уменьшении в тромбоцитах гранул, содержащих БАВ (недостаточность пула накопления) или, о нарушении реакции высвобождения.

Использование аспирина в комплексной терапии ишемического инсульта ведет в 2-3 кратному снижению степени и скорости АДФ-агрегации, удлинению времени достижения максимальной агрегации. Кривые агрегатограммы характеризуются отсутствием вторичной волны агрегации, за счет блокирования аспирином тромбоксана A_2 .

При использовании в качестве индуктора агрегации раствор адреналина, ответ на индукцию напоминает реакцию на АДФ. Двухфазная агрегация выявляется в случае использования растворов адреналина в концентрации от 2 до 10 мкмоль/мл.

Агрегация тромбоцитов с использованием в качестве агониста агрегации ристоцетина сульфата возможна при нормальном количестве тромбоцитов и содержании фактора Виллебранда. В случае дефекта фактора Виллебранда, как это наблюдается при болезни Виллебранда, а также при синдроме Бернара-Сулье, агрегационная функция тромбоцитов снижена. Агрегатограмма нормализуется при болезни Виллебранда, если в исследуемую бедную тромбоцитами плазму внести донорскую плазму обогащенную тромбоцитами и не нормализуется при синдроме Бернара-Сулье.

Агрегация с коллагеном обусловлена высвобождением из тромбоцитов адениловых нуклеотидов и используется для оценки секреторной функции клеток. Коллагензависимая агрегатограмма одноволновая и имеет лаг-фазу, в ходе, которой происходит полимеризация коллагена.

В зависимости от вида нарушения агрегации на определенный индуктор можно дифференцировать различные типы тромбоцитопатий. В таблице ниже представлены примеры нарушения агрегационной функции тромбоцитов при наиболее частых формах врожденных и приобретенных тромбоцитопатий и тромбоцитопений (табл. 5).

Таблица 5. – Изменение агрегации тромбоцитов при некоторых заболеваниях

Заболевание	Агрегация тромбоцитов			
	АДФ		Коллаген	Адреналин
	1 волна	2 волна		
Тромбастения Гланцмана	снижение	снижение	снижение	снижение
Болезнь Виллебранда	Норма	Норма	Норма	Норма
Синдром Бернара-Сулье	Норма или снижение	Норма или снижение	Норма	Норма
Дефицит плотных гранул	Норма или снижение	Норма или снижение	Норма	Снижение
Дефицит плотных гранул (синдром серых тромбоцитов)	Норма или снижение	Норма или снижение	Норма или снижение	Норма
Смешанный дефицит альфа- и плотных гранул	Норма или снижение	Норма или снижение	Норма	Норма или снижение
Аутоиммунные тромбоцитопении	Норма или снижение	Норма или снижение	Норма или снижение	Норма или снижение

Результаты исследования агрегационной функции тромбоцитов сравнивают с референтными значениями. В каждой отдельно взятой лаборатории рекомендуется устанавливать собственные референтные границы показателей агрегации тромбоцитов применительно к используемому оборудованию и реагентам.

Лимфоцитопоз

Лимфоциты и миелоидные элементы имеют общую клетку-предшественника на уровне стволовой кроветворной клетки, затем они приобретают независимую линию дифференцировки. Начальные этапы дифференцировки проходят в костном мозге. Лимфоциты представлены тремя основными клеточными линиями – В-, Т-, НК-клетками с общей клеткой –

предшественником, коммитированной в направлении лимфопоэза. В костном мозге из общего числа кариоцитов на долю лимфоидных клеток приходится 10-15%. Из них около 60% составляют созревающие элементы лимфатического ряда, остальные – зрелые клетки, которые либо мигрировали в костный мозг из крови, либо готовые к эмиграции.

В костном мозге формируются ранние предшественники Т-лимфоцитов, которые затем мигрируют в тимус и далее заселяют периферические лимфоидные органы. Наиболее ранними маркерами Т-клеток являются CD7, CD10, позже появляются CD5, CD2 маркеры. Основным и наиболее специфичным маркером зрелых Т-лимфоцитов является CD3. Незрелые протимоциты экспрессируют CD45, но не имеют HLA- II, TdT(терминальная дезоксирибонуклеотидтрансфераза), CD3. В тимусе под влиянием микроокружения создаются необходимые условия для дальнейшей дифференцировки Т - клеточной популяции лимфоцитов. Незрелые тимоциты проходят определенные этапы дифференцировки, в ходе которых формируется Т - клеточный рецептор (TcR), служащий для распознавания антигена. В зависимости от варианта клеточного рецептора различают альфа-бета- Т-клетки и гамма-дельта –Т-клетки. Альфа-бета- Т- клеточная популяция лимфоцитов подразделяется на две субпопуляции. Клетки одной из них несут на своей поверхности CD4 и способствуют осуществлению иммунного ответа или индуцируют его. Эта субпопуляция получила название Т-хелперы. Среди Т-хелперов выделяют Т-хелперы первого и второго порядка (Th1, Th2), которые помогают развитию клеточного и гуморального иммунного ответа соответственно.

Клетки другой субпопуляции несут маркер CD8 и относятся к цитотоксическим Т-лимфоцитам, так как обладают цитотоксическими свойствами.

Гамма-дельта-Т-клеточная популяция может усиливать иммунный ответ, секретировав гамма-интерферон, фактор некроза опухолей (альфа-ФНО), хемокины, играет важную роль в противоопухолевом ответе, восстановлении эпителия и поддержании гомеостаза. Кроме того, эта популяция может быть вовлечена в развитие некоторых иммунопатологических

состояний (бронхиальная астма, сахарный диабет, болезнь Бехчета и другие).

Зрелые Т-клетки эмигрируют из тимуса в периферическое русло через кортикомедуллярные зоны и входят в состав единого пула рециркулирующих Т-лимфоцитов. Т-лимфоциты периферических лимфоидных органов эмигрируют в лимфу (из селезенки – с током крови). Т-лимфоциты проходят 2 фазы дифференцировки. Первая фаза дифференцировки не связана с действием антигена и завершается формированием в кровотоке популяции зрелых наивных Т-лимфоцитов. Каждый такой Т-лимфоцит может отвечать только на «свой» антиген. В результате активации антигеном наивные Т-лимфоциты дифференцируются в Т-лимфоциты памяти. Они имеют разную продолжительность жизни, период их обновления может составлять недели, месяцы, годы. Т-лимфоциты принимают участие в реализации клеточного иммунного ответа, который проявляется в 2 формах: в виде цитотоксического ответа (разрушение Т-хелперами клеток-мишеней) и в виде реакции гиперчувствительности замедленного типа (направленная Т-хелперами реакция макрофагов). Среди Т-хелперов различают популяцию Т-лимфоцитов CD4+, CD25+, фактор транскрипции FOXP3 +, так называемых Т-лимфоцитов супрессоров. Они регулируют Т - клеточный гомеостаз, препятствуют развитию аутоиммунных заболеваний, аллергии, реакции «трансплантат против хозяина», предотвращают гиперчувствительность. В то же время снижают противоопухолевый иммунитет и иммунитет к инфекциям.

Дифференцировка В-лимфоцитов происходит в костном мозге, в окружении клеток стромы, под действием молекул межклеточного матрикса, гуморальных факторов (гамма-интерферон, ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-7) до зрелых В-лимфоцитов экспрессирующих на поверхности специфические Ig D-, Ig M-рецепторы. Дифференцировка носит антигеннезависимый характер. В дальнейшем в процессе иммунного ответа на поверхности В-лимфоцитов последовательно появляются другие рецепторы. К моменту завершения формирования рецепторного комплекса В-лимфоциты приобретают способность взаимодействовать с антигенами. Общими маркерами В-лимфоцитов являются CD19, CD 20, CD 22. Зрелые В-лимфоциты

из костного мозга эмигрируют в периферическое русло, а также заносятся в лимфоидные органы, где выполняют свои функции, располагаясь в краевой зоне белой пульпы селезенки, в наружных слоях коры лимфатических узлов.

В-лимфоциты, встречаясь с антигенами, проходят этап антигензависимой дифференцировки. В отсутствие антигенной стимуляции продолжительность жизни В-лимфоцитов составляет несколько месяцев. Главным источником обновления популяции В-лимфоцитов является костный мозг.

Среди В-лимфоцитов выделяют три основные субпопуляции: CD5⁺ В-лимфоциты (В-1); CD5⁻ В-лимфоциты (В-2); В-клетки памяти.

Главной функцией В-лимфоцитов является реализация гуморального иммунного ответа, в основе которого лежит активация В-клеток и их дифференцировка в плазматические клетки, синтезирующие иммуноглобулины. Антитела опсонизируют клетки-мишени фагоцитов, естественных киллеров, активируют комплемент, связываясь со свободными антигенами, образуют комплексы и тем самым нейтрализуют их. В ходе иммунного ответа образуются В-клетки памяти, которые обеспечивают развитие вторичного иммунного ответа. Активность субпопуляция В-1 лимфоцитов ассоциирована с продукцией аутоантител и аутоиммунными процессами. В частности они играют важную роль при ревматоидном артрите, системной красной волчанке, тиреоидите Хашимото, инсулинзависимом сахарном диабете.

Т- и В-клетки памяти обеспечивают развитие вторичного иммунного ответа. Обладая большой продолжительностью жизни и способностью к рециркуляции, они обеспечивают длительное сохранение иммунитета к чужеродным агентам.

При отсутствии активирующих сигналов, при действии некоторых факторов, а также после выполнения своих функций все лимфоциты подвергаются апоптозу.

Среди клеток лимфатического ряда выделяют фракцию естественных или натуральных киллеров (НК-клетки). Естественные киллеры являются важными компонентами врожденной иммунной системы. Они обладают цитолитической активностью, вызывая контактный цитолиз клетки-мишени,

принимают участие в регуляции врожденного и адаптивного иммунных ответов с помощью секреции хемокинов и цитокинов. Выделяют несколько подтипов этих клеток: пре-НК-клетки, зрелые НК-клетки и активированные. НК-клетки, которые в периферическом русле составляют 5-20% от всех лимфоцитов. Зрелые циркулирующие НК-клетки имеют фенотип CD56+, CD16+, в отличие от Т-клеток не имеют рецептора CD3, в отличие от В-клеток – никогда не экспрессируют мембранные иммуноглобулины. Активированные НК-клетки имеют поверхностные активационные маркеры (CD25, CD18, CD29), антигены (HLA-DR, CD71, CD69). Среди популяции циркулирующих НК - клеток выделяют две основные субпопуляции:

1. Первая популяция НК-клеток экспрессирует CD16 и с низкой плотностью CD56. Эта популяция составляет 80-90% НК-клеток периферической крови, слабо секретирующих цитокины, но обладающих высокой цитолитической активностью.

2. Вторая популяция экспрессирует CD56 и с низкой плотностью CD16, она занимает 10-20% общего количества НК-клеток. Клетки этой популяции обладают высокой секреторной способностью и слабой цитолитической активностью.

Морфология клеток лимфатического ряда

Лимфобласт – самая молодая клетка лимфоидного ряда округлой формы, размерами 15-20 мкм в диаметре. Ядерно-цитоплазматическое соотношение в пользу ядра. Ядро имеет округлую форму, нежную равномерную мелкогранулярную структуру хроматина с 1-2 крупными нуклеолами. При окраске по методу Романовского-Гимзы ядро имеет краснофиолетовый цвет. Цитоплазма расположена узким ободком голубого цвета, без включений.

Пролимфоцит имеет округлую форму, диаметр 12-18 мкм. Ядро расположено центрально или слегка эксцентрично, имеет округлую, овальную или слегка бобовидную форму. Структура хроматина более грубая по сравнению с лимфобластом, равномерная, в которой только намечается лимфоидный рисунок. В ядре можно видеть угасающие нуклеолы. Цитоплазма

расположена узким ободком голубого цвета, иногда может содержать крупные азурофильные гранулы.

Лимфоцит имеет округлую форму, 7-15 мкм в диаметре, ядерно-цитоплазматическое соотношение в пользу ядра. У ядра округлая или слегка бобовидная форма, компактная грубоглыбчатая структура хроматина. При использовании обычных методов окраски в ядре не выявляются нуклеолы. Цитоплазма чаще узкая, с различной степенью базофилии, у большинства клеток лимфоидного ряда не содержит зернистости. У части лимфоцитов в цитоплазме содержится крупная азурофильная зернистость, такие клетки называются большими гранулярными лимфоцитами. В норме их количество может составлять $0,2-0,4 \times 10^9/\text{л}$ от общего количества лимфоцитов периферического русла. Морфология лимфоцитов может меняться в зависимости от функционального состояния, поэтому популяция лимфоцитов в периферическом русле морфологически неоднородна. Например, под действием антигена или иного стимула лимфоциты, трансформируясь в делящиеся бластные клетки, могут давать клоны новых лимфоидных клеток, появляться в периферическом русле на разных стадиях стимуляции. К активированным лимфоцитам относятся так называемые широкоцитоплазменные лимфоциты, которые могут встречаться в норме в небольшом количестве. При раздражении иммунной системы количество широкоцитоплазменных лимфоцитов в периферическом русле возрастает и в этом случае возникает необходимость указывать на их присутствие.

В-лимфоциты после стимуляции антигеном превращаются в плазматические клетки, которые проходят последовательно стадии: *плазмобласта, проплазмоцита и плазмоцита*.

Плазмобласт – клетка округлой формы, размерами 16-20 мкм в диаметре. Ядерно-цитоплазматическое соотношение смещено в пользу ядра. Ядро имеет округлую форму, равномерную, нежную структуру хроматина, нуклеолы. Цитоплазма темно-голубая, может быть слегка вакуолизированной.

Проплазмоцит – клетка округлой формы, диаметром 16-18 мкм с эксцентрично расположенным ядром. Ядерно-цитоплазматическое соотношение умеренное. Структура

хроматина в ядре грубее, чем у бласта, но выглядит еще нежной и равномерной, могут быть видны нуклеолы или их остатки. Цитоплазма проплазмоцита более широкая, чем у бласта темно-голубая с фиалковым оттенком, вакуолизированная, пеннистая.

Плазмоцит – зрелая плазматическая клетка, которая может быть разнообразной по величине и по форме. Ядерно-цитоплазматическое соотношение смещено в пользу цитоплазмы. Ядро компактное, имеет округлую или овальную форму, может быть с колесовидным рисунком хроматина. Цитоплазма широкая, темно-голубого или синего цвета с фиалковым оттенком, вакуолизированная, пеннистая. Края цитоплазмы могут быть неровными, фестончатыми, с фрагментацией в виде «пламени свечи».

В норме при подсчете лейкоцитарной формулы количество лимфоцитов составляет 18-37% или в абсолютных числах – $1,2-3,0 \times 10^9/\text{л}$, а плазмоцитов – до 5%.

Увеличение количества лимфоцитов в периферическом русле более 40% или в абсолютных цифрах более $5,0 \times 10^9/\text{л}$ называется лимфоцитозом. К основным причинам лимфоцитоза относятся:

1. Физиологический лимфоцитоз – с 4-5 дня после рождения лимфоциты в крови начинают относительно преобладать над гранулоцитами – так называемый «первый перекрест». Физиологический лимфоцитоз сохраняется до 4-5 лет, когда наблюдается выравнивание относительного количества лимфоцитов и нейтрофилов – «второй перекрест». Физиологический относительный лимфоцитоз может сохраняться до 8 лет и затягиваться при наличии гипотрофии, дефицита железа, рахита. Максимальное количество лимфоцитов, как правило, в норме не должно превышать $9,0 \times 10^9/\text{л}$ у детей дошкольного возраста и $7,2 \times 10^9/\text{л}$ – у детей школьного возраста.

2. Патологический поликлональный лимфоцитоз (лейкемоидные реакции лимфоидного типа), который является иммунным ответом на инфекционные и неинфекционные антигены и суперантигены, поликлональные иммуностимуляторы.

Поликлональный лимфоцитоз наблюдается при:

- вирусных инфекциях (инфекционный мононуклеоз, корь, краснуха, цитомегаловирусная инфекция и другие);
- бактериальных инфекциях (листериоз, коклюш, туберкулез, лептоспироз, туляремия, бруцеллез и другие);
- паразитозах (токсоплазмоз);
- инфекциях, вызываемых внутриклеточными паразитами (риккетсиоз, хламидиоз, микоплазмоз и другие);
- протозоозах (лейшманиоз, трипаносомоз и другие);
- микозах (гистоплазмоз, бластомикоз, кокцидиоз, криптококкоз и другие);
- асептических иммунопатологических процессах (болезнь Аддисона, системная красная волчанка, изоиммунный резус-конфликт и другие).

Наиболее ярким представителем лейкомоидных реакций лимфоидного типа является инфекционный мононуклеоз – острое вирусное заболевание, вызываемое герпес-вирусами. Вирус Эпштейна-Барра обладает тропизмом к В-лимфоцитам, на поверхности которых имеются ВЭБ-рецепторы (CD 21). Вирус встраивается в геном лимфоидной клетки и стимулирует ее к бластотрансформации. Усиленное деление клеток в лимфоидных тканях приводит к их гиперплазии и появлению в периферическом русле лимфоидных клеток с атипичной морфологией – атипичных мононуклеаров. Инфекционным мононуклеозом чаще болеют дети и молодые люди (от 5 до 25 лет), чаще в весеннее время. Источником инфекции являются больные и вирусоносители. Путь передачи – контактный, воздушно-капельный. Инкубационный период составляет от 7 до 35 дней. Клинически заболевание проявляется лихорадкой, на фоне которой отмечается назофарингит без экссудативных проявлений, ангина (от катаральной до некротической), увеличение лимфатических узлов (на задней поверхности шеи, по заднему краю грудино-ключично-сосцевидной мышцы) размерами от 1.5 до 5 см., увеличение селезенки, печени. При исследовании периферической крови отмечается лейкоцитоз, может быть умеренный моноцитоз, лимфоцитоз, среди лимфоцитов от 10 до 70% - атипичные мононуклеары. Для атипичных мононуклеаров характерен полиморфизм размеров, формы ядра, структуры хроматина, цвета цитоплазмы.

Морфологически атипичные мононуклеары – это клетки неправильной формы, ядро может быть округлое, бобовидное, в виде разнообразных геометрических фигур, со сглаженной структурой хроматина, без нуклеол. Цитоплазма атипичных мононуклеаров широкая, неравномерно окрашенная (базофильная кайма по периферии), может быть плазмотизированная.

3. Патологический лимфоцитоз моноклонального характера, являющийся результатом неопластических изменений со стороны лимфоидных клеток (острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфолейкоз, лимфомы, миеломная болезнь).

Снижение количества лимфоцитов в периферическом русле менее $1,2 \times 10^9/\text{л}$ называется лимфоцитопенией, которая может быть обусловлена нарушением образования лимфоцитов, ускорением их гибели, нарушением миграции, а также в результате сочетания этих причин.

К причинам снижения или ограничения образования лимфоцитов относятся:

- дефицит белка в висцеральном пуле (квашиоркор);
- костномозговая недостаточность;
- применение иммунодепрессантов;
- наследственные врожденные иммунодефициты;
- лимфома Ходжкина.

Ускоренная гибель лимфоцитов наблюдается при действии лимфотропных вирусов (коровой вирус, полиомиелитный, вирус иммунодефицита человека), лекарственных препаратов, антилимфоцитарных аутоантител.

При стрессе, гиперкортицизме наблюдается миграция лимфоцитов в ткани, а при длительном стрессе и высоких дозах глюкокортикоидов – усиление апоптоза лимфоидных клеток.

ЧАСТНАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ГЕМАТОЛОГИЯ

Гемобластозы

Гемобластозы – опухолевые заболевания, исходными клетками которых являются стволовые или подобные им клетки - предшественники. Патологическим субстратом таких опухолей являются малигнизированные клетки крови.

В зависимости от первичной локализации гемобластозы бывают:

1) локальные или солидные опухоли – лимфомы, лимфосаркомы, при которых может не наблюдаться поражения костного мозга, в периферической крови отсутствуют опухолевые клетки (Лимфома Ходжкина, неходжкинские лимфомы);

2) лейкозы – опухоли с первоначальной локализацией в костном мозге, с последующей диссеминацией опухолевых клеток во все органы и ткани и появлением их в периферической крови.

В зависимости от способности опухолевых клеток к дифференцировке, созреванию различают острые и хронические лейкозы. В зависимости от морфологии лейкозных клеток - лейкозы миелогенного и лимфогенного происхождения.

Опухоли из В-лимфоцитов, секретирующие моноклональные иммуноглобулины (парапротеины), объединены под общим названием парапротеинемические гемобластозы.

Классификация основных групп гемобластозов (ВОЗ, 2008 г.)

1. Острые миелобластные лейкозы.
2. Острые лейкозы неопределенной линии.
3. Миелодиспластические синдромы.
4. Хронические миелопролиферативные неоплазии.
5. МДС/миелопролиферативные неоплазии.
6. Миелоидные опухоли, ассоциированные с эозинофилией и поломками PDGFRA, PDGFRB, PGFR1.
7. Опухоли из предшественников Т- и В- лимфоцитов.

8. Опухоли из зрелых Т-, В- и НК- клеток.
9. Лимфома Ходжкина.
10. Лимфопролиферативные заболевания, ассоциированные с иммунодефицитом.
11. Неоплазии из гистиоцитов и дендритных клеток.

Этиология, патогенез

Этиология гемобластозов до конца не установлена. В настоящее время рассматриваются несколько этиологических факторов:

1. Генетическая предрасположенность, хромосомная нестабильность. Вероятность возникновения гемобластоза у ближайших родственников выше, чем у других представителей популяции. Установлено, что ряд врожденных заболеваний (болезнь Дауна, врожденный агранулоцитоз, синдром Вискотта-Олдрича и некоторые другие) и заболеваний с врожденной нестабильностью хромосомного аппарата (анемия Фанкони, синдром Блума), сопровождаются высоким риском развития острых лейкозов.

2. Вирусы. Предполагается возможность участия в лейкозогенезе, онкогенезе РНК- и ДНК-вирусов. В настоящее время доказана прямая зависимость между персистенцией вируса HTLV-1 (human T-leukemia virus-1) и развитием Т-клеточного лейкоза или лимфомы у взрослого населения Японии и Карибского бассейна. Из ДНК-вирусов - вирус Эпштейна-Барра участвует в онкогенезе лимфомы Беркитта, В-клеточного острого лимфолейкоза и В-клеточных лимфом, ассоциированных с приобретенным иммунодефицитом.

3. Ионизирующее излучение. Риск развития гемобластозов возрастает с увеличением дозы облучения. В настоящее время установлено, что высокодозная лучевая терапия у онкологических больных в 5-10 % случаев вызывает вторичные опухолевые процессы, в том числе и гемобластозы.

4. Химиотерапия. Сильным мутагенным эффектом обладают следующие лекарственные препараты, используемые в программах лечения: хлорбутин, мустарген, прокарбазин, циклофосфан, ломустин, тенипозид, этопозид. Частота развития

лейкозов через 2-10 лет после достижения ремиссии достигает 3-15% у взрослого населения.

5. Курение. Существует дозозависимая связь между курением и развитием острого миелоидного лейкоза у пожилых пациентов.

6. Химические вещества, например, бензол, летучие органические растворители при длительном воздействии обладают лейкозогенным эффектом. Одной из причин возникновения гемобластозов может быть употребление недостаточно очищенной воды. К числу опасных для здоровья веществ, попадающих в питьевую воду, относятся ароматические амины, пестициды, соли цинка, гидразин и его производные, обладающие канцерогенным эффектом. Кроме того, потенциальные мутагены встречаются и в пище, особенно копченой.

7. Приобретенные заболевания, такие как апластическая анемия, сидеробластная анемия и другие, могут являться основой для развития гемобластозов. Увеличение частоты встречаемости вторичного ОНЛЛ наблюдается у лиц, получавших алкилирующие соединения по поводу рака легкого, опухолей яичника и молочной железы, лимфогранулематоза и ряда других заболеваний опухолевой природы. Увеличение встречаемости ОНЛЛ наблюдается также в группе неонкологических пациентов с нефритом, ревматоидным артритом, псориазом, системной склеродермией, системной красной волчанкой и гранулематозом Вегенера, которым алкилирующие соединения назначались наряду с другими препаратами.

8. Иммунодефицитные состояния.

В организме в течение жизни происходит большое количество мутаций, которые устраняются клеточными репаративными механизмами и, если наблюдается их дефицит или несостоятельность, то это приводит к клонированию мутировавших клеток.

Каждая клетка в организме человека содержит протоонкогены, контролируемые генами-супрессорами. Под действием неблагоприятных факторов и механизмов активации (мутации в первичной структуре протоонкогена, амплификации протоонкогена, перестройки ДНК клетки, затрагивающая

структуру протоонкогена), нарушаются функции протоонкогенов на различных уровнях передачи сигнала:

- межклеточного взаимодействия;
- взаимодействия клеточных рецепторов с сигнальными молекулами (лигандами);
- передачи сигнала от клеточных рецепторов к эффекторным ферментным системам и циклинам клетки;
- регуляции транскрипции;
- регуляции клеточного цикла и супрессии опухолевого роста;
- регуляции апоптоза (программированной смерти клеток).

Выделяют два основных механизма нарушения функции протоонкогенов в опухолевых клетках:

1. Генетические перестройки, сопровождающиеся структурными изменениями протоонкогена с формированием химерных генов, т.е. качественные изменения белков, приобретающих онкогенную активность.

2. Генетические перестройки, сопровождающиеся переносом протоонкогена в область генов иммуноглобулина или В-клеточных рецепторов и генов рецепторов Т-лимфоцитов с количественными изменениями в экспрессии протоонкогенов.

В результате генетических перестроек наблюдается угнетение функций генов (в том числе гена-супрессора) и нарушение синтеза белков, регулирующих деятельность клетки (ответ на внешние сигналы, пролиферацию и клеточный цикл). Это приводит к тому, что протоонкоген превращается в онкоген. Онкоген синтезирует онкобелки, под действием которых клетка начинает интенсивно делиться, образуя клон мутировавших клеток. В опухолевой клетке повышена активность теломеразы, в нормальной клетке ее активность минимальная. Теломеры обеспечивают целостность хромосом. В процессе жизни, с каждым делением происходит укорочение теломеров и соответственно затухание процессов деления. Отсутствие теломеров приводит к прекращению удвоения хромосом и деления клеток. Если теломераза активизируется, то клетка бесконечно долго делится, утрачивает способность к апоптозу. Клетки опухолевого клона отличаются повышенной способностью к делению, нарушением дифференцировки,

сниженной способностью к апоптозу, нестабильностью генетического аппарата (возникновение повторных мутаций). Высокая мутабельность внутри клона встречается при всех лейкозах. С этим связана опухолевая прогрессия и озлокачествление лейкозов – внутри клона возникают новые хромосомные поломки, мутации и образуются дополнительные клоны – субклоны, как правило, более агрессивные.

Различают 2 стадии течения лейкозов:

1 стадия – моноклоновая с относительно доброкачественным течением;

2 стадия – поликлоновая с неуправляемым делением клеток, образованием более агрессивных субклонов.

Для опухолевой прогрессии характерно:

- 1) изменение морфологических и цитохимических признаков клеток;
- 2) угнетение нормальных ростков кроветворения;
- 3) развитие лейкозной гиперплазии и метаплазии других органов и тканей (диссеминация опухолевых клеток по всему организму);
- 4) резистентность к цитостатическим препаратам (новый клон вытесняет предыдущий клон и, поэтому нечувствителен к применяемым ранее цитостатикам).
- 5) нарушение процессов апоптоза.

Методы диагностики гемобластозов

Наименование исследований	Методы
Морфологические	<ol style="list-style-type: none"> 1. Цитологическое исследование мазков крови и костного мозга. 2. Миелограмма. 3. Гистологическое исследование костного мозга. 4. Трансмиссионная электронная микроскопия
Цитохимические	<ol style="list-style-type: none"> 1. Световая микроскопия. 2. Ультраструктурная цитохимия
Культуральные	<ol style="list-style-type: none"> 1. Культивирование гемопоэтических клеток. 2. Клонирование гемопоэтических клеток
Иммунологические (анализ клеточных маркеров)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Проточная цитометрия. 2. Флюоресцентная микроскопия. 3. Иммуноцитохимия. 4. Иммуногистохимия

Цитогенетические	1. Дифференциальная окраска хромосом с последующей световой микроскопией
Молекулярно-биологические	1. ДНК-гибридизация (по Southern blotting, FISH). 2. ПЦР. 3. Секвенирование
Исследование апоптоза	1. Определение экспрессии Fas- антигена. 2. Определение экспрессии гена bcl-2. 3. Определение фрагментации ДНК в гистологических срезах. 4. Определение деградации ДНК с помощью гель – электрофореза. 5. Определение изменений в цитоплазме, морфологии ядра
Дополнительные	1. Биохимический анализ крови. 2. Электрофорез белков мочи и сыворотки крови. 3. Анализ СМЖ
Инструментальные	1. Рентгенологические. 2. Ультразвуковые. 3. МРТ. 4. КТ

Лабораторная диагностика острых лейкозов

Острые лейкозы – гетерогенная группа опухолей системы крови клоновой природы с исходной клеткой на уровне гемопоэтической стволовой клетки или близкой к ней клетки - предшественника, коммитированной в каком-либо направлении. Для клеток острого лейкоза характерно:

- повышенная пролиферация;
- нарушение апоптоза;
- нарушение дифференцировки с сохранением частичной извращенной дифференцировки до бластных клеток.

Морфологическим субстратом опухоли являются бластные клетки. Клетки лейкозного клона по морфологии существенно не отличаются от типичных бластных клеток, но у значительной части наблюдается атипия и полиморфизм:

- разные размеры и форма клеток, ядер;
- цитоплазма разного цвета;

– наличие гранул, зернистости в цитоплазме.

Опухолевые клетки сохраняют иммунофенотип исходной клетки, т.е. несут на себе маркеры дифференцировки исходной мутировавшей клетки.

Эпидемиология

В структуре злокачественных опухолей острые лейкозы составляют около 2-3%. Заболеваемость острыми лейкозами в среднем составляет 3-5 случаев на 100 000 населения в год. Среднее соотношение миелоидных и лимфоидных острых лейкозов составляет 6:1. Среди взрослого населения чаще болеют мужчины старше 40 лет (медиана заболеваемости приходится на 60 лет). В 80% случаев – это острые миелоидные лейкозы. У детей в 90% случаев наблюдаются острые лимфобластные лейкозы (медиана заболеваемости приходится на 10 лет). Чаще болеют мальчики и молодые мужчины.

Классификация

В соответствии с современной схемой кроветворения острые лейкозы подразделяются на две большие группы:

- 1) острые нелимфобластные лейкозы (ОНЛЛ);
- 2) острые лимфобластные лейкозы (ОЛЛ).
- 3) смешанноклеточные лейкемии.

Последняя группа в свою очередь включает:

- острые лимфоидные лейкозы с миелоидными маркерами;
- острые нелимфобластные лейкозы с лимфоидными маркерами;
- бифенотипические лейкемии.

Представление об остром лейкозе как об опухолевом процессе формировалось более 100 лет. Впервые понятие лейкемии было введено в 1856 году Р.Вирховым для обозначения заболевания сопровождающегося гепатоспленомегалией и изменением картины периферической крови. В 1889 г. был введен термин «острая лейкемия», который предложил В. Эбштейн. После описания морфологии миелобласта в 1900 г. началась тщательная морфологическая детализация различных форм острых лейкозов, которая продолжалась семь десятилетий.

В 1976 г. группа гематологов Франции, Америки и Великобритании предложила классификацию острых лейкозов (FAB-классификация), основанную на морфологических и цитохимических характеристиках клеток периферической крови и костного мозга (табл. 7).

Таблица 7. – Морфологическая (FAB) классификация ОНЛЛ

Вариант ОНЛЛ	Морфологические критерии (по данным миелограммы)	Цитохимические характеристики	
		Миело-пероксидаза (МПО), липиды (ЛП)	Неспецифические эстеразы (НЭ)
М0 острый миелобластный лейкоз с минимальной дифференцировкой	30 и более % миелобластов без гранул, палочки Ауэра (-)	-	-
М1 острый миелобластный лейкоз без признаков созревания	30 и более % миелобластов без гранул или с минимальным количеством гранул, созревающих клеток гранулоцитарного ряда менее 10 %, палочки Ауэра (+/-)	+	-
М2 острый миелобластный лейкоз с признаками созревания	30 и более % миелобластов содержат гранулы, 10 и более % составляют промиелоциты или другие созревающие клетки, менее 20 % моноциты, палочки Ауэра (+)	++	-
М3 острый промиелоцитарный лейкоз	30 и более % миелобластов и промиелоцитов, менее 10% составляют созревающие гранулоцитарные клетки, палочки Ауэра (++)	+++	-
М4 острый миеломоноцитарный лейкоз	30 и более % миелобластов, монобластов, промиелоцитов, более 20% моноцитарных клеток, палочки Ауэра (+/-)	++	++

М5а острый монобластный лейкоз без дифференцировки	Более 80% составляют монобласты, палочки Ауэра (-)	+/-	+++
М5в острый монобластный лейкоз с признаками дифференцировки	Монобластов менее 80%, преобладают промоноциты и моноциты, палочки Ауэра (+/-)	+/-	+++
М6 острый эритролейкоз	Миелобласты составляют более 30% среди незритроидных клеток, количество эритроидных предшественников более 50%, палочки Ауэра в эритрокариоцитах (+)	-	-
М7 острый мегакариоцитарный лейкоз	Мегакариобластов более 30%, мегакариоциты с признаками диспоэза, палочки Ауэра (-)	-	-

Позднее, по мере совершенствования иммунологических, цитогенетических методов диагностики, накопления клинических данных, она неоднократно дополнялась. В 2008 г. ВОЗ, опираясь на совокупность данных морфологических, цитохимических, иммунологических и цитогенетических исследований было предложено использовать биологические характеристики клеток для дифференциации острых миелоидных лейкозов и оценки клинических особенностей ОМЛ. В обновленной версии классификации ОМЛ выделено 7 основных подгрупп.

Для любой бластной клетки в норме присущи три основных морфологических свойства: нежная структура хроматина в ядре, присутствие четко очерченных, голубоватых ядрышек (нуклеол), базофилия цитоплазмы (голубой цвет),

При остром нелимфобластном лейкозе различают три морфологических типа бластных клеток:

I тип клеток. Клетки крупные и средних размеров, ядерно-цитоплазматическое соотношение в клетках высокое (более 1), в ядре хорошо видны нуклеолы, хроматин – нежносетчатый. Цитоплазма клеток имеет вид узкого ободка, с различной степенью базофилии, не содержит гранул.

II тип клеток. Бласты II типа сходны с клетками I типа, но в них уже видны отдельные признаки дифференциации.

Ядерно-цитоплазматическое соотношение умеренное, ядро в клетке расположено центрально, разное по форме, с нежной структурой хроматина. Клетка имеет более широкую цитоплазму, содержащую не более 20 азурофильных гранул.

III тип клеток. Этот тип клеток характеризуется полиморфностью размеров и формы ядра. Ядерно-цитоплазматическое соотношение низкое, ядро в клетке расположено центрально. Цитоплазма содержит обилие гранул и/или палочки Ауэра (гранулы, собранные в трубочки, палочки).

Характеристика вариантов острых нелимфобластных лейкозов

M₀ – вариант с минимальной дифференцировкой бластных клеток.

При этом варианте лейкозные клетки – бластные клетки I типа (более 20%) с минимальными морфологическими признаками дифференцировки, в которых цитохимические реакции на миелопероксидазу и липиды обычно отрицательные (окрашивается менее 3% бластов), ШИК – реакция в диффузной форме, реакция на альфа-нафтилацетатэстеразу не подавляется фторидом натрия.

Для клеток данного варианта характерны маркеры дифференцировки стволовых гемопоэтических клеток CD34, CD117, панмиелоидные маркеры дифференцировки, CD33, CD13.

Цитогенетическими маркерами при данном варианте выявляются аномалии 5, 7 хромосом.

Встречаемость варианта M₀ – 2-3% случаев от всех острых миелоидных лейкозов. Этот вариант ОМЛ является прогностически неблагоприятным.

M₁ - вариант без признаков созревания клеток, с преобладанием бластных клеток I типа (более 90%), с резким снижением созревающих форм клеток гранулоцитарного ряда (менее 10%). Более чем у 3% бластов наблюдаются положительные цитохимические реакции на миелопероксидазу и/или липиды, ШИК-реакция - в диффузной форме, реакция на альфа-нафтилацетатэстеразу слабоположительная, не подавляется фторидом натрия.

Опухолевые клетки при M1 варианте характеризуются наличием рецепторов дифференцировки стволовых гемопоэтических клеток - HLA-DR антиген, CD34, CD117, высокой экспрессией панмиелоидных маркеров дифференцировки CD33, CD13. Цитогенетическими методами при M1 варианте обнаруживается мутация - inv3 хромосомы.

Встречаемость составляет до 10-20% от всех острых миелоидных лейкозов.

M₂ - вариант с признаками созревания, морфологически выявляются опухолевые клетки I и II типа. Количество созревающих и зрелых клеток гранулоцитарного ряда может достигать 30-60%, моноцитарного ряда – до 20%. Цитоплазма бластов имеет азурофильную зернистость и может содержать единичные палочки Ауэра (более чем в 10% клеток). У более половины бластных клеток отмечается положительная цитохимическая реакция на миелопероксидазу, гликоген в диффузной форме. С помощью иммунофенотипических методов выявляются маркеры дифференцировки стволовых гемопоэтических клеток HLA-DR, CD117, экспрессия панмиелоидных маркеров дифференцировки, CD11b, CD33, CD13, CD15, что свидетельствует о более выраженной зрелости миелобластов при варианте M2 по сравнению с вариантом M1.

Цитогенетическими методами при данном варианте выявляется мутация - транслокация t (8;21) в 35-40% случаев. Данная мутация является маркером прогностически более благоприятного течения варианта.

Встречаемость – 25-30% от всех острых миелоидных лейкозов.

M₃-вариант – острый промиелоцитарный лейкоз, характеризующийся преобладанием клеток III типа. Морфологическим субстратом опухоли являются атипичные промиелоциты. Бласты, содержащие в цитоплазме зернистость, составляют более 40%. При данном варианте характерным является выраженная положительная цитохимическая реакция на миелопероксидазу, липиды, гликоген в диффузной форме.

Имунофенотипическими методами выявляют низкую экспрессию CD34 и отсутствие HLA-DR антигена, экспрессию

панмиелоидных маркеров дифференцировки - CD11; CD13; CD33.

Цитогенетические методы позволяют выявить транслокацию участков хромосом t 15;17, в результате чего образуется онкоген PML/RAR- альфа, синтезирующий онкобелок, который накапливаясь в избыточном количестве в цитоплазме и ядре миелоидных клеток, блокирует дифференцировку клеток на уровне промиелоцита. Для данного варианта острого миелоидного лейкоза характерно развитие выраженного геморрагического синдрома, осложненного ДВС синдромом.

Встречаемость варианта М3 – до 5-10% всех случаев миелоидных лейкозов, чаще у молодых людей.

М₄ -вариант – острый миеломонобластный лейкоз, около 20% клеток при данном варианте составляют мелобласты I и II типов, монобласты, промоноциты. Общее количество клеток моноцитарного ряда в костном мозге составляет до 20%, а в периферической крови – до 5×10^9 /л. Для клеток моноцитарного ряда, как для монобластов, так для промоноцитов, характерен полиморфизм.

При данном варианте у миелобластов отмечаются положительные цитохимические реакции на миелопероксидазу, липиды, хлорацетатэстеразу, у монобластов – положительная реакция на неспецифическую эстеразу, подавляемая фторидом натрия и слабая или отрицательная - на миелопероксидазу. Реакция на гликоген у миелобластов в диффузной форме, у монобластов – в диффузно-гранулярной форме.

При иммунофенотипировании выявляются панмиелоидные маркеры дифференцировки и маркеры клеток моноцитарного ряда, например, CD14; CD64;

Частота встречаемости составляет 15-20% всех случаев острых миелоидных лейкозов.

Выделяют подвариант **М₄Е₀** – с эозинофилией в костном мозге (более 5%), аномальными эозинофилами с незрелыми (красно-синими) гранулами, и отсутствием эозинофилии в периферической крови. Подвариант М₄Е₀ характеризуется наличием следующих мутаций – inv16; (p13;q22) и t(16;16),

наличием очагов экстрамедулярного кроветворения (шейные лимфатические узлы, миндалины, яички и другой локализации).

M₅ вариант – острый монобластный лейкоз.

M_{5A} – подвариант – без признаков дифференцировки, для которого характерно наличие бластных клеток I типа. Бластные клетки в костном мозге составляют более 80%. Цитохимические реакции на гликоген, миелопероксидазу, липиды сомнительные, выраженная положительная реакция на альфа-нафтилацетатэстеразу, полностью подавляемая фторидом натрия.

В 30% случаев бласты экспрессируют поверхностный антиген CD117, HLA-DR и в большинстве случаев – панмиелоидные маркеры дифференцировки и специфичные для клеток моноцитарного ряда маркеры CD14, CD64. Наиболее часто при варианте **M_{5A}** выявляется аномалия 11 хромосомы.

Частота встречаемости – 5-10% от всех миелобластных лейкозов, чаще встречается в молодом возрасте.

M_{5B}- подвариант с признаками дифференцировки опухолевых клеток. Характерно наличие клеток I и II типа, это могут быть разные клетки моноцитарного ряда, но преобладают промоноциты, моноциты. Монобласты составляют менее 80%. Для **M_{5B}** характерна резко положительная реакция на неспецифическую эстеразу, ингибируемая фторидом натрия.

Иммунофенотип опухолевых клеток характеризуется наличием как панмиелоидных антигенов CD13; CD15; CD33; так и специфических для клеток моноцитарного ряда маркеров - CD14; CD64; CD68.

Частота встречаемости подварианта **M_{5B}** – 3-6% от всех острых миелобластных лейкозов.

M₆-вариант – острый эритролейкоз, для которого характерно наличие миелобластов I и II типов, эритробластов. Количество эритрокариоцитов при данном варианте превышает 50% от всех ядросодержащих клеток костного мозга. В клетках эритроидного ростка выявляются морфологические признаки дисэритропоэза (базофильная пунктация, тельца Жолли, кариорексис, многоядерность, мегалобластоидность ядер и др.).

Клетки миелоидной линии экспрессируют на поверхности панмиелоидные маркеры CD13, CD33, МПО, кроме того, отмечается высокая частота выявления антигена CD34.

Специфическим маркером эритробластов является мембранный белок - гликофорин А (CD235). Цитогенетическим маркером данного варианта является делеция 5 и 7 хромосом. В клинике острого эритролейкоза на первый план выступает анемический синдром.

Встречаемость – 3-4% всех случаев острых миелоидных лейкозов.

M₇-вариант – острый мегакариобластный лейкоз, при котором преобладают клетки I и II типов. Популяция бластных клеток характеризуется наличием как недифференцированных клеток, так и клеток с морфологическими признаками мегакариобластов. Кроме того, такие незрелые клетки могут быть окружены отшнуровывающимися тромбоцитами. Цитохимическая реакция с гликогеном у бластов имеет диффузно-гранулярную форму, реакция на МПО и липиды – отрицательная.

Иммунофенотипирование является решающим в диагностике варианта **M₇**, так как позволяет установить мегакариоцитарную дифференцировку бластов. На бластных клетках в большинстве случаев выявляются панмиелоидные маркеры дифференцировки, а также специфичные для мегакариоцитов антигены - CD41, CD42b, CD61. Цитогенетическими методами выявляются аномалии: инверсия хромосомы inv 3, транслокация t (3;3), транслокация t (9;22), трисомия хромосомы 21.

Встречаемость варианта **M₇** составляет 0,5% всех случаев миелоидных лейкозов, встречается во всех возрастных группах.

Классификация острых лимфобластных лейкозов на основании морфологических признаков

Различают три морфологических типа бластных клеток при острых лимфобластных лейкозах:

L₁ – бластные клетки мелкие и средних размеров с мономорфным ядром (ядро плотное, гомогенное), правильной формы, с умеренно конденсированной структурой хроматина, без нуклеол, или они слабовыраженные. Цитоплазма скудная, слабобазофильная.

L₂ – средние и крупные неоднородные бластные клетки, имеющие неровный край ядра – в виде зазубрин, бухтообразных вдавлений, нежную мелкогранулярную структуру хроматина, 1-2 крупных ядрышка. Цитоплазма в клетках умеренно выраженная, базофильная.

L₃ – крупные однородные клетки, имеющие округлое или овальное ядро, умеренно нежную структуру хроматина, 1-2 крупных ядрышка. Цитоплазма клеток более широкая по сравнению с предыдущими клетками, интенсивно базофильная, вакуолизированная.

Для разграничения ОЛЛ от ОНЛЛ лейкозов широко используются данные цитохимического исследования бластов. Примерно в 50 % случаев ОЛЛ бласты имеют положительную ШИК-реакцию в гранулярной форме.

Однако ни морфологические признаки бластных клеток, ни характер цитохимических реакций не могут служить критерием для выделения вариантов острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ). Наиболее информативным методом типирования ОЛЛ является иммунофенотипическая характеристика клеток с использованием моноклональных антител, которая позволяет установить линейную направленность бластных клеток, стадию дифференцировки внутри каждой линии, диагностировать смешанные варианты (табл. 8).

Таблица 8. – Иммунологическая классификация острых лимфобластных лейкозов

В-линейный	Антигены позитивные с двумя из трех маркеров – Tdt, HLA-DR+ в большинстве случаев, за исключением В варианта из зрелых клеток.	Т-линейный	Антигены в большинстве случаев Tdt, HLA-DR+, CD34-
В-I (про-В) по морфологическим признакам соответствует L ₁ - L ₂ по FAB – классификации	CD19+; CD22+ и/или CD79a цитоплазматические	Т1 (про-Т) ОЛЛ	CD7+

В II (common, пре-пре – В вариант), по морфологическим признакам соответствует L ₁ по FAB – классификации	CD10+	T2 (пре-T) ОЛЛ	CD2+ CD5+ CD8+
В-III (пре – В вариант) по морфологическим признакам соответствует L ₁ - L ₂ по FAB – классификации	Цитоплазматическая мю-цепь	T3 (кортикальный T) ОЛЛ	CD1a+
Вариант из зрелых В-клеток (по морфологическим признакам соответствует L ₃ по FAB – классификации)	Поверхностный IgM моноклональный по каппа или лябмда типу	T4 (зрелый T) ОЛЛ	Мембранный CD3+, CD1a-

Клиника

Клиника острого лейкоза не характерна и определяется:

- степенью вытеснения клеток нормального кроветворения опухолевыми клетками;
- локализацией лейкозных инфильтратов вне органов кроветворения;
- степенью интоксикации метаболитами распада опухолевых клеток;
- аутоиммунными, инфекционно-воспалительными осложнениями, связанными с угнетением T- и В-лимфоцитов;
- резистентностью опухолевых клеток к цитостатическим препаратам (табл. 9).

Таблица 9. – Клинические проявления острых лейкозов

	Патогенез	Симптомы
1. Инфильтрация костного мозга опухолевыми клетками		
1.1	нейтропения	лихорадка, осложнения инфекционно-воспалительного характера, присоединение бактериальных инфекций
1.2	анемия	Бледность кожных покровов, одышка, сонливость, учащенное сердцебиение.
1.3	тромбоцитопения	геморрагический синдром (петехии, экхимозы, кровотечения, кровоизлияния, гематомы)
2. Инфильтрация других органов		
2.1	печень, селезенка, лимфатические узлы	увеличение
2.2	ЦНС	неврологические нарушения: головокружение, головная боль, признаки паралича черепно-мозговых нервов, нарушение зрения; психические расстройства
2.3	десны	бластная инфильтрация, язвенно-некротические процессы
2.4	кожа	лейкозная инфильтрация опухолевыми клетками
2.5	поражение костей	болезненность и боли в костях, артралгия

Стадии острых лейкозов

1 стадия – развернутая атака или начало: с момента установления диагноза до эффекта от лечения;

2 стадия – полная клинико-гематологическая ремиссия, критерии:

- хорошее самочувствие, удовлетворительное состояние;
- нет признаков опухолевого роста в органах и тканях;
- гематологические признаки:
 - 2.1 гемоглобин 110 г/л и более;
 - 2.2 нейтрофилы $1,5 \times 10^9$ /л и более;
 - 2.3 тромбоциты 100×10^9 /л и более;
 - 2.4 бластов в периферической крови - 0;
 - 2.5 бластов в костном мозге – не более 5%.

При обнаружении опухолевых клеток с помощью цитогенетических, молекулярно-генетических методов на фоне полной клинико-гематологической ремиссии, говорят о наличии минимальной остаточной (резидуальной) болезни;

3 стадия – выздоровление - полная клинико-гематологическая ремиссия без признаков минимальной остаточной болезни, сохраняющаяся на протяжении более 5 лет;

4 стадия – частичная ремиссия – это улучшение состояния больного, улучшение гематологических показателей, но не до полной ремиссии (1% бластных клеток в периферической крови, в костном мозге до 20% бластных клеток, наличие тромбоцитопении и других осложнений);

5 стадия – рецидив: костномозговой, внекостномозговой – ухудшение состояния (нейролейкоз, поражение у мужчин и мальчиков яичек, клинико-гематологическое, цитогенетическое, молекулярно-генетическое ухудшение);

6 стадия – терминальная – на фоне активного лечения больному становится хуже: возрастает количество бластных клеток, наблюдается выраженная интоксикация, геморрагический синдром, глубокая анемия, инфекционные и воспалительные осложнения.

Диагностика

Этапы диагностики острых лейкозов:

1 этап – обнаружение в периферической крови и костном мозге, используя морфологические критерии, бластных клеток и установление факта острого лейкоза.

2 этап – использование дополнительных методов исследования (цитохимических, цитогенетических, иммунологических, молекулярно-биологических) для уточнения варианта острого лейкоза, выбора терапии и прогноза заболевания.

Критерии диагностики острых лейкозов в Республике Беларусь – наличие у взрослых 30% и более бластных клеток в костном мозге, у детей - 25% и более.

По данным ВОЗ, критерием острого лейкоза является количество бластных клеток в костном мозге от 20% и более.

Картина периферической крови

Со стороны эритроидного ростка кроветворения наблюдается различной степени выраженности анемия. Анемия нормо- или макроцитарная (реже мегалобластная), гиперхромная, гипорегенераторная.

Со стороны лейкоцитов может наблюдаться картина от глубокой лейкопении до лейкоцитоза с чрезвычайно высокими цифрами лейкоцитов (от 1 до $300 \times 10^9/\text{л}$). В случае лейкопении бластные клетки могут отсутствовать или их может быть 1-2% – это так называемая алейкемическая фаза острого лейкоза, при которой в периферической крови наблюдается относительный лимфоцитоз за счет нейтропении. Сублейкемическая фаза характеризуется наличием 5-10% бластных клеток. При наличии в крови более 10% бластных клеток говорят о лейкемической фазе острого лейкоза. В лейкоцитарной формуле можно видеть также так называемый «лейкемический провал» – наличие бластных и зрелых клеток и отсутствие переходных или единичные переходные клетки.

Со стороны мегакариоцитарного ростка – тромбоцитопения разной степени выраженности.

В периферической крови наблюдаются проявления дисэритропоэза, дисгранулоцитопоэза, наличие дегенеративных форм тромбоцитов.

СОЭ – соответственно случаю, чаще наблюдается ускорение.

При биохимическом исследовании сыворотки крови может отмечаться увеличение концентрации мочевой кислоты, калия, фосфора, активности лактатдегидрогеназы пропорционально лизису опухолевых клеток. При поражении ЦНС в спинномозговой жидкости может отмечаться увеличенное содержание белка на фоне низкого цитоза и низкой концентрации глюкозы.

Картина костного мозга

Со стороны костного мозга отмечаются следующие изменения:

1. Тотальная бластная трансформация (бластные клетки составляют 80-100%);

2. Признаки диспоза при частичном сохранении ростков кроветворения.

3. «Лейкемический провал» - наличие бластных и зрелых клеток и отсутствие переходных или единичные переходные клетки.

4. Наличие мегалобластов.

5. Количество мегакариоцитов снижено вплоть до 0 «корабли среди моря бластных клеток».

Цитохимический метод исследования клеток крови и костного мозга

Цитохимические реакции используются для диагностики лейкозов, они основываются на использовании цветных химических реакций для определения химической природы клеток и выявления в них метаболически активных ферментов и субстратов. Наибольшее диагностическое значение имеет выявление активности пероксидазы, кислой и щелочной фосфатазы, неспецифической эстеразы, а также таких субстанций, как гликоген и липиды. Лейкозные клетки, особенно до назначения химиотерапии, сохраняют особенности метаболизма и многие свойства, присущие нормальным клеткам, поэтому исследование субстанций и ферментов лейкозных клеток используется для идентификации, определения степени зрелости клеток и принадлежности их к соответствующей клеточной линии.

Для исследования цитохимических реакций мазки крови и костного мозга готовят так же как для цитологического исследования, фиксируют и окрашивают соответственно выявляемому веществу.

В мазке исследуют не менее 100 клеток, *при этом оценивают:*

- процент положительно реагирующих клеток (реакция считается положительной при наличии 3 и более процентов клеток, в которых выявлена положительная реакция);

- интенсивность окрашивания (различают 4 степени реакции: 0 – с отрицательной реакцией, I – со

слабоположительной реакцией, II – с положительной реакцией, III – с выраженной реакцией;

- характер распределения окрашенного материала (диффузный, диффузно-гранулярный, гранулярный).

Кроме того, для оценки активности фермента или количество исследуемого вещества определяют средний цитохимический коэффициент (СЦК), вычисляемый по формуле:

$$\text{СЦК} = \frac{0a+1b+2в+3г}{100},$$

где цифры – степень интенсивности окраски, буквы – количество клеток (%) с соответствующей степенью окраски; в норме коэффициент может быть максимально равен 3,0.

При 0 (нулевой) степени окрашивание отсутствует.

При I – наличие единичных окрашенных гранул в цитоплазме, либо слабое диффузное окрашивание всей цитоплазмы, либо фокусное окрашивание.

При II степени интенсивности окраски наблюдается большое количество гранул в цитоплазме, либо диффузное окрашивание почти всей цитоплазмы, но с неокрашенными участками.

При III степени – гранулы заполняют всю цитоплазму, либо отмечается диффузный характер реакции.

Углеводы играют важную роль в клеточном метаболизме. Их расщепление сопровождается выделением большого количества энергии, обеспечивая, таким образом, энергетические потребности клетки. Для выявления углеводов применяют реактив Шифф и йодную кислоту – ШИК-реакция или PAS – реакция (Periodic Acid Schiff). Реакция выявляет различные углеводы, в том числе наиболее распространенный полисахарид – гликоген. При взаимодействии реактива Шифф и йодной кислоты с альдегидными группами полисахаридов образуется субстрат малиново-красного цвета.

В миелобластах гликоген может отсутствовать или может давать слабую диффузную реакцию. Количество гликогена возрастает по мере созревания клеток, поэтому наибольшее количество гликогена содержится в зрелых клетках

гранулоцитарного ряда. Положительная реакция на гликоген в нейтрофильных гранулоцитах выявляется в виде интенсивной малиново-красной диффузной окраски цитоплазмы.

У лимфоцитов ШИК-реакция имеет гранулярный характер, в виде венчика вокруг ядра на фоне неокрашенной цитоплазмы.

В моноцитах распределение окрашенного вещества имеет невыразительный диффузно-гранулярный характер – пылевидные гранулы на фоне бледно-розовой цитоплазмы.

Для подтверждения гликогеновой природы полисахарида используется контрольный тест с амилазой.

Пероксидаза (МПО) – фермент, разрушающий перекись водорода, образующуюся в клетке в процессе жизнедеятельности. Токсичная для клетки перекись водорода обезвреживается, освобождаясь при участии пероксидазы кислород используется в окислительных процессах. Наибольшее значение имеет миелопероксидаза – маркер клеток нейтрофильного ряда, располагающийся в основном в первичных лизосомальных гранулах. Активность миелопероксидазы обнаруживается уже на стадии миелобласта и возрастает по мере созревания клеток, но наибольшее количество миелопероксидазы содержится в промиелоцитах. Положительная реакция на миелопероксидазу с использованием раствора бензидина и перекиси водорода – оранжево-желтое окрашивание гранул в цитоплазме. Пероксидаза не содержится в лимфоцитах, часть моноцитов может давать слабую или умеренную реакцию на пероксидазу.

Липиды содержатся во многих клетках за исключением лимфоцитов и эритроидных клеток. Наибольшее количество липидов содержится в клетках нейтрофильного ряда, начиная со стадии миелобласта. Реакция усиливается по мере созревания клеток. Липиды содержатся в клетках костного мозга и периферической крови в виде простых липидов - свободных жирных кислот, нейтральных жиров и сложных липидов - фосфолипидов. Особенно много фосфолипидов обнаруживается в составе специфической зернистости в зрелых нейтрофилах. Резко положительная реакция на липиды наблюдается у эозинофилов, переменную реакцию на липиды дают незрелые базофилы, моноциты.

Для выявления липидов наиболее часто используют реакцию с суданом черным Б, который окрашивает фосфолипиды в черный цвет – положительная реакция на липиды.

Неспецифические эстеразы (НЭ) – гидролазы, способные гидролизовать простые эфиры N- свободных спиртов жирных кислот, в настоящее время известно 9 изоферментов неспецифических эстераз, но наибольший интерес для гематологии представляет альфа-нафтилацетатэстераза и хлорацетат-эстераза. Реакция на альфа-нафтилацетатэстеразу может быть положительной в нейтрофилах, эозинофилах, лимфоцитах, однако она не подавляется фторидом натрия. Наибольшая активность альфа-нафтилацетатэстеразы определяется в моноцитах, в которых присутствует изоформа фермента, подавляемая фторидом натрия. Активность фермента выявляется в виде гранул темно-бурого цвета в цитоплазме.

Хлорацетатэстераза, как и миелопероксидаза, является маркером нейтрофилов и выявляется уже на стадии миелобласта. Активность хлорацетатэстеразы возрастает у промиелоцитов и миелоцитов, т.е. по мере созревания клетки. Активность фермента выявляется в реакции Яма в виде гранул синего цвета в цитоплазме.

Сдвоенную реакцию на хлорацетатэстеразу и альфа - нафтилацетатэстеразу проводят последовательно на одном мазке. Это позволяет разделить клетки гранулоцитарной и моноцитарной линий, что имеет значение для диагностики лейкозов из этих линий. Активность фермента высокая при миелобластном лейкозе, низкая – при миеломонобластном и при монобластном лейкозе может не обнаруживаться вовсе.

Активность **кислой фосфатазы (КФ)** определяется процессами клеточной дифференцировки. Активность кислой фосфатазы выявляется в гранулоцитах, эозинофилах, базофилах, моноцитах начиная с незрелых клеток этих рядов, где ее активность наиболее высокая. По мере созревания клеток ее активность снижается, в зрелых клетках активность кислой фосфатазы не определяется. Бластные клетки (миелобласты, монобласты), окрашенные в зеленый цвет, содержат в цитоплазме мелкую красную зернистость – положительная реакция. Положительная реакция на кислую фосфатазу

отмечается при остром миелобластном лейкозе, резко положительная реакция – при остром монобластном лейкозе. Во многих клетках (моноцитах, лимфоцитах) активность фермента ингибируется ионами тартрата. В лимфобластах, лимфоцитах реакция на кислую фосфатазу переменная. Наибольшая активность фермента среди клеток этой линии наблюдается в Т-лимфоцитах.

Реакция на кислые мукополисахариды. Зернистость клеток гранулоцитарного ряда содержит кислые мукополисахариды, основным компонентом которых является хондроитин-4-сульфат. Наибольшее количество кислых мукополисахаридов синтезируется в промиелоцитах, поэтому реакция на сульфатированные кислые мукополисахариды специфична для острого промиелоцитарного лейкоза. Положительная реакция – появление в цитоплазме промиелоцитов крупной розово-вишневой зернистости, ядра клеток при этом окрашиваются в светлый серо-голубой цвет.

Иммунофенотипирование

Проточная цитометрия и иммуногистохимическое окрашивание позволяют идентифицировать лейкозные клетки по их мембранным маркерам с помощью моноклональных антител. Это дает возможность определить не только происхождение клетки, но и стадию ее дифференцировки, что очень важно для выбора лечения и оценки прогноза неопластического процесса (табл. 10).

Таблица 10. – Иммунофенотипическая классификация

Клеточный ряд	Маркеры
Полипотентная стволовая клетка	CD117, HLA-DR, CD34
Клетка миелоидного ряда	CD13, CD15, CD33
Т-лимфоциты и их предшественники	CD1, CD2, CD3, CD4, CD5 CD7, CD8, TdT
В-лимфоциты и их предшественники	CD10, CD19, CD20, CD22, CD24, TdT
Клетки эритроидного ряда	Гликофорин А
Клетки моноцитарного ряда	CD14, CD36, CD 64
Клетки мегакариоцитарного ряда	CD41, CD42b, CD61

Цитогенетические исследования

Анализ хромосом при лейкозах и других гематологических заболеваниях является обязательным как на этапе диагностики, так и в динамике заболевания. Цитогенетические исследования увеличивают количество надежных прогностических факторов, способствующих подбору адекватной терапии. Наиболее значимым для прогноза заболевания является обнаружение специфических хромосомных нарушений, присутствие или отсутствие клональных аномалий, изменений модального числа хромосом.

Таблица 11. – Хромосомные нарушения, ассоциированные с некоторыми острыми лейкозами

Острый лейкоз	Хромосомные нарушения
Острые миелоидные лейкозы	T(8; 21) (q22;q22) (11;q23) Трисомия по хромосоме 7, 8, 13
Острый миелоидный лейкоз с эозинофилией	Inv(16) (p13; q22) t(1; 16) (p13; q22)
Острый промиелоцитарный лейкоз	t(15; 17) (q22; q21)
Острый миеломонобластный лейкоз	t (8; 16) (p11; p13)
Острый монобластный лейкоз	t (9; 11) (p22; q23)
Острый В – лимфобластный лейкоз	t (1; 19)(q23; p13;) t (12; 21) (p13; q22)
Острый Т – лимфобластный лейкоз	t (1; 14) (p32; q11) t (1; 7) (p32; q35)

Лабораторная диагностика хронических миелопролиферативных неоплазий

Хронические миелопролиферативные неоплазии являются клональными опухолями, которые развиваются из гемопоэтической стволовой клетки и характеризуются пролиферацией в костном мозге одного или более ростков

миелоидной линии (гранулоцитарного, эритроидного, мегакариоцитарного).

Пролиферация клеток сопровождается их относительно нормальным созреванием (эффективным гемопоэзом), что приводит к повышению числа гранулоцитов, эритроцитов и/или тромбоцитов в периферической крови.

Морфологическим субстратом опухоли являются созревающие и зрелые клетки.

Классификация

В новом пересмотре классификации миелоидных опухолей ВОЗ 2008 г. предложено использовать термин «миелоидные неоплазии»

Классификация миелоидных неоплазий (ВОЗ, 2008):

1. Острые миелоидные лейкозы.
2. Миелодиспластические синдромы.
3. Миелопролиферативные неоплазии.
4. МДС/Миелопролиферативные опухоли.
5. Миелоидные опухоли, ассоциированные с эозинофилией и поломками PDGFRA, PDGFRB, FGFR1.

В соответствии с классификацией среди миелопролиферативных неоплазий выделяют:

1. Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ).
2. Истинная полицитемия (ИП).
3. Эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ).
4. Первичный миелофиброз (ПМФ).
5. Хронические миелопролиферативные неоплазии неклассифицируемые (ХМН НК).
6. Хронический нейтрофильный лейкоз (ХНЛ).
7. Хронический эозинофильный лейкоз неспецифицированный (ХЭЛ НС).
8. Мастоцитоз.

Хронический миелолейкоз – опухоль системы крови, исходной клеткой которой является стволовая гемопоэтическая клетка. Опухолевые клетки сохраняют способность к дифференцировке и созреванию. Для ХМЛ характерна

повышенная пролиферация клеток гранулоцитарного ряда и более всего – нейтрофильных гранулоцитов.

Эпидемиология

Хронический миелолейкоз составляет 15-20% от всех миелопролиферативных неоплазий и занимает 3 место после хронического лимфолейкоза и острых лейкозов. Частота встречаемости 1-1,5 на 100 000 населения в год, пик заболевания приходится на возраст от 30-50 лет, чаще болеют мужчины.

Патогенез

Маркером опухолевого клона является Ph (филадельфийская)- хромосома, которая образуется в результате обмена участков 9 и 22 хромосом (t 9;22). В результате мутации формируется химерный онкоген ABL/BCR, продукт которого (онкобелок p210) обладает высокой тирозинкиназной активностью, что приводит к развитию цепи событий:

- клетки приобретают повышенную митогенную активность;
- наблюдается ингибирование апоптоза;
- нарушается адгезия клеток к строме костного мозга (утрачивается инстинкт дома), в результате чего опухолевые клетки распространяются в другие органы и ткани;
- отмечается нестабильность генетического аппарата и как следствие - не происходит остановки клеточной пролиферации.

Морфологическим субстратом опухоли при хроническом миелоидном лейкозе являются созревающие и зрелые клетки гранулоцитарного ряда – нейтрофилы. Опухолевые клетки морфологически неотличимы от нормальных клеток, но по функциональным свойствам и биохимическим характеристикам они неполноценны: в клетках снижена активность щелочной фосфатазы, фагоцитарная активность, уровень гликогена.

Для хронического миелоидного лейкоза характерно стадийное развитие, в котором различают следующие стадии:

- 1) хроническая (моноклоновая);
- 2) акселерации (поликлоновая);
- 3) терминальная бластотрансформация (бластный криз).

1. ХРОНИЧЕСКАЯ СТАДИЯ

Продолжительность хронической стадии- 2-10 лет, без лечения 2-2,5 года. У большинства пациентов хронический миелолейкоз начинается исподволь, характерно длительное относительное благополучие, без клинических проявлений. Затем нарастают явления интоксикации: слабость, сонливость, потливость, тяжесть в эпигастральной области, болезненность в левом подреберье, боли в костях. Менее характерны тромбозы и кровотечения, обусловленные дисфункцией гранулоцитов и тромбоцитов.

Картина периферической крови

Со стороны красной крови может не наблюдаться изменений или умеренная нормохромная нормоцитарная анемия, которая нарастает по мере прогрессирования заболевания. В периферической крови появляются нормобласты за счет явления гиперспленизма (увеличенная селезенка легко выпускает нормобласты), уровень ретикулоцитов может быть нормальным или сниженным.

Лейкоцитоз – от 20-30 до $100 \times 10^9/\text{л}$, со стороны лейкоцитарной формулы – нейтрофильный сдвиг влево до миелоцитов, промиелоцитов. Количество бластов в периферическом русле составляет 1-3% до 10%. Отмечается преобладание зрелых клеток – палочкоядерных, сегментоядерных нейтрофилов, морфология которых не изменена, но может быть скудность гранул (гипогранулия). Более выраженная гипогранулия отмечается у промиелоцитов и миелоцитов. Характерно увеличение эозинофилов и/или базофилов, т.н. базофильно-эозинофильная ассоциация. В сумме количество эозинофилов и базофилов при хронической стадии составляет более 6,5%. Количество тромбоцитов чаще нормальное, но может быть повышенным или пониженным.

Скорость оседания эритроцитов – чаще наблюдается ускорение.

При цитохимическом исследовании отмечается снижение активности щелочной фосфатазы у большинства нейтрофилов периферической крови (средний цитохимический коэффициент менее 0,25).

При биохимическом исследовании крови отмечается увеличение уровня мочевой кислоты, калия, активности лактатдегидрогеназы пропорционально лизису опухолевых клеток.

Картина костного мозга

Пунктат костного мозга гиперклеточный (более $350 \times 10^9/\text{л}$) за счет гиперплазии гранулоцитарного ростка, лейкоэритробластический индекс 20:1, 30:1, 50:1 (нормальные значения 2:1-4,5:1), костномозговой индекс созревания нейтрофилов смещен в сторону зрелых форм, отмечается наличие базофильно-эозинофильной ассоциации. Количество мегакариоцитов у 40-50% пациентов увеличено, отмечаются признаки дисплазии мегакариоцитов (наличие гиполобулярных ядер). Усиленная пролиферация клеток приводит к быстрому использованию фолиевой кислоты и появлению в костном мозге мегалобластов, мегалобластоидных нормобластов. Могут также встречаться ложные клетки Гоше и видоизмененные гистиоциты.

Трепанобиопсия

При гистологическом исследовании биоптата наблюдается снижение количества адипоцитов вплоть до исчезновения жировой ткани, гиперплазия клеток гранулоцитарного ростка.

В ходе лечения пациентов с ХМЛ может наблюдаться развитие синдрома цитолиза (за счет разрушения опухолевых клеток), который сопровождается повышением температуры тела, гиперлейкоцитозом, увеличением количества мочевой кислоты, калия, кальция, активности лактатдегидрогеназы, гиперурикемией, (вплоть до развития ОПН). В случае благоприятного результата терапии развивается ремиссия, в ходе которой меняется морфология клеток – появляется множество дегенеративных изменений в клетках: пельгеризация, токсогенная зернистость, вакуолизация ядра, цитоплазмы и т.д.

2. СТАДИЯ АКСЕЛЕРАЦИИ (предвестник терминальной стадии).

Продолжительность стадии от нескольких месяцев до 1,5 лет. Для стадии акселерации характерно ухудшение состояния пациента: снижение веса, нарастание симптомов интоксикации,

анемия, гепатоспленомегалия, присоединение инфекций, нарушение кровотока в микроциркуляторном русле и соответственно нарушение трофики тканей, может наблюдаться лимфоаденопатия.

По данным ВОЗ, для стадии акселерации характерны следующие диагностические критерии:

- нормоцитарная или макроцитарная рефрактерная анемия, нормобластоз;

- неконтролируемое увеличение лейкоцитов от 300-800 до $1000 \times 10^9/\text{л}$;

- в периферической крови и/или костном мозге увеличение бластов от 10 до 19%;

- сумма миелобластов и промиелоцитов в периферической крови и/или костном мозге более 20%;

- базофилия;

- эозинофилия;

- сумма базофилов и эозинофилов в периферической крови и/или костном мозге более 20%;

- моноцитоз;

- рефрактерная тромбоцитопения (менее $100 \times 10^9/\text{л}$) или тромбоцитоз (более $1000 \times 10^9/\text{л}$);

- фрагменты ядер мегакариоцитов;

- появление признаков дисплазии миелоидных клеток костного мозга.

- появление новых патологических клеток при цитогенетическом исследовании (дополнительные хромосомные аномалии);

- быстрое увеличение селезенки.

3. ТЕРМИНАЛЬНАЯ СТАДИЯ (бластный криз)

Продолжительность стадии составляет несколько месяцев. Состояние пациентов тяжелое, наблюдается выраженная интоксикация, развитие бактериальных, вирусных инфекций, тромбофилических состояний, кровотечений, возникновение экстрамедуллярных очагов кроветворения с пролиферацией бластных клеток в коже, лимфатических узлах, центральной нервной системе, костях и других органах и тканях.

Для терминальной стадии характерна миелемия – выход костномозговых элементов в периферическую кровь, в результате

чего картина периферической крови полностью повторяет картину костного мозга. Для терминальной стадии характерны: глубокая макроцитарная анемия, нормобластоз, лейкоцитоз до $1\ 000\ 000 \times 10^9/\text{л}$, базофилия, бластных клеток 20% и более - до 90%, бластные клетки полиморфные, атипичные за счет дополнительных хромосомных аномалий и образования новых клонов. Кроме того, было установлено, что выявленные изменения генома при ХМЛ носят четкий молекулярно-цитогенетический полиморфизм (т.е. наблюдаются осложнения стандартной транслокации t (9; 22) другими поломками).

При выполнении цитохимических исследований наблюдаются реакции характерные для клеток миелоидного ростка (в 70% случаев ХМЛ бластный криз развивается по миелоидному типу), в некоторых случаях – для эритробластов, монобластов и даже лимфобластов, что говорит о том, что мутации наблюдаются на уровне ранней гемопоэтической стволовой клетки.

Диагностические критерии терминальной стадии ХМЛ (ВОЗ, 2008):

- бласты более 20% в периферической крови или в костном мозге от числа всех ядерных клеток;
- экстрамедуллярные очаги кроветворения с пролиферацией бластных клеток;
- в трепанобиоптате костного мозга крупные очаги или скопления бластных клеток.

Диагноз хронического миелоидного лейкоза (чаще в хроническую стадию) устанавливают на основании:

- 1) клинических проявлений – на фоне относительного благополучия увеличение селезенки, иногда печени;
- 2) картины периферической крови - лейкоцитоз с тенденцией к росту, в лейкоцитарной формуле наличие нейтрофилеза со сдвигом влево до промиелоцитов, миелоцитов, увеличение эозинофилов и/или базофилов;
- 3) картины костного мозга – гиперплазия гранулоцитарного ряда;

- 4) цитогенетического исследования - обнаружение Ph-хромосомы, в терминальную стадию – выявление дополнительных хромосомных аномалий;
- 5) молекулярно-генетическое исследование – обнаружение онкогена - ABL/BCR.

Истинная полицитемия (эритремия)

Заболевание впервые описано Вакезом в 1892 г., относится к хроническим миелопролиферативным неоплазиям клоновой природы, с исходной клеткой на уровне стволовой или близкой к ней клетки- предшественника. Для истинной полицитемии характерна повышенная продукция клеток эритроидной линии в сочетании с избыточной пролиферацией клеток гранулоцитарного и мегакариоцитарного ростков. Образуется клон клеток способных к созреванию, морфологически неотличимых от нормальных клеток, но неполноценных в функциональном плане: ригидность клеток, изменение поверхностного заряда, недостаточность ферментов, могут делиться автономно независимо от стимуляции эритропоэтином.

В основе патогенеза лежит:

- повышенная чувствительность опухолевых клеток к эритропоэтину и другим цитокинам, что приводит экспансивной пролиферации клеток миелоидного ростка;

- наличие точечной мутации специфической тирозинкиназы JAK2, ген которой расположен на 9 хромосоме; в результате мутации наблюдается резкое повышение функции тирозинкиназы, что приводит к внутриклеточному проведению сигнала независимо от внешней стимуляции эритропоэтином;

- выраженная экспрессия рецепторов к эритропоэтину.

Результатом избыточной пролиферации клеток-предшественников миелопоэза является появление эритроцитоза, тромбоцитоза у пациентов с эритремией.

Эпидемиология

Частота заболеваемости – 0,5-1,7 на 100 000 населения в год, с тенденцией к увеличению в последние годы. Эритремией чаще болеют мужчины в возрасте старше 55 лет, но может встречаться и в молодом возрасте.

Клиника

Клинические проявления можно условно подразделить на три синдрома:

1. Синдром полнокровия (плетора) обусловленный увеличением объема циркулирующей крови за счет клеток, повышением вязкости крови, образованием агрегатов клеток, дилатацией сосудов периферической сети и замедлением кровотока:

- темно-вишневый цвет кожи и видимых слизистых (например, мягкого неба в сравнении с более бледной окраской твердого неба - симптом Купермана) за счет увеличения редуцированного гемоглобина;

- головные боли, головокружения, боли в грудной клетке, одышка, боли в области пальцев рук и ног, боли в области сердца, в эпигастральной области;

- спленомегалия, нередко формирование инфаркта селезенки (миелоидная метаплазия селезенки, повышенное кровенаполнение);

- интенсивный кожный зуд;

- артериальная гипертензия;

- снижение памяти, слуха, зрения.

2. Синдром сосудистых нарушений с одновременной склонностью, как к кровоточивости, так и тромбофилии.

2.1 Повышенная кровоточивость обусловлена относительной гипофибриногемией (уменьшение объема плазмы приводит к уменьшению количества фибриногена, которого недостаточно для формирования полноценного сгустка), нарушением функции тромбоцитов, адсорбцией на эритроцитах факторов свертывания.

2.2 Тромбофилические осложнения обусловлены увеличением массы циркулирующих эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов, образованием агрегатов клеток, повышением вязкости крови, усилением контакта крови со стенками сосудов, замедлением капиллярного кровотока, стазом крови микроциркуляторного русла.

3. Синдром накопления мочевой кислоты, который обусловлен распадом клеток и иногда неэффективным эритропоэзом:

- гиперурикемия, урикозурия с развитием подагры, подагрической полиартралгии, почечной колики;
- нефролитиаз с обструкцией мочеточников, развитие хронического пиелонефрита с исходом в хроническую почечную недостаточность.

Различают следующие клинические стадии истинной полицитемии:

1. Начальная – стадия благополучия, незначительный эритроцитоз, умеренный лейкоцитоз в периферической крови, диагноз истинной полицитемии ставится редко. Может длиться до 5 лет.

2а. Эритремическая стадия без миелоидной метаплазии селезенки – панцитоз в периферической крови с незначительным палочкоядерным сдвигом, без нарушения морфологии клеток, в костном мозге – панмиелоз, селезенка увеличена, уменьшается в размерах после кровопускания.

2б. Эритремическая стадия с миелоидной метаплазией селезенки – в периферической крови панцитоз, в лейкоцитарной формуле наблюдается сдвиг влево до миелоцитов, промиелоцитов, фрагменты мегакариоцитов, нормобласты, дегенеративные изменения в клетках, в костном мозге – панмиелоз, селезенка увеличена в размерах не сокращается после кровопускания.

3. Терминальная стадия, которая может развиваться по типу:

- угнетения всех ростков кроветворения до панцитопении;
- трансформации в бластный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз без Ph-хромосомы;
- миелофиброза (разрастание соединительной ткани костного мозга).

Диагностика

Картина периферической крови

В периферической крови наблюдается панцитоз: увеличение эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов. Уровень гемоглобина достигает 180-220г/л, выраженный эритроцитоз – $8-15 \times 10^{12}$ /л, цветовой показатель в пределах нормальных значений, количество ретикулоцитов в норме или повышено. Отмечается

умеренный лейкоцитоз - $10-12 \times 10^9/\text{л}$, лейкоцитарная формула с нейтрофильным сдвигом влево за счет палочкоядерных нейтрофилов (до 8-10%), позже может быть сдвиг до миелоцитов и промиелоцитов, увеличение базофилов, эозинофилов, нормобластов, появление фрагментов мегакариоцитов. Наблюдается умеренный тромбоцитоз $500-600 \times 10^9/\text{л}$. Характерно замедление СОЭ вплоть до 0, увеличение вязкости крови.

При цитохимическом исследовании отмечается высокая активность щелочной фосфатазы в нейтрофилах.

При биохимическом исследовании крови наблюдается увеличение количества мочевой кислоты, гистамина, витамина В12, аланинаминотрансферазы, билирубина, снижение уровня эритропоэтина.

Картина костного мозга

Различают несколько морфологических вариантов истинной полицитемии в зависимости от степени гиперплазии ростков кроветворения (по данным Fish диагностики):

- классический вариант: панмиелоз с тотальной гиперплазией всех трех ростков кроветворения;
- вариант с гиперплазией эритроидного и гранулоцитарного ростков, небольшой гиперплазией мегакариоцитарного ростка;
- вариант гиперплазии эритроидного и мегакариоцитарного ростков;
- пролиферация одного эритроидного ростка.

Трепанобиопсия

При гистологическом исследовании биоптата наблюдается исчезновение жировой ткани, истончение костных балок, гиперплазия эритроидного ростка, увеличение количества мегакариоцитов, часто гигантских, с расширенными дольчатыми ядрами, увеличение эозинофилов и базофилов.

В *моче* выявляется повышенное содержание мочевой кислоты (гиперурикурия), протеинурия.

Диагностические критерии истинной полицитемии (ВОЗ, 2008)

Большие критерии:

1. Гемоглобин более 185 г/л для мужчин и более 165 г/л для женщин или увеличение массы циркулирующих эритроцитов более 25 % от нормы.
2. Присутствие мутации JAK2 V617F.

Малые критерии:

1. Трепан гипперклеточный за счет клеток эритроидного, гранулоцитарного или мегакариоцитарного ростка (панмиелоз).
2. Эритропоэтин в сыворотке крови ниже нормальных значений.
3. Эндогенный рост колоний эритроидных клеток *in vitro*.

Первичный миелофиброз

Первичный миелофиброз (сублейкемический миелоз) относится к хроническим миелопролиферативным неоплазиям клоновой природы с опухолевой пролиферацией преимущественно гранулоцитарного и мегакариоцитарного ростков кроветворения и развитием фиброза и экстрамедуллярного кроветворения.

Эпидемиология

Заболеваемость составляет 0,7 у мужчин, 0,4 у женщин на 100 000 населения в год, чаще болеют мужчины в возрасте старше 50 лет.

Патогенез

В патогенезе доминирующей причиной является неуправляемая клоновая пролиферация клеток-предшественников миелопозза в сторону мегакариоцитопозза с повышенной продукцией последними факторов роста – фактора-бета и эпидермального ростового фактора (BGF), стимулирующих синтез коллагена и рост фибробластов. Повышенный синтез цитокинов – макрофагального (КСФ-1) и гранулоцитарно-макрофагального (ГМ-КСФ) колониестимулирующих факторов обуславливает прогрессирование

миелоидной пролиферации и ее экстрамедуллярное распространение.

Клиника

Течение опухолевого процесса медленное, латентное. Длительное время без клинических проявлений и жалоб. Единственным симптомом сублейкемического миелоза в течение длительного времени, может быть, увеличение селезенки, несколько реже – гепатомегалия (примерно у 40% пациентов). Позже присоединяется слабость, потеря веса, тромбгеморрагические осложнения, ДВС - синдром, кровотечения, нарушение функции желудочно-кишечного тракта, аутоиммунные осложнения и другие. Внекостномозговое кроветворение может быть обнаружено в лимфатических узлах, почках, коже, желудочно-кишечном тракте, плевре и других тканях. Прогрессирование заболевания сопровождается нарастанием симптомов анемии, размеров селезенки и изменением показателей крови и костного мозга. Для первичного миелофиброза характерно стадийное течение, различают следующие стадии развития сублейкемического миелоза:

- пролиферативная (ранняя, префибротическая);
- фибротическая (фибротически-склеротическая);
- трансформация в острый лейкоз.

Диагностика

Картина периферической крови

Со стороны периферической крови вначале наблюдается некоторое увеличение эритроцитов, уровень гемоглобина в пределах нормальных значений, в дальнейшем развивается анемия с характерным пойкилоцитозом – эритроциты в виде капель («капли слез») – дакриоциты, нормобластоз, выход в периферическое русло эритрокариоцитов. Анемия может быть обусловлена аутоиммунными нарушениями, повышенным разрушением эритроцитов в селезенке (гиперспленизм), развитием миелофиброза и остеосклероза костного мозга, которые способствуют уменьшению объема эритропоэтической ткани и другими причинами.

Со стороны белой крови наблюдается умеренный лейкоцитоз $12-16 \times 10^9/\text{л}$ (в течение многих лет может быть одна и та же цифра), в лейкоцитарной формуле наблюдается нейтрофильный сдвиг влево до миелоцитов, промиелоцитов, увеличение эозинофилов, базофилов. Со стороны тромбоцитов может быть тромбоцитоз $600-1000 \times 10^9/\text{л}$, большое количество в периферической крови фрагментов мегакариоцитов, макроформ тромбоцитов. Однако при прогрессировании заболевания может наблюдаться тромбоцитопения, обусловленная разрушением тромбоцитов в селезенке, аутоиммунными процессами. Тромбоциты при первичном миелофиброзе в функциональном отношении неполноценны – наблюдается нарушение ретракции кровяного сгустка, адгезивности тромбоцитов, удлинение времени кровотечения.

Скорость оседания эритроцитов соответственно случаю.

При биохимическом исследовании наблюдается повышение в сыворотке крови мочевой кислоты, общего билирубина, активности лактатдегидрогеназы, аланинаминотрансферазы,

Цитохимическое исследование позволяет обнаружить резкое увеличение активности щелочной фосфатазы в нейтрофилах.

Иммунологическое исследование. Иммунологические нарушения у пациентов с первичным миелофиброзом проявляются появлением антинуклеарных антител, снижением содержания комплемента, увеличением количества циркулирующих в крови иммунных комплексов, наличием положительной пробы Кумбса.

При иммунофенотипировании обнаруживается 200 кратное увеличение циркулирующих в периферической крови клеток маркеров дифференцировки стволовых гемопоэтических клеток (CD 34).

Картина костного мозга

Картина костного мозга в префибротическую стадию характеризуется гиперклеточностью, пролиферацией гранулоцитов, мегакариоцитов и сужением эритроидного ростка, полиморфизмом и атипией мегакариоцитов. При выраженном фиброзе пункция костного мозга зачастую может быть

неудачной: сухой или с получением скудного пунктата с низким содержанием миелокариоцитов.

Трепанобиопсия

С помощью трепанобиопсии была выявлена стадийность патоморфологического процесса при первичном миелофиброзе.

1. Первая стадия – клеточно-пролиферативная характеризуется неравномерной пролиферацией двух-трех ростков кроветворения, особенно отчетливо заметна гиперплазия мегакариоцитарного и гранулоцитарного ростков. Ретикулиновая строма гиперплазирована, волокна утолщены и расположены беспорядочно.

2. Во второй стадии появляются признаки миелофиброза, так как мегакариоциты и тромбоциты вырабатывают много факторов роста для мезенхимальных и эндотелиальных клеток костного мозга и соответственно стимулируют образование коллагеновых и эластических волокон. Вначале миелофиброз носит очаговый характер, затем – диффузный.

3. В третьей стадии нарушается соотношение между гемопоэтическими стволовыми клетками и клетками стромы, уменьшение гемопоэтических клеток приводит к развитию миелофиброза, остеосклероза костного мозга, увеличению числа трабекул. Это сопровождается сужением костномозговых полостей и уменьшением объема деятельного костного мозга.

4. Дисрегуляция клеточного микроокружения гемопоэтических стволовых клеток способствует мобилизации клеток патологического клона из костного мозга в периферическую кровь, различные органы и ткани с развитием миелоидной метаплазии и в первую очередь – селезенки.

Диагностические критерии (ВОЗ, 2008) основываются на данных гистологического исследования трепанобиопсии и результатах молекулярно-биологических исследований и включают:

А. Три больших критерия:

1. Пролиферация и атипия мегакариоцитов в сочетании с ретикулиновым и/или коллагеновым фиброзом (атипия заключается в вариабельности размеров клеток и ядерно-цитоплазматического отношения, гиперхромазии и разнообразия форм ядер).

2. Отсутствие признаков других миелоидных неоплазий.
3. Наличие JAK2V617F или других клональных маркеров, при их отсутствии доказательство первичности фиброза.

Б. Четыре малых критерия:

1. Лейкоэритробластическая картина периферической крови (умеренный нейтрофильный лейкоцитоз, палочкоядерный сдвиг, единичные мета- и миелоциты, эритрокарициты, каплевидные эритроциты (дакрициты)).

2. Анемия.

3. Повышение активности лактатдегидрогеназы.

4. Спленомегалия.

Обнаружение в крови и/или костном мозге от 10 до 19% бластов свидетельствует о переходе ПМФ в прогрессирующую фазу, более 20% - о трансформации в бластный криз. Иногда вследствие фиброза и остеосклероза костного мозга, заболевание завершается развитием аплазии костного мозга, которая сопровождается панцитопенией.

Эссенциальная тромбоцитемия – заболевание, которое относится к хроническим миелопролиферативным неоплазиям клоновой природы, характеризующееся повышенной пролиферацией мегакариоцитов, образованием патологических тромбоцитов и персистирующим тромбоцитозом. Болеют чаще пожилые люди, но может встречаться и в молодом возрасте.

Этиология. Патогенез

Каких-то специфических хромосомных аномалий при эссенциальной тромбоцитемии не выявлено, у 50% пациентов выявляется маркер клональности заболевания JAK2 V617F, что является убедительным признаком отличия от реактивного тромбоцитоза, миелодиспластического синдрома. Наблюдается дефект связывания тромбопоэтина с мегакариоцитами и тромбоцитами и увеличение свободного тромбопоэтина в плазме, а также повышенная чувствительность мегакариоцитов к тромбопоэтину, что приводит к усиленной их пролиферации.

Клиника

Клиническая картина характеризуется постепенным увеличением селезенки по мере прогрессирования заболевания, нарастающей анемией.

Для эссенциальной тромбоцитемии характерно нарушение микроциркуляции (акроцианоз, кожный зуд, парестезии, нарушение мозгового кровообращения, эритромелалгии, стенокардия, преходящие нарушения зрения), тромбозы артерий и вен, тромбоэмболические осложнения, геморрагический синдром.

Диагностика

Картина периферической крови

В периферической крови наблюдается умеренно выраженная анемия (гемоглобин в пределах 90-120 г/л), в периферическом русле могут быть нормобласты. Отмечается умеренный лейкоцитоз, в лейкоцитарной формуле может быть сдвиг лейкоцитарной формулы влево, базофилия, эозинофилия. Тромбоцитоз ($500-1500 \times 10^9/\text{л}$ и более), анизоцитоз тромбоцитов проявляется появлением гигантских, уродливых форм с псевдоподиями, гипогранулярных тромбоцитов, увеличением показателей объема тромбоцитов и анизоцитоза – MPV, PDW.

Из функциональных тестов наиболее характерно нарушение агрегационной способности тромбоцитов в ответ на индукцию адреналином на фоне общей повышенной способности к агрегации.

При цитогенетическом исследовании у 70% нейтрофилов активность щелочной фосфатазы нормальная, у 10% – низкая.

Биохимическое исследование сыворотки крови выявляет повышение активности лактатдегидрогеназы, уровня мочевой кислоты.

Картина костного мозга

В костном мозге наблюдается гиперклеточность, с трехростковой гиперплазией, более выраженная со стороны мегакариоцитарного ростка, сокращение жировой ткани. Отмечается морфологическая гетерогенность клеток мегакариоцитарного ростка – наличие гигантских мегакариоцитов с многолопастными множественными ядрами без

признаков атипичии, возможно наличие микроформ мегакариоцитов.

Критерии диагностики эссенциальной тромбоцитемии (ВОЗ, 2008)

- 1) постоянное количество тромбоцитов в периферической крови более $450 \times 10^9/\text{л}$;
- 2) в трепане пролиферация преимущественно мегакариоцитарной линии с увеличением количества крупных зрелых многоядерных мегакариоцитов, расположенных в синусах, в то время как эритроидный и гранулоцитарный ростки не изменены, отсутствует гиперклеточность и левый сдвиг гранулоцитов;
- 3) отсутствие критериев других миелоидных новообразований;
- 4) наличие JAK2 V617F или других клональных маркеров, или при отсутствии мутации JAK2 V617F – отсутствие доказательства развития реактивного тромбоцитоза.

Лабораторная диагностика хронических лимфопролиферативных неоплазий

Хронические лимфопролиферативные заболевания – это группа клональных неопластических заболеваний из лимфоидных клеток с повышенной пролиферацией В-, Т- лимфоцитов, НК-клеток на разных уровнях их дифференцировки. В зависимости от места возникновения лимфопролиферативные заболевания разделяются на две большие группы: хронические лимфоидные лейкозы и злокачественные лимфомы, имеющие первоначальную внекостномозговую локализацию (лимфатические узлы, селезенка и т.д.), в отличие от лейкозов (см. CD-диск). В настоящее время, независимо от того, поражается ли первоначально костный мозг, или опухолевый процесс имеет нодальную или экстранодальную локализацию с последующим вовлечением в процесс костного мозга и/или периферической крови, признается биологическое единство опухолей из клеток-предшественников (острый лимфобластный лейкоз и лимфобластная лимфома) и зрелых В-клеток (хронический

лифолейкоз и В-клеточная лимфома из малых лимфоцитов). Это позволяет рассматривать их как стадии одного и того же процесса.

В соответствии с критериями, предложенными Всемирной Организацией Здравоохранения, при верификации диагноза обязательным является установление линейной принадлежности опухолевых лимфоидных клеток (Т или В) и степени их дифференцировки (предшественники или зрелые клетки)

Диагностика лимфопролиферативных неоплазий включает:

- выявление морфологического субстрата опухоли;
- определение иммунофенотипа опухолевых клеток (иммуногистохимия, проточная цитофлюориметрия);
- установление степени распространенности опухоли (стадии заболевания);
- выявление молекулярно-генетических изменений.

Классификация лимфоидных опухолей (ВОЗ, 2008)

Все лимфомы делятся на две большие категории: лимфома Ходжкина (ЛХ) и неходжкинские лимфомы (НХЛ).

В-КЛЕТОЧНЫЕ ОПУХОЛИ

1. Из предшественников В-клеток:

- В-лимфобластный лейкоз/лимфома;
- В-лимфобластный лейкоз/лимфома с повторяющимися генетическими аномалиями.

2. Из периферических (зрелых) В-клеток:

- Хронический лимфоцитарный лейкоз/ лимфома из малых лимфоцитов
 - Пролимфоцитарный лейкоз
 - Лимфоплазмочитарная лимфома
 - Лимфома из клеток мантии
 - Фолликулярная лимфома
 - Первичная кожная лимфома фолликулярного центра
 - Лимфома маргинальной зоны селезенки
 - Волосатоклеточный лейкоз
 - Лимфома/лейкоз селезенки, неклассифицированная
 - Болезни тяжелых цепей
 - Плазмноклеточные опухоли

- Экстранодальная лимфома маргинальной зоны
- Нодальная лимфома маргинальной зоны
- Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома
- Первичная крупноклеточная В-клеточная лимфома ЦНС
- Первичная кожная диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома
- ВЭБ-позитивная диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома пожилых
- Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, ассоциированная с хроническим воспалением
- Т-клеточная, /богатая гистиоцитами крупноклеточная В-лимфома
- Медиастинальная крупноклеточная В-клеточная лимфома
- внутрисосудистая крупноклеточная В-клеточная лимфома
- АЛК - позитивная крупноклеточная В-клеточная лимфома
- Плазмобластная лимфома
- Крупноклеточная В-клеточная лимфома из болезни Кастельмана
- Первичная лимфома серозных полостей
- Лимфома Беркитта.

3. В-клеточные пролиферации с неясным злокачественным потенциалом

- Лимфоматоидный гранулематоз.

Т- И НК-КЛЕТОЧНЫЕ ОПУХОЛИ

1. Из предшественников Т-клеток:

- Т-лимфобластный лейкоз/лимфома из предшественников Т-клеток
- Бластная НК- клеточная лимфома.

2. Т-клеточные и НК-клеточные из периферических (зрелых) клеток:

- Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз
- Т-клеточный лейкоз из крупных гранулярных лимфоцитов
- Агрессивный НК- клеточный лейкоз
- Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых
- Хроническое лимфопролиферативное заболевание из НК-клеток
- Грибовидный микоз
- Синдром Сезари

- Первичная кожная крупноклеточная анапластическая лимфома
- Лимфоматоидный папулез
- Экстранодальная НК/Т- клеточная лимфома, назальный тип
- Т-клеточная лимфома, ассоциированная с энтеропатией
- Гепатолиенальная Т-клеточная лимфома
- Подкожная панникулитоподобная Т-клеточная лимфома
- Ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома
- Анапластическая крупноклеточная лимфома АЛК-позитивная
- Анапластическая крупноклеточная лимфома АЛК-негативная
- Анапластическая крупноклеточная лимфома.
- ВЭБ–Т-лимфопролиферативные заболевания у детей:
- Первичная Т-клеточная лимфома NOS
- Первичные кожные CD 30-позитивные Т-лимфопролиферативные заболевания.

Эпидемиология

Хронические лимфопролиферативные заболевания наиболее часто встречаются у мужчин в возрасте старше 60 лет, пик заболеваемости приходится на 80-85 лет. С 1973 г. заболеваемость возросла более чем на 80%. Рост заболеваемости связывают с расширением диагностических возможностей, ухудшением экологии, увеличением продолжительности жизни и старением населения, определенный вклад внесла эпидемия СПИДа.

Этиология. Патогенез

1. Генетическая предрасположенность, частота развития хронического лимфолейкоза у родственников больных в 3 раза, а злокачественных лимфом в 10 раз выше по сравнению с общей популяцией.

2. Генетические заболевания (например, атаксия-телангиэктазия – аутосомно-рецессивное системное нарушение, при котором риск развития лимфомы увеличен более чем в 250 раз по сравнению с общей популяцией). Мутированный ген атаксии-телангиэктазии локализован на 11 хромосоме.

3. Возраст (чем старше, тем выше риск развития ХЛПН).

4. Наследственные и приобретенные иммунодефицитные заболевания.

5. аутоиммунные заболевания (ревматоидный артрит, системная красная волчанка, тиреоидит Хашимото и т.д.).

6. Вирусные инфекции (вирус Эпштейна-Барра ассоциированный с лимфомой Беркитта, человеческий Т-клеточный лимфотропный вирус, герпес-вирус, вирус гепатита С).

7. Хронические бактериальные инфекции (например, колонизация *H. pylori* приводит к хронической антигенной стимуляции и гастриту, а в последующем – к развитию злокачественного В-клеточного клона).

Благодаря развитию молекулярной биологии и появлению полимеразной цепной реакции, флуоресцентной гибридизации *in situ*, иммунофенотипирования и других методов диагностики, удалось выяснить, что происхождение лимфом тесно связано с процессом созревания лимфоцитов в норме. Современные молекулярно-генетические технологии позволяют достаточно точно охарактеризовать гены варибельного участка иммуноглобулина В-клеточных лимфом человека и определить, на каком этапе созревания В-лимфоцитов произошли генетические поломки, приведшие к клональному росту. Генетические поломки, вовлеченные в патогенез НХЛ, могут приводить: а) к активации протоонкогенов (BCL-1, BCL-2, BCL-6, C-MYC); б) к инаktivации генов-супрессоров опухоли (p53), нарушению дифференцировки клеток и появлению опухолевого клона, сохраняющего набор антигенов нормальной лимфоидной клетки.

Молекулярная генетика Т-клеточных лимфом изучена меньше, чем В-клеточных. Причинами этого является их большая гетерогенность и меньшая встречаемость. Исключением является анапластическая крупноклеточная лимфома (АККЛ) или Ki-1 лимфома, которая распознается по характерной морфологии и наличию CD 30 антигена. Типичной мутацией для АККЛ является транслокация t (2; 5), в результате которой появляется новый слитный ген нуклеофосмин/анапластическая лимфомная киназа (NPM/ALK). Нуклеофосмин – промотор активности ALK-

белка (в норме не встречается), тогда как ALK-ген кодирует новую тирозинкиназу.

Хронический лимфолейкоз

Согласно классификации ВОЗ (2001 г.), хронический лимфолейкоз относится к опухолям лимфоидной ткани, с развитием патологического процесса на уровне клеток-предшественников В- и, реже Т-лимфоцитов. Заболевание проявляется прогрессирующим накоплением в костном мозге, периферической крови, а затем и в других тканях организма большого количества относительно зрелых, долгоживущих, слабопролиферирующих В- и, крайне редко Т-лимфоцитов. В большинстве случаев опухолевая трансформация происходит на уровне наивных В-лимфоцитов с последующим блоком в их дальнейшей дифференцировке, реже встречается В-ХЛЛ с опухолевой трансформацией клеток памяти В-лимфоцитов.

Морфологическим субстратом опухоли являются относительно зрелые, но не прошедшие всех стадий дифференцировки слабопролиферирующие В - лимфоциты. В основе феномена долгожительства В-лимфоцитов, предположительно лежит нарушение апоптоза лимфоцитов на одном из этапов неполноценной дифференцировки. Ключевую роль в этом процессе играет специальный белок-регулятор апоптоза - BCL-2, концентрация которого в лейкозных лимфоцитах увеличена. Цитокины, секретируемые опухолевыми клетками (ИЛ-8, TNF- альфа), а также ИЛ-2, продуцируемый Т-лимфоцитами, способствует пролиферации и выживанию клеток ХЛЛ. Временно непролиферирующие лейкозные лимфоциты при В-клеточном хроническом лимфолейкозе остановлены в G₀-фазе клеточного цикла, т.е. являются покоящимися. Вместе с тем лейкозные клетки несут на поверхности помимо характерных для зрелых В-лимфоцитов маркеров дифференцировки CD 19; CD 20 и активационные маркеры дифференцировки – CD 5, CD 23, CD 27. Это говорит об асинхронности между положением опухолевых клеток в клеточном цикле и их фенотипом, который характеризуется набором активационных антигенов. Поэтому В-ХЛЛ можно отнести к новообразованиям кроветворной ткани,

субстрат которых представлен первично-активированными В-лимфоцитами.

Цитогенетический анализ с помощью, используемой в настоящее время FISH-методики, выявляет аномалии в 80% случаев. Наиболее частыми цитогенетическими отклонениями при В-ХЛЛ являются аномалии в 12; 13; 14 хромосомах, гиперэкспрессия гена BCL-2, играющего главную роль в предотвращении апоптоза (уровень экспрессии нарастает по мере прогрессирования заболевания). Так, например, делеция 13q выявляется в 55% случаев и характеризуется доброкачественным течением заболевания с обычной продолжительностью жизни у пациентов; трисомия 12 наблюдается в 16% случаев и связана с атипичной морфологией и неблагоприятным исходом; делеция 11q 23 выявляется в 18% случаев и ассоциирована с массивной лимфоаденопатией и агрессивным течением заболевания.

К наиболее частым маркерам хронического лимфолейкоза относится также делеция Xp11q и Xp17p (локализация гена - супрессора опухолевого роста p53). Для лимфоцитов при В-клеточном хроническом лимфолейкозе характерна низкая экспрессия поверхностных иммуноглобулинов, наличие одного класса легких и тяжелых цепей поверхностных иммуноглобулинов с одним фенотипом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (в норме обнаруживаются два фенотипа фермента), а для Т-клеточного – гомогенная плотность поверхностных иммуноглобулинов на лейкозных клетках (в норме она вариабельна). Особенности поверхностных иммуноглобулинов и в первом и во втором случае указывают на происхождение опухолевых клеток из одной клетки-предшественницы, т.е. на клоновый характер как В-, так и Т-клеточного хронического лимфолейкоза. Образовавшийся патологический клон клеток развивается по законам опухолевой прогрессии.

Лимфоциты при хроническом лимфолейкозе являются функционально неполноценными. У В-лимфоцитов наблюдается неполноценная реакция на антиген, отмечается неспособность В-лимфоцитов вступать в митоз и далее трансформироваться в иммуноглобулин-секретирующие плазмциты. В силу отмеченных выше изменений для ХЛЛ характерны

гипогаммаглобулинемия и различные иммунные и инфекционные осложнения. Важной особенностью ХЛЛ является развитие аутоиммунного процесса против собственных гемопоэтических клеток с развитием гемолитических анемий, аутоиммунных тромбоцитопений и, реже – аутоиммунных гранулоцитопений, парциальной красноклеточной аплазии.

Эпидемиология

ХЛЛ составляет около 40% от всех лейкозов у лиц старше 65 лет. Ежегодная заболеваемость составляет 3-3,5 на 100 000 населения в год, мужчины болеют в 2 раза чаще, чем женщины. Хронический лимфолейкоз в 95% случаев в Европе и США имеет В-клеточный фенотип и в 5% случаев – Т-клеточный.

Клиника

Хронический лимфолейкоз развивается медленно. Первым проявлением заболевания может быть лимфаденопатия. Наблюдается увеличение лимфотических узлов одной или нескольких областей (подчелюстные, шейные, подмышечные, паховые, селезенки и/или печени и др.) размерами от 1,5 до 5-6 см, мягкой консистенции, безболезненные. В дальнейшем увеличивается в размерах печень, селезенка. В настоящее время для облегчения диагностики ХЛЛ используют две взаимодополняющих классификации, в которых используется принцип стадийности течения ХЛЛ, учитывается степень риска прогрессирования лейкоза, оценивается опухолевая масса. Кроме того, классификации учитывают факт наличия или отсутствия анемии и тромбоцитопении. Обе классификации позволяют сформулировать прогноз заболевания и ориентируют на выбор наиболее эффективной терапии (табл. 12).

Таблица 12. – Клиническая классификация ХЛЛ по Rai (1975 г.)

Стадия	Характеристика
0	Лимфоцитоз в периферической крови и костном мозге
I	Лимфоцитоз и лимфоаденопатия
II	Лимфоцитоз, спленомегалия и/или гепатомегалия с увеличением или без увеличения размеров лимфоузлов
III	Лимфоцитоз и анемия (гемоглобин менее 110г/л) с увеличением или без увеличения размеров лимфоузлов, селезенки и печени
IV	Лимфоцитоз и тромбоцитопения (тромбоциты менее 100×10^9 /л с увеличением или без увеличения размеров лимфоузлов, селезенки и печени

Таблица 13. – Клиническая классификация ХЛЛ по Binet (1981 г.)

Стадии	Характеристики
A	Лимфоцитоз гемоглобин более 100г/л тромбоциты более 100×10^9 /л вовлечение менее трех областей лимфоидной ткани (одно- или двусторонние)
B	Лимфоцитоз гемоглобин более 100г/л тромбоциты более 100×10^9 /л вовлечение более трех областей лимфоидной ткани, гепато- или спленомегалия
C	Лимфоцитоз гемоглобин менее 100г/л тромбоциты менее 100×10^9 /л вовлечение любого количества областей лимфоидной ткани

Диагностика

Картина периферической крови

В периферической крови со стороны красной крови вначале заболевания никаких изменений нет – количество гемоглобина, эритроцитов в пределах референтных величин. Затем развивается анемия, которая обычно имеет гемолитический характер.

Со стороны лейкоцитов – постепенно нарастающий лейкоцитоз, имеет место относительная или абсолютная нейтропения, абсолютный лимфоцитоз – от 45 до 90-95%

лимфоцитов, преобладают зрелые лимфоциты, пролимфоциты составляют не более 10%, могут быть единичные в препарате лимфобласты, а также выявляются тени Гумпрехта - полуразрушенные ядра лимфоцитов. Клетки, составляющие основу опухолевого субстрата – морфологически зрелые В-лимфоциты небольших размеров (7-10 мкм), с округлым ядром, имеющим плотную глыбчатую структуру хроматина без ядрышек, с узкой базофильной цитоплазмой. Количество тромбоцитов вначале нормальное затем наблюдается тромбоцитопения.

Картина костного мозга

Костный мозг в зависимости от стадии может быть нормо- или гиперклеточный. Уже на ранних стадиях заболевания в миелограмме обнаруживается повышение уровня лимфоцитов (30% и более) с постепенным нарастанием, несколько больше пролимфоцитов, чем в периферической крови, наличие теней Гумпрехта, могут быть лимфобласты.

Трепанобиопсия

При гистологическом исследовании трепанобиоптата у более 50% больных обнаруживается диффузная инфильтрация костного мозга малыми лимфоцитами (лимфобласты и пролимфоциты на начальных этапах заболевания составляют в сумме менее 10% всех клеток), снижение объема жировой ткани. У остальных больных инфильтрация носит нодулярный, интерстициальный или смешанный характер.

Иммунофенотипирование опухолевых клеток выявляет экспрессию В-клеточных антигенов – CD 19, CD20, CD22, CD23, CD5, слабую экспрессию поверхностных IgM или IGM+IgD, рестрикцию легких цепей

(каппа и лямбда), вариабельность активационных антигенов.

Цитогенетические исследования выявляют мутации в 11; 12; 13; 14, 17 хромосомах. Приблизительно в 1/3 случаев обнаруживается дополнительная хромосома 12 (трисомия 12), у 25% пациентов определяются структурные нарушения в 13 хромосоме и другие аномалии.

В-ПРОЛИМФОЦИТАРНЫЙ ЛЕЙКОЗ

Составляет 1% от всех лимфатических опухолей, чаще болеют люди пожилого возраста, средний возраст – 70 лет. Течение заболевания агрессивное, с выраженной спленомегалией, незначительным увеличением периферических лимфатических узлов.

В периферической крови наблюдается анемия, тромбоцитопения, быстро нарастающий лейкоцитоз – количество лейкоцитов может быть более $100 \times 10^9/\text{л}$. В лейкоцитарной формуле пролимфоциты составляют более 55% – это клетки среднего размера с округлым ядром, умеренно конденсированной структурой хроматина, чаще с одной нуклеолой и относительно небольшой цитоплазмой, имеющей различную степень базофилии.

В костном мозге отмечается диффузная лимфоидная инфильтрация пролимфоцитами.

При иммунофенотипировании выявляются В-клеточные антигены CD 19, CD20, CD22, CD5, CD 79a и b, FMC7; CD23 отсутствует, выявляется экспрессия иммуноглобулинов класса IGM+/-IgD.

У пациентов с В-пролимфоцитарным лейкозом при цитогенетическом исследовании наиболее часто выявляется хромосомная аномалия - делеция 14q, реже транслокация t(11;14), трисомия 12.

ВОЛОСАТОКЛЕТОЧНЫЙ ЛЕЙКОЗ

Составляет 2% от всех лимфоидных лейкозов. Встречается в возрасте от 25 до 75 лет, чаще у мужчин.

Различают классическую и вариантную формы волосатоклеточного лейкоза. При классическом варианте характерно вялотекущее незаметное течение, спленомегалия и панцитопения. Значительно реже встречаются гепатомегалия, лимфоаденопатия. По мере прогрессирования заболевания у пациентов отмечается анемический, геморрагический, синдром аутоиммунных нарушений. Примерно у 25% пациентов на первый план в клинической картине выступают инфекционные осложнения

В периферической крови наблюдается панцитопения или двухростковая цитопения (лейкопения, анемия и\или тромбоцитопения), может быть сублейкемический лейкоцитоз. В лейкоцитарной формуле – абсолютный лимфоцитоз, нейтропения (до агранулоцитоза), моноцитопения. Среди лимфоцитов обнаруживают от 2 до 90% и более «волосатых» клеток. Опухолевые клетки – клетки средних размеров, с округлым или бобовидным ядром, имеющим сглаженную гомогенную структуру хроматина, неотчетливые нуклеолы (или они отсутствуют). Цитоплазма клеток ВКЛ светло-голубая обильная с характерными выростами.

При биохимическом исследовании отмечается гипергаммаглобулинемия в отличие от ХЛЛ.

Для «волосатых» клеток характерна диффузно-гранулярная реакция на кислую фосфатазу, не подавляемую тартратом натрия при проведении цитохимического исследования.

В костном мозге отмечается нормо- или гиперклеточность за счет диффузной лимфоидной инфильтрации, количество «волосатых» клеток варьирует от 8 до 60%.

При иммунофенотипировании на опухолевых клетках выявляют экспрессию В-клеточных антигенов: CD19; CD20; CD22; CD79альфа; моноцитарный антиген CD11c и наиболее характерный антиген - CD103, на мембране отсутствуют антигены CD5; CD23.

Для вариантной формы волосатоклеточного лейкоза характерно увеличение количества лейкоцитов более $50 \times 10^9/\text{л}$, отсутствие антигенов CD25; CD103. По морфологическим характеристикам «волосатые» клетки менее зрелые, содержат в ядре нуклеолы и напоминают пролимфоциты, реакция на тартратрезистентную кислую фосфатазу отрицательная.

Т-КЛЕТОЧНЫЙ ЛЕЙКОЗ ИЗ БОЛЬШИХ ГРАНУЛИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Встречается 2-5% от всех Т-НК-клеточных опухолей. Болезнь одинаково часто встречается как у мужчин, так и у женщин, чаще пожилых. Средний возраст на момент установления диагноза составляет 60 лет.

Предполагают, что в развитии заболевания играет роль длительная антигенная стимуляция аутоантигенами и чужеродными антигенами, которая приводит к постоянному раздражению CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов соответствующей специфичности и избыточной пролиферации клеток одного клона. Т-клеточный лейкоз из больших гранулированных лимфоцитов часто сочетается с аутоиммунными заболеваниями. Характерным является длительный лимфоцитоз (более 6 месяцев) без видимой причины за счет наличия больших лимфоцитов, содержащих в цитоплазме крупные красно-фиолетовые гранулы. Течение заболевания доброкачественное, для клинической картины свойственны рецидивирующие бактериальные инфекции, симптомы ревматоидного артрита, увеличение селезенки и поликлональная гипергаммаглобулинемия.

В периферической крови наблюдается умеренная анемия. Со стороны лейкоцитарной формулы отмечается нейтропения, у 45% пациентов она носит тяжелый характер – менее $0,5 \times 10^9/\text{л}$, абсолютный лимфоцитоз на фоне нормального или сниженного количества лейкоцитов. Среди лимфоцитов преобладают большие гранулярные лимфоциты. Большие гранулярные лимфоциты имеют размеры 12-15 мкм в диаметре, округлое или слегка овальное ядро, расположенное эксцентрично, с конденсированной структурой хроматина, без нуклеол, с широкой светлой цитоплазмой, содержащей крупные плотные или нежные азурофильные гранулы. В норме в периферической крови содержится $0,2-0,4 \times 10^9/\text{л}$ больших гранулированных лимфоцитов. Со стороны тромбоцитарного ростка – тромбоцитопения – количество тромбоцитов менее $150,0 \times 10^9/\text{л}$.

Исследование костного мозга может иметь значение в том случае, когда опухолевая популяция в крови очень мала. Несмотря на глубокую нейтропению, при Т-клеточном лейкозе из больших гранулярных лимфоцитов, в миелограмме может быть увеличение клеток гранулоцитарного ряда со «сдвигом влево». Отмечается вариабельность количества лимфоидных клеток

Трепанобиопсия костного мозга выявляет незначительную лимфоидную инфильтрацию.

Для установления диагноза используют иммуногистохимическое исследование костного мозга, метод проточной цитофлюориметрии. В 80% случаев выявляется иммунофенотип опухолевых клеток: CD3+, CD4-, CD8+, слабую или отсутствие экспрессии CD7, CD5.

Критерии диагностики Т-клеточного лейкоза из больших гранулированных лимфоцитов (Т-ЛБГЛ):

Критерий А: стойкое увеличение числа Т-клеток с морфологией больших гранулированных лимфоцитов в крови.

Критерий В: экспрессия опухолевыми клетками типичного иммунофенотипа Т-ЛБГЛ, имеет значение экспансия популяции клеток с фенотипом CD3+, CD16+. В норме популяция клеток, экспрессирующих CD16+ составляет менее 5%

Критерий С: обнаружение клональных перестроек генов Т-клеточного рецептора с помощью ПЦР.

Критерий Д: клинические признаки – наличие спленомегалии и ревматоидного артрита, лабораторные – наличие цитопении.

Диагноз устанавливается при наличии трех критериев А, В, С. В том случае, когда популяция БГЛ мала (менее $0,5 \times 10^9/\text{л}$), необходимо провести исследование костного мозга. Инфильтрация костного мозга БГЛ подтверждает диагноз Т-ЛБГЛ.

При цитогенетическом исследовании у большинства пациентов с Т-клеточным ЛБГЛ выявляется нормальный кариотип.

ГРИБОВИДНЫЙ МИКОЗ/СИНДРОМ СЕЗАРИ (первичная Т-клеточная кожная лимфома)

Заболевание составляет 2-3% от всех злокачественных лимфом. Развивается медленно, характерным является инфильтрация кожи Т-лимфоцитами, на коже образуются зудящие бляшки, папулы, которые постепенно изъязвляются. Развивается эритродермия, сопровождаемая зудом и непереносимостью холода. Прогрессирование грибовидного микоза сопровождается лимфоаденопатией, поражением печени, легких, ЦНС. Заболевание вначале протекает локально как лимфома, а при выходе клеток в кровотоки наблюдается

лейкемизация лимфомы. Синдром Сезари рассматривается как лейкемический вариант заболевания, который характеризуется лимфоаденопатией, эритродермией и наличием в костном мозге и в периферической крови опухолевых Т-клеток с характерным расщеплением ядра и мозговидной, конвульсивной структурой хроматина, чаще без нуклеол, с узким ободком базофильной цитоплазмы.

Иммунофенотип опухолевых клеток имеет фенотип зрелых Т-лимфоцитов CD3, CD5, CD2, CD4, не выявляется экспрессия CD8, CD7, CD30.

Т-КЛЕТОЧНЫЙ ПРОЛИМФОЦИТАРНЫЙ ЛЕЙКОЗ

Заболевание встречается редко, чаще всего в пожилом возрасте. В клинической картине наблюдается генерализованная лимфоаденопатия, гепатоспленомегалия, поражение кожи в виде эритематозных, папулезных высыпаний. Течение заболевания агрессивное.

В периферической крови наблюдается анемия, лейкоцитоз. В лейкоцитарной формуле отмечается лимфоцитоз с преобладанием среди лимфоидных клеток пролимфоцитов – клеток среднего размера, с округлым или неправильной формы ядром, 1-2 нуклеолами, цитоплазмой, имеющей различную степень базофилии. Иногда клетки мелкие с плохо различимыми нуклеолами (мелкоклеточный вариант).

Иммунофенотип опухолевых клеток: CD3+, CD2+, CD4+, CD5+, CD7+, CD8-/±.

Цитогенетическими методами выявляется аномалия 14 хромосомы, транслокация t(14; 14).

АГРЕССИВНЫЙ НК-КЛЕТОЧНЫЙ ЛЕЙКОЗ

Заболевание имеет клоновую природу, характеризуется клональной пролиферацией НК-клеток. Чаще регистрируется в странах Азии у людей среднего возраста. В патогенезе предположительно играет роль вирус Эпштейна-Барра. Заболевание характеризуется агрессивным клиническим течением, поражением желудочно-кишечного тракта, наличием гепатоспленомегалии, лимфоаденопатии, лихорадки.

Заболевание может осложняться гемофагоцитарным синдромом, коагулопатиями, полиорганной недостаточностью.

В периферической крови регистрируется анемия, лейкоцитоз с абсолютным лимфоцитозом за счет больших гранулированных лимфоцитов.

В костном мозге наблюдается диффузная инфильтрация опухолевыми НК-клетками, имеющими морфологию больших гранулированных лимфоцитов. Встречаются реактивные гистиоциты с явлением гемофагоцитоза.

Иммунофенотип опухолевых клеток: CD2+ CD16+ CD56+, характерно отсутствие экспрессии CD3.

Цитогенетические методы у пациентов с агрессивным НК-клеточным лейкозом чаще всего выявляют делецию q 6.

ЛИМФОМА ХОДЖКИНА – ЛИМФОГРАНУЛЕМАТОЗ

Заболевание впервые описано английским врачом Томасом Ходжкиным в 1832 г. и на протяжении более чем столетия рассматривалось как хроническое воспалительное заболевание. Лимфома Ходжкина – первичное опухолевое заболевание лимфатической системы клоновой природы. Характеризуется гранулематозной гиперплазией лимфоидной ткани с наличием гигантских клеток Березовского - Штернберга (за рубежом их называют Рид-Штернберга), в которых была выявлена анеуплоидия и моноклональность, что подтверждает опухолевую природу заболевания. Наличие клеток Березовского-Штернберга является обязательным критерием для постановки диагноза лимфомы Ходжкина.

Эпидемиология

Заболеваемость лимфомой Ходжкина составляет 1,5-4,5 случая на 100 000 населения в год с преобладанием у мужчин, хотя в молодом возрасте чаще встречается у женщин, распределение по возрасту бимодальное – первый пик заболеваемости наблюдается в возрасте 15-30 лет, второй – после 50.

Этиология и патогенез заболевания до конца не изучены. Проведенные исследования показали высокую генетическую предрасположенность в возникновении заболевания.

В настоящее время основным этиологическим фактором, приводящим к возникновению лимфомы Ходжкина, предполагают, является вирус Эпштейна-Барра, так как отмечено возрастание заболеваемости лимфомой Ходжкина в 2-3 раза у пациентов с инфекционным мононуклеозом в анамнезе. Современные чувствительные методы, такие как FISH- методика, Саузерн-блот, ПЦР выявляют от 30 до 50% лимфом Ходжкина с содержанием ВЭБ-геномных фрагментов в клетках Березовского-Штернберга. Предполагают, что вирус Эпштейна-Барра вызывает генетическую нестабильность у предрасположенных пациентов, остается открытым вопрос о патогенезе ВЭБ-негативных лимфом Ходжкина, клиническая картина заболевания у которых не отличается от таковой у ВЭБ-позитивных пациентов.

Клетки Березовского-Штернберга-Рид в 80% случаев развиваются из зрелых, медленно пролиферирующих В-лимфоцитов зародышевого центра фолликулов лимфоузлов, в 20% случаев являются производными Т-клеточной линии цитотоксических лимфоцитов и предположительно могут быть дериватами натуральных киллеров. Предположительно опухолевые клетки появляются в результате блокирования апоптоза мутировавших В-лимфоцитов и как результат – образование клеток Ходжкина, Березовского-Штернберга-Рид, которые характеризуются отсутствием экспрессии иммуноглобулинов. Предполагают несколько механизмов блокирования апоптоза:

- в результате инфицирования вирусом Эпштейна-Барра;
- развитием дисфункции генов или медиаторов апоптоза (p53, BCL-2, MYC), возможно, в результате активации вирусом протоонкогена BCL-2, который блокирует апоптоз;
- блокирование индукции апоптоза через цитокиновые рецепторы CD 30, присутствующие на клетках Ходжкина и Березовского-Штернберга-Рид.

Клиника

К основным клиническим проявлениям заболевания относится увеличение лимфатических узлов. Лимфатические узлы имеют плотноэластическую консистенцию, вначале не

спаяны с кожей и друг с другом, безболезненные. В начале заболевания чаще поражаются правые и левые, надключичные и медиастинальные лимфоузлы (50-55%), реже лимфоузлы других зон, но в 90% случаев – это наддиафрагмальные лимфатические узлы. По мере прогрессирования заболевания лимфатические узлы срастаются, спаиваются и образуют конгломераты, за счет развития рубцовой ткани становятся плотными, инфильтрируют окружающие ткани, в процесс вовлекаются близлежащие, а затем и отдаленные лимфоузлы. В 80% случаев в процесс вовлекается селезенка. В целом клинические проявления заболевания зависят от локализации опухоли. Чаще других поражается ткань легких (20-30%), костная ткань (14-20%) и печень (10-12%). В момент диагностики у трети пациентов наблюдаются симптомы интоксикации – профузная ночная потливость, волнообразная лихорадка, слабость, кожный зуд.

По международной классификации различают стадии в зависимости от распространенности лимфогранулематозного процесса:

I стадия – локальная, при которой наблюдается поражение одной лимфоидной зоны или структуры, либо локализованное поражение одного экстралимфатического органа или ткани в пределах одного сегмента;

II стадия – регионарная, при которой наблюдается поражение двух и более областей по одну сторону диафрагмы либо локализованное поражение одного экстралимфатического органа или ткани с поражением или без регионарных лимфатических узлов, поражение других лимфоидных областей по ту же сторону диафрагмы (или без поражения);

III стадия – генерализованная, при которой наблюдается поражение лимфоузлов или структур по обе стороны диафрагмы; это поражение может сочетаться с локализованным поражением одного экстралимфатического органа или ткани, либо с поражением селезенки, либо с поражением того и другого;

III 1 стадия кодирует поражение верхних абдоминальных лимфатических узлов (ворота печени, селезенки), *III 2 стадия* – поражение нижних абдоминальных узлов (парааортальные, мезентериальные);

IV стадия – диссеминированная, при которой наблюдается поражение одного или нескольких экстралимфатических органов (с поражением лимфатических узлов, или без поражения), либо изолированное поражение экстралимфатического органа и отдаленных лимфатических узлов; наличие метастазов в печень или селезенку всегда ассоциируется с четвертой стадией.

В каждой стадии различают подгруппы в зависимости от наличия или отсутствия симптомов интоксикации:

А – симптомы интоксикации отсутствуют, заболевание протекает легче, прогноз благоприятный;

Б – симптомы интоксикации присутствуют:

- лихорадка более 38⁰С;

- профузная ночная потливость;

- наличие кожного зуда;

- снижение массы тела на 10% и более последние 6 месяцев.

Диагностика

При подозрении на лимфому Ходжкина пациент должен быть обследован по следующей схеме:

1. Тщательный сбор анамнеза с прицельным опросом на наличие Б-симптомов.
2. Осмотр пациента с определением размеров всех доступных для пальпации лимфоузлов и оценкой размеров печени и селезенки.
3. Выполнение общего анализа крови, подсчет количества тромбоцитов.
4. Обязательное выполнение биохимического анализа крови, включая выполнение электрофореза белков.
5. Рентгенография грудной клетки.
6. Компьютерная томография области шеи, грудной клетки, живота, малого таза.
7. Биопсия наиболее измененного из доступных лимфоузлов с гистологическим и обязательным иммуногистохимическим исследованием.

Картина периферической крови

Картина периферической крови нехарактерная и не имеет диагностического значения. До развития интоксикации уровень

гемоглобина и эритроцитов находится в пределах референтных величин, при вовлечении в процесс внутренних органов может развиваться гипохромная анемия. Количество лейкоцитов может быть различным – у 50% пациентов отмечается умеренный нейтрофильный лейкоцитоз, может быть лейкопения. При генерализации, диссеминировании процесса, чаще наблюдается лейкоцитоз с нейтрофильным сдвигом влево до единичных метамиелоцитов и миелоцитов, эозинофилия, лимфоцитопения. Количество тромбоцитов увеличено до $400-600-1000 \times 10^9/\text{л}$. Наблюдается ускорение оседания эритроцитов. На фоне лучевой и химиотерапии, резко выраженной спленомегалии, как проявление гиперспленизма у больных может развиваться панцитопения. СОЭ – чаще наблюдается ускорение до значительных цифр.

В сыворотке крови при лимфоме Ходжкина повышается содержание острофазовых белков, в протеинограмме увеличение фракций альфа-1, альфа-2, гамма - глобулинов. При поражении печени повышается уровень билирубина, аминотрансфераз, снижается уровень альбумина, повышается активность лактатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы. При поражении почек и развитии почечной недостаточности повышается содержание креатинина и мочевины.

Со стороны общего анализа мочи, как правило, существенных изменений нет. Однако при высокой активности патологического процесса и, особенно при поражении почек обнаруживается протеинурия, микрогематурия.

Картина костного мозга

Со стороны костного мозга не наблюдается характерных изменений, может быть гиперплазия миелоидного ростка, несколько увеличенное количество промиелоцитов, миелоцитов, приблизительно у 10% пациентов можно обнаружить гранулематозные изменения, скопления лимфоцитов, плазматических клеток, эозинофилов и явления миелофиброза.

Критерии остроты патологического процесса:

1. Ускорение оседания эритроцитов более 30 мм/час.
2. Увеличение количества острофазовых белков – фибриногена, гаптоглобина; церулоплазмина.

3. Увеличение активности щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы.

4. Нарастание лимфоцитопении.

Надежных клинических и лабораторных критериев диагностики лимфомы Ходжкина нет, поэтому всегда необходимо выполнять пункцию, а затем биопсию лимфатического узла или пораженной опухолевым процессом ткани.

В пунктате лимфатического узла помимо клеточных элементов воспалительного процесса обнаруживаются характерные для лимфомы клетки Ходжкина, клетки Березовского-Штернберга-Рид.

Клетки Ходжкина это предstadия клеток Березовского-Штернберга-Рид, клетки размерами 20-25 мкм в диаметре, овальные, округлые или неправильной формы с четкими контурами, одноядерные. Ядро расположено центрально или эксцентрично, структура хроматина зернистая розовато-фиолетового цвета, контур ядра четкий, ровный. В ядре располагается 1-2 или более крупных голубоватых ядрышек. Цитоплазма серо-голубого цвета может иметь вакуоли.

В зависимости от формы и количества ядер выделяют несколько типов клеток Березовского-Штернберга-Рид:

1 тип клеток: размер клеток 40-45 мкм в диаметре, клетки одноядерные, в ядре располагаются множественные неправильной формы нуклеолы, цитоплазма серо-голубого цвета, однородная, но может быть вакуолизирована, может иметь ровный или фестончатый край.

2 тип клеток: зеркальные клетки, двухядерные, ядра полностью повторяют друг друга, лежат рядом или слегка вагинированы друг в друга, в каждом ядре может располагаться по нуклеоле.

3 тип клеток: размер клеток 45-50 мкм в диаметре, клетки многоядерные (более 2 ядер), ядра наслаиваются друг на друга, разные по диаметру, в ядрах располагаются разного размера нуклеолы – непостоянный признак.

Различают также так называемые лакунарные клетки – округлые клетки со светлой цитоплазмой, ядра имеют округлую форму, примерно одинаковый диаметр, мелкозернистую

структуру хроматина, содержат нуклеолы. Ядра наслаиваются друг на друга и имеют вид «насыпанных на тарелку монет». Клетки встречаются при классическом варианте лимфомы Ходжкина нодулярном склерозе.

Бластные клетки небольших размеров с моноцитоподобным ядром – клетки-штернбергоиды, которые сопровождают клетки Березовского-Штернберга-Рид.

В зависимости от гистологической картины биопсийного материала различают следующие формы лимфомы Ходжкина (классификация ВОЗ 2002 г.):

1. Форма с лимфоидным преобладанием – лимфогистиоцитарный тип, около 5% от всех лимфом Ходжкина. Данная форма характеризуется нодулярным или более редко встречающимся диффузным распространением лимфоидных клеток, нодулярные скопления разделены ретикулярными волокнами. Среди клеток изредка встречаются эозинофилы, плазматические клетки, мелкие клетки Ходжкина, единичные клетки Березовского-Штернберга-Рид. Диагностика основывается на выявлении крупных лимфоцитов, гистиоцитов с многодольчатыми пузырьковидными ядрами, напоминающими «воздушную кукурузу», клетки с церебриформными ядрами, с изрезанными контурами ядра. При варианте ЛХ с лимфоидным преобладанием наблюдается характерный иммунофенотип: 100% опухолевых клеток экспрессируют В-клеточные антигены и не экспрессируют CD 15; CD 30.

2. Классическая форма лимфомы Ходжкина, которую подразделяют на 4 варианта:

2.1 Нодулярный склероз. Для данного варианта характерно развитие соединительной ткани, которая делит лимфатический узел на отдельные узелки, разрастание фиброзной ткани в виде тяжей, наличие в узелках зрелых лимфоцитов, клеток Ходжкина, клеток Березовского-Штернберга-Рид, лакунарных клеток, могут быть эозинофилы, нейтрофилы за счет иммунной реакции на опухолевый рост. Нодулярный склероз составляет 35-55% от всех лимфом Ходжкина и чаще встречается у молодых женщин с большой опухолевой массой лимфоузлов средостения.

2.2 Смешанно-клеточный вариант, который характеризуется полиморфноклеточной диффузной воспалительной

инфильтрацией, гиперклеточностью. Реактивные клетки представлены лимфоцитами, гранулоцитами, эозинофилами, плазматическими клетками, гистиоцитами и фибробластами, выявляются очаги фиброза. Среди клеток преобладают типичные клетки Ходжкина, клетки Березовского-Штернберга-Рид, чаще представленные двухядерными клетками с крупными ядрышками («совиный глаз»). Данный вариант встречается в 20-35% случаев всех лимфом Ходжкина.

2.3 Вариант с большим количеством лимфоцитов. Преобладают малые В-лимфоциты, которые располагаются диффузно или формируют фолликулы с нечеткими центрами размножения. Клетки Березовского-Штернберга-Рид в небольшом количестве располагаются в зоне мантии, окружающей фолликул, отмечается скудное количество гранулоцитов, гистиоцитов или полное их отсутствие. Данный вариант ЛХ встречается редко.

2.4 Вариант с истощением лимфоидной ткани. Различают два подварианта:

2.4.1 Диффузный склероз, при котором наблюдается вытеснение клеточного инфильтрата фиброзной тканью, которая образует сетчатый рисунок. Инфильтрат представлен скудным количеством лимфоцитов, клеток Ходжкина, Березовского-Штернберга-Рид, преобладанием соединительной ткани, отсутствием реактивных клеток, наличием очагов некроза.

2.4.2 Ретикулярный подвариант – лимфоидное истощение характеризуется преобладанием опухолевых клеток, в разных вариантах встречаются типичные и атипичные клетки Березовского-Штернберга-Рид, Ходжкина, фибробластоподобные клетки., отсутствие переходных клеток между мелкими лимфоидными и крупными атипичными.

Иммунологические исследования при лимфоме Ходжкина выявляют нарушение иммунных реакций замедленного типа, опосредованных Т-лимфоцитами, повышение количества Т-лимфоцитов супрессоров, на поздних стадиях заболевания угнетение функций В-лимфоцитов и соответственно снижение содержания иммуноглобулинов. Иммунофенотипирование клеток Березовского-Штернберга-Рид и Ходжкина выявляет экспрессию

CD 30, CD15 и отсутствие экспрессии общего лейкоцитарного маркера CD 45. что используется для верификации диагноза.

Цитогенетическое исследование пораженных лимфатических узлов обнаруживает около 27% клеток с анеуплоидией – изменением набора хромосом. Среди делящихся клеток могут обнаруживаться гипо и гиперплоидные клетки, также могут выявляться структурные аномалии хромосом, однако не установлено патологии хромосом, свойственной только лимфогранулематозу.

Дифференциальный диагноз

Проводят дифференциальный диагноз с лимфаденитом, для возникновения которого, в отличие от лимфогранулематоза, всегда имеется причина – стоматит, раневая поверхность и т.д). Лимфатические узлы при лимфадените при пальпации тестоватой консистенции, болезненные, не имеют склонности к образованию конгломератов.

При туберкулезном лимфадените увеличенные лимфатические узлы спаяны друг с другом и с окружающими тканями. Характерно частое образование свищей, рубцовой ткани. В содержимом свищей обнаруживаются микобактерии туберкулеза. У пациентов наблюдаются положительные туберкулиновые пробы, в материале из гранул выявляются эпителиоидные клетки, клетки Пирогова-Ланханса, характерные для туберкулеза.

Инфекционный мононуклеоз сопровождается острым подъемом температуры до высоких цифр, ангиной, в отличие от лимфогранулематоза, чаще увеличены лимфоузлы шеи, в периферической крови - атипичные мононуклеары на фоне небольшого лейкоцитоза, увеличение печени и селезенки.

Лабораторная диагностика миелодиспластических синдромов

Миелодиспластические синдромы – гетерогенная группа опухолевых заболеваний системы крови клоновой природы, исходной клеткой таких опухолей является стволовая

гемопоэтическая клетка или близкая к ней клетка-предшественник.

Заболевание характеризуется наличием неэффективного кроветворения, дисплазии одной или нескольких клеточных линий (чаще трех линий) в костном мозге, наличием необратимого опухолевого характера, выявленных изменений и риском трансформации в острый миелоидный лейкоз. Миелодиспластические синдромы могут протекать в виде варианта со стабильно сохраняющимся в течение длительного времени уровнем бластов в костном мозге или в виде быстро прогрессирующего варианта МДС в ОМЛ. Также рассматривают МДС как предлейкозное состояние, при котором опухолевый клон может и не трансформироваться в типичный ОМЛ. Различают первичные, возникающие *de novo* и вторичные миелодиспластические синдромы, развивающиеся после применения химио- и/или лучевой терапии.

Эпидемиология

Частота встречаемости МДС составляет 3-15 случаев на 100 000 населения в год. Чаще болеют люди в пожилом возрасте, реже заболевание встречается в молодом и детском возрасте.

Этиология

Причины развития миелодиспластических синдромов до конца не изучены. Среди потенциальных этиологических факторов чаще других рассматриваются радиация, цитостатики и другие мутагены. Подтверждением этой точки зрения является развитие вторичных или ятрогенных МДС, тесно связанных со специфическим лечением лимфом и опухолей разной локализации, а также наличие повреждений хромосом кроветворных элементов (-5/5q-; -7/7q-), отражающих действие вышеуказанных этиологических факторов у пациентов с МДС.

Патогенез

Под влиянием неблагоприятных факторов развивается генетическая нестабильность гемопоэтической стволовой клетки или близкой к ней клетки-предшественника и формирование молекулярных аномалий (наиболее хорошо изучены делеция,

транслокация 5, 7, 8 хромосом, точечные мутации гена- RAS, аномалия гена-супрессора p53, который усиливает апоптоз при повреждении ДНК клетки).

Суммарный эффект генетических аномалий изменяет регуляцию цикла клеточного деления, апоптоза, и сигнальных путей для факторов роста. Это приводит к повышенной способности клеток к пролиферации, нарушению их морфологических и функциональных характеристик, укорочению продолжительности клеточного цикла, дисплазии (табл. 14) и повышенной способности к апоптозу во всех клеточных линиях, в том числе и в стромальных клетках и, как следствие, к развитию картины неэффиктивного гемопоэза. На фоне повышенного или нормального количества клеток в костном мозге, в периферической крови наблюдается гемоцитопения (в костном мозге клетки образуются, делятся и разрушаются).

Опухолевый клон отличается нестабильностью. Приобретение новых цитогенетических аномалий повышает риск трансформации МДС в острый лейкоз.

Классификация

В соответствии с классификацией ВОЗ 2008 г. выделяют следующие варианты миелодиспластических синдромов:

1. Рефрактерная цитопения с однолинейной дисплазией:
 - рефрактерная анемия (РА)
 - рефрактерная нейтропения
 - рефрактерная тромбоцитопения
2. Рефрактерная анемия с кольцевидными сидеробластами (РАКС)
3. Рефрактерная анемия с избытком бластов (РАИБ)
4. Рефрактерная анемия с мультилинейной дисплазией
5. МДС с изолированной делецией хромосомы 5 del (5q)
6. МДС у детей
7. Неклассифицируемый МДС

Клиника

В клинике миелодиспластических синдромов длительное время отсутствуют симптомы заболевания или носят общий характер – слабость, быстрая утомляемость, сонливость. Затем

развивается анемия, не поддающаяся лечению (рефрактерная), присоединяются частые инфекционные заболевания, имеющие затяжной характер, немотивированное повышение температуры, увеличение селезенки, лимфатических узлов, печени. Геморрагические проявления у пациентов с МДС, несмотря на выраженную тромбоцитопению минимальные и чаще всего имеют петехиальный характер. Однако при снижении количества тромбоцитов в крови менее $10 \times 10^9/\text{л}$ могут развиваться массивные кровотечения различной локализации, требующие трансфузии тромбоконцентрата.

Диагностика

Морфологические особенности в периферической крови и костном мозге при различных вариантах МДС.

1. Рефрактерная цитопения с однолинейной дисплазией

В большинстве случаев для данного варианта характерна рефрактерная анемия (РА). В периферической крови наблюдается нормохромная нормоцитарная или макроцитарная анемия, ретикулоцитопения, различной степени анизоцитоз. Количество гранулоцитов и тромбоцитов нормальное. Бластов в периферической крови нет или их менее 1%.

Костный мозг гиперклеточный с гиперплазией эритроидного ростка, с умеренными и выраженными признаками дисплазии клеток, наблюдаются признаки дисплазии гранулоцитарного и мегакариоцитарного ростков различной степени выраженности.

Рефрактерная нейтропения и тромбоцитопения встречаются редко (менее 1%).

2. Рефрактерная анемия с кольцевидными сидеробластами (РАКС)

При данном варианте в периферической крови характерно наличие смешанного анизоцитоза (гипохромные микроциты и нормохромные макроциты), выраженный пойкилоцитоз (овалоциты, «мишеневидные» эритроциты), наличие эритроцитов с базофильной пунктацией, нормобластоз. Бластов в периферической крови нет.

Костный мозг нормо- или гиперклеточный за счет значительной гиперплазии эритроидного ростка, признаки дисплазии только в клетках эритроидной линии. Практически во всех эритрокариоцитах наблюдается положительная ШИК-реакция. Отличительной особенностью данного варианта является наличие кольцевидных сидеробластов – их более 15%, для которых характерно перинуклеарное распределение 5 и более гранул железа.

Количество миелобластов менее 5%.

3. Рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией

Этот вариант характеризуется двух- или трехростковой цитопенией и дисплазией до 10% клеток в двух и более ростках миелоидного кроветворения. Морфологические признаки дисплазии наблюдаются в эритроидном, гранулоцитарном и мегакариоцитарном ростках кроветворения. В периферической крови бластных клеток менее 1%, в костном мозге не более 5%. Кольцевидных сидеробластов в костном мозге не более 15%. Для рефрактерной цитопении с мультилинейной дисплазией характерна высокая частота хромосомных аномалий и высокий риск лейкозной трансформации.

4. Рефрактерная анемия с избытком бластов

В периферической крови при данном варианте наблюдается цитопения, анизоцитоз за счет макроцитов, пойкилоцитоз, гипосегментация ядер нейтрофилов, отмечается гипогранулия цитоплазмы нейтрофилов. Количество бластов в периферической крови при РАИБ-1 менее 5%, при РАИБ-2 - 5-19% и наличие палочек Ауэра в цитоплазме.

В костном мозге наблюдаются признаки дисплазии в клетках эритроидной и мегакариоцитарной линиях, признаки дисгранулоцитопоза (уменьшение количества гранул в цитоплазме, уменьшение размеров клеток, гиперсегментация и др.). Количество бластов в костном мозге при РАИБ-1 – 5-9%, при РАИБ-2 – 10-19%.

5. Миелодиспластический синдром, ассоциированный с изолированной делецией *del* (5q)

Данный вариант МДС имеет благоприятный прогноз, чаще встречается у женщин. В периферической крови наблюдаются признаки макроцитарной анемии, незначительная лейкопения, встречаются единичные бластные клетки (менее 5%). Костный мозг нормо- или гиперклеточный за счет повышенного количества мегакариоцитов с признаками дисплазии (гигантские мегакариоциты с моноплоидным ядром, двухядерные гигантские мегакариоциты). Количество бластов в костном мозге менее 5%.

Характерным является выявление хромосомной аномалии – наличие изолированной делеции длинного плеча 5 хромосомы.

6. У пожилых людей и в детском возрасте встречается гипопластический вариант МДС, для которого характерна панцитопения, низкая клеточность костного мозга (менее 20% миелокариоцитов в трепанобиоптате), признаки дисплазии могут быть нерезко выражены и касаться одного ростка, чаще эритроидного. Для диагностики гипопластического варианта имеет значение наличие признаков дисплазии не менее чем у 10% гранулоцитов, с оценкой признаков дисплазии в трех клеточных ростках, присутствие 1-20% бластных клеток в костном мозге, наличие любого количества кольцевидных сидеробластов.

7. Неклассифицируемый МДС характеризуется наличием в периферическом русле панцитопении, отсутствием бластов (или их менее 1%). В костном мозге отмечается однолинейная дисплазия, которая сопровождается цитогенетическими аномалиями, бластов менее 5%.

Таблица 14. – Признаки миелодисплазии при МДС

Дисэритро- поэз	<p>В периферической крови: анизоцитоз, пойкилоцитоз, нормобластоз.</p> <p>В костном мозге: вакуолизация цитоплазмы, кариорексис, многоядерность, мегалобластоидность, кольцевидные сидеробласты, диссоциация в созревании ядра и цитоплазмы, наличие в цитоплазме базофильной пунктации, неравномерное окрашивание цитоплазмы, многоядерные формы нормобластов</p>
Дисгрануло- цитопоэз	<p>Изменение ядер нейтрофилов: гиперсегментация, псевдопельгеризация, кольцевидные ядра;</p> <p>гипогранулия или отсутствие гранул;</p> <p>гипогранулированные эозинофилы и базофилы;</p> <p>реакция нейтрофилов на пероксидазу и щелочную фосфатазу могут быть снижены, вплоть до нуля, в клетках моноцитарного ряда помимо неспецифической эстеразы, подавляемой фторидом натрия, может выявляться хлорацетатэстераза, специфичная для гранулоцитов; снижение функциональной активности гранулоцитов (адгезия, хемотаксис, способность к фагоцитозу)</p>
Дисмега- кариоцитопоэз	<p>Макроформы тромбоцитов, аномальные тромбоциты в периферической крови.</p> <p>В костном мозге: микромегакариоциты, одноядерные формы, множество мелких ядер в мегакариоцитах</p>

При биохимическом исследовании наблюдается повышенное содержание железа в сыворотке крови, может быть слегка повышенное содержание витамина В12, повышенное насыщение трансферрина железом, высокую активность лактатдегидрогеназы.

Радиоиммунное исследование выявляет снижение длительности жизни эритроцитов, нормальную продолжительность жизни тромбоцитов при наличии изолированной тромбоцитопении.

Трепанобиопсия

В гистологических препаратах выявляют нарушение костномозговой топографии всех ростков кроветворения, патологическую локализацию незрелых миелоидных клеток, наличие агрегатов, кластеров клеток, участков отека, фиброза,

воспалительных изменений – увеличение тучных клеток, плазматических клеток, лимфоцитов, наличие макрофагов с гемосидерином, явление гемофагоцитоза.

Для подтверждения диагноза варианта миелодиспластического синдрома используют не только морфологические признаки дисплазии ростков кроветворения, которые могут встречаться и при других патологических состояниях, но и более углубленное обследование: гистологические, культуральные, цитогенетические исследования, изучение кариотипа с использованием FISH – методик, определение патологических клонов.

Иммунофенотипирование клеток крови и костного мозга при МДС позволяет выявить их качественные аномалии: отсутствие экспрессии CD 64, снижение экспрессии CD 16, CD 13 свидетельствует о нарушении созревания нейтрофилов, эритроидная дисплазия характеризуется снижением экспрессии CD 71.

Цитогенетический анализ стернального пунктата выявляет клональные хромосомные аномалии в клетках костного мозга (делеция del 5q, моносомия хромосомы 7, трисомия хромосомы 8, транслокации и др), на основании которых при отсутствии диагностических морфологических изменений предположительно устанавливается диагноз МДС.

Результаты иммунофенотипирования коррелируют с морфологическими и цитогенетическими аномалиями примерно в 90% случаев МДС, подтверждая нарушение созревания клеток гранулоцитарного и эритроцитарного ростков кроветворения.

Иммуногистохимическое исследование костного мозга позволяет определить число CD 34+ клеток. Увеличение процента CD 34+ клеток, тенденция к образованию агрегатов клеток используется для дифференциальной диагностики МДС от АА.

Исследование апоптоза:

При миелодиспластическом синдроме обнаруживается в большом количестве сильный индуктор апоптоза – фактор некроза опухоли – TNF –L.

У 85% клеток иммунофенотипическими методами выявляют рецепторы дифференцировки CD 95, т.е. подавляющее большинство клеток находится в состоянии апоптоза.

АНЕМИИ

Лабораторная диагностика железодефицитных анемий (см. CD-диск)

Железодефицитные анемии относятся к анемиям, обусловленным недостаточностью эритропоэза вследствие снижения содержания железа в сыворотке крови, костном мозге и в депо. Дефицит железа приводит к нарушению образования гемоглобина, затем эритроцитов и, как следствие, к развитию гипохромной анемии, трофическим нарушениям в тканях.

Железодефицитной анемии предшествует пре- и латентный дефицит железа, при котором запасы железа в организме снижены, но достаточны для эритропоэза.

Эпидемиология

Железодефицитные анемии составляют более 80% от числа всех анемий, распространены во всех странах мира. Примерно 5-10% населения планеты страдает железодефицитными анемиями, кроме того, у 12-15% (у 50% женщин репродуктивного возраста) выявляют скрытый дефицит железа. Наиболее высокая предрасположенность к дефициту железа и развитию железодефицитных анемий наблюдается у детей первых лет жизни, подростков, женщин детородного возраста, доноров. Даже в экономически благополучных странах, несмотря на высокий уровень развития медицины и развитую систему здравоохранения, железодефицитные состояния в разных группах населения, особенно у детей в возрасте до 3 лет остаются серьезной проблемой.

Этиология

В основе развития железодефицитных анемий является дисбаланс между потребностями и поступлением железа в организм.

Причины, приводящие к снижению уровня железа в организме.

1. Хронические кровопотери:

– маточные кровопотери: обильные менструации, дисфункциональные маточные кровотечения в пре- и менопаузе, вследствие эндометриоза, миомы матки и др.;

– из желудочно-кишечного тракта – наиболее частая причина железодефицитных анемий у мужчин и неменструирующих женщин - вследствие язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, эрозий, полипов, рака, дивертикулярной болезни желудочно-кишечного тракта, диафрагмальной грыжи, варикозного расширения вен пищевода и кардиального отдела желудка, кровоточащего геморроя, глистных инвазий;

– вследствие заболеваний мочевыводящих путей и почек, сопровождающихся гематурией (гломерулонефрит, мочекаменная болезнь, поликистоз, туберкулез почек и др.);

– на фоне геморрагических диатезов;

– при заболеваниях легких (туберкулез, рак) и другие причины, приводящие к хроническим кровопотерям.

2. Повышенная потребность в железе:

– беременность, роды, лактация – в эти периоды расходуется значительное количество железа и для восстановления его запасов необходимо 2,5-3 года;

– период полового созревания и роста;

– интенсивное занятие спортом;

– у пациентов с В12-дефицитной анемией;

– у активных доноров.

3. Недостаточное поступление железа с пищей:

– у строгих вегетарианцев;

– при преимущественном употреблении молочной и мучной пищи, пищи бедной микроэлементами;

– у лиц с низким социально-экономическим уровнем жизни;

– у пациентов с анорексией невротического или психогенного характера.

4. Нарушение транспорта железа в организме:

– врожденная гипо-, атрансферринемия;

– гипопропротеинемия различного генеза;

– аутоиммунные процессы – появление антител к трансферрину и его рецепторам.

5. Нарушение всасывания железа:

- резекция желудка, кишечника;
- хронический энтерит, энтеропатии;
- инфекция, вызванная *H. pylori*;
- употребление кофе, крепкого чая;
- глистные инвазии;
- лямблиоз;
- целиакия.

6. Острое кровотечение.

Патогенез

Дефицит железа развивается последовательно, постепенно и проходит несколько стадий: прелатентный дефицит железа, стадию латентного дефицита железа и собственно железodefицитную анемию (таб. 15). Первоначально уменьшаются запасы железа в печени, селезенке, костном мозге, что проявляется снижением уровня ферритина в крови. На этой стадии наблюдается компенсаторное усиление всасывания железа в кишечнике и повышение уровня мукозного и плазменного трансферрина, растворимых рецепторов для трансферрина, содержание сывороточного железа не снижено, анемии нет. Дальнейшее истощение депо железа приводит к уменьшению количества транспортного фонда железа, железа гемсодержащих ферментов, в крови снижается уровень сывороточного железа, уменьшается показатель насыщения трансферрина железом, повышается общая железосвязывающая способность (ОЖСС), что соответствует латентному дефициту железа. В дальнейшем развивается дефицит железа необходимого для синтеза гемоглобина и происходит трансформация латентного дефицита железа в собственно железodefицитную анемию, что проявляется снижением уровня гемоглобина, количества эритроцитов.

Поскольку железо является структурным компонентом гемоглобина и миоглобина, железосодержащих ферментов, а также кофактором ряда энзимных процессов, включая синтез коллагена, при развитии железodefицитного состояния в

организме развиваются соответствующие изменения. Нарушение синтеза гемоглобина приводит к развитию гипохромной анемии, миоглобина – к миастении. При дефиците железа снижается активность железосодержащих и железозависимых ферментов тканевого дыхания, что вместе с другими нарушениями вызывает дистрофические изменения эпителиальных тканей (кожи, придатков, слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, мочеиспускательного канала) и мускулатуры (скелетной мускулатуры и миокарда). Прогрессирующие атрофические процессы в слизистой желудка усугубляют дисбаланс между потребностью и поступлением железа в организм.

Дефицит железа приводит к нарушению функции иммунокомпетентных клеток и к снижению иммунологической резистентности. Снижение активности некоторых железосодержащих ферментов в лейкоцитах приводит к нарушению их фагоцитарной и бактерицидной функции, нарушению образования лейкоцитами интерлейкина -1 (и других цитокинов), играющего важную роль в клеточном и гуморальном иммунитете и неспецифических защитных механизмах организма.

Молекулярно-генетические исследования последних лет показали достоверное повышение частоты встречаемости мутантной формы гена цитохрома P-4501A1 у пациентов с железодефицитными анемиями, зависимость частоты выявления железодефицитной анемии у женщин молодого возраста от полиморфизма гена GPLa-807 C\T. Это является основанием для поиска молекулярно-генетических маркеров повышенного риска развития железодефицитных анемий.

Таблица 15. – Диагностика этапов развития железодефицитных анемий

Показатель	Норма	Прелатентный дефицит железа	Латентный дефицит железа	ЖДА
Количество гемоглобина (г/л)				
Мужчины	130-170	Норма	Норма	Менее 130
Женщины	120-140	Норма	Норма	Менее 120
Содержание сывороточного железа (мкмоль/л)				
Мужчины	11,6-31,3	Норма	Менее 13	Менее 13
Женщины	9-30,4	Норма	Менее 11,5	Менее 11,5
ОЖСС крови (мкмоль/л)	44-70	Норма	Более 70	Более 70
Насыщение трансферрина железом (%)	20-30	Норма	Менее 20	Менее 20
Ферритин сыворотки крови (мкг/л)				
Мужчины	15-130	Менее 12	Менее 12	Менее 12
Женщины	12-150	Менее 12	Менее 12	Менее 12
Десфераловый тест - суточное выделение железа с мочой после введения десферала (мг)	0,6-1,6	Менее 0,4	Менее 0,4	Менее 0,4
Количество а) сидеробластов в стернальном пунктате (%)	20-40	Менее 10	Менее 10	Менее 10
Б) сидероцитов в периферической крови	0,8-1%	Менее 0,8	Менее 0,8	Менее 0,8
Сидеропенический синдром	-	-	+	+

Классификация

Единой общей классификации железодефицитной анемии нет, но обычно выделяют варианты в зависимости от этиологической формы, стадии течения, степени тяжести анемии (табл.16).

Таблица 16 . – Классификация ЖДА

Этиологическая форма	Стадии	Степень тяжести
Снижение потребления железа	Прелатентная	Легкая (содержание гемоглобина 90-120 г/л)
Повышенные потери железа	Латентная	Средняя (содержание гемоглобина 70-90 г/л)
Повышенная потребность в железе	ЖДА	Тяжелая (содержание гемоглобина менее 70г/л)

Клиника

Железодефицитная анемия проявляется двумя основными клиническими синдромами: анемическим и сидеропеническим.

Анемический синдром обусловлен снижением концентрации гемоглобина и количества эритроцитов, недостаточным обеспечением тканей кислородом и проявляется неспецифическими симптомами: общая слабость, быстрая утомляемость, снижение работоспособности, памяти, сонливость, головокружения, учащенное сердцебиение, одышка сначала при физической нагрузке, а затем и в покое (при резко выраженной анемии). При осмотре пациентов обращает на себя внимание бледность кожных покровов и видимых слизистых оболочек. Бледность кожи имеет зеленоватый оттенок или оттенок желтого воска, иногда заметный лишь вокруг рта. Анемический синдром проявляется признаками миокардиодистрофии: одышка, тахикардия, часто нарушение ритма, умеренное расширение границ сердца влево, глухость сердечных тонов, систолический шумом во всех аускультативных точках. У больных железодефицитной анемией имеется склонность к артериальной гипотонии. Так как анемия развивается постепенно, то организм

человека адаптируется к низкому уровню гемоглобина и эритроцитов и субъективные проявления анемического синдрома не всегда выражены и расцениваются общим переутомлением.

Сидеропенический синдром обусловлен тканевым дефицитом железа и как следствие снижением активности многих ферментов и проявляется следующими симптомами:

- извращение вкуса (непреодолимое желание употреблять в пищу необычное и мало- или несъедобное – мел, песок, фарш и т.д.);

- извращенное обоняние - пристрастие к запахам, которые у здоровых людей воспринимаются как неприятные (ацетон, бензин, керосин, гуталин, нафталин и т.д.);

- появление пристрастия к острой, пряной, соленой пище;

- выраженная мышечная слабость, атрофия мышц;

- дистрофические изменения кожи и ее придатков (сухость, шелушение кожи; тусклость, выпадение, ломкость волос; истончение, ломкость, поперечная исчерченность ногтей);

- анулярный стоматит (трещины, «заеды» в углах рта);

- глоссит – ощущение боли и распирания в области языка, развитие атрофии сосочков («лакированный» язык);

- атрофические изменения слизистой желудочно-кишечного тракта проявляются в виде затруднения, болезненности при глотании, развития атрофического гастрита, энтерита;

- императивные позывы на мочеиспускание при кашле, чихании, смехе, ночное недержание мочи за счет слабости сфинктеров мочевого пузыря;

- симптом «синих склер», связанный с нарушением синтеза коллагена в склер, она истончается и через нее просвечивает сосудистая оболочка глаза;

- восприимчивость к вирусным и бактериальным инфекциям, склонность к хронизации инфекций;

- нарушение репаративных процессов.

Диагностика

Картина периферической крови

Латентный дефицит железа не сопровождается изменением морфологии эритроцитов, эритроцитарных индексов, не наблюдается изменений в гистограмме, может быть незначительное повышение показателя анизоцитоза эритроцитов (RDW).

Для железодефицитной анемии характерно наличие гипохромной микроцитарной анемии. При оценке мазка крови обращает на себя внимание гипохромия эритроцитов с выраженным центральным просветлением, встречаются эритроциты в виде колец (анулоциты). Количество ретикулоцитов меньше нормы за счет снижения регенераторной функции костного мозга на фоне дефицита железа. При собственно железодефицитной анемии наблюдается снижение эритроцитарных индексов: средний объем эритроцитов (MCV) менее 80 фл (норма 82-92 фл), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH) менее 27 пг (норма 27-31 пг), средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC) менее 30 г/дл (норма 32-36 г/дл). Эти индексы должны интерпретироваться с учетом оценки показателя гетерогенности эритроцитов по объему - RDW. В норме среднее значение показателя степени анизоцитоза составляет 12-15%, при железодефицитной анемии этот показатель увеличивается, в периферической крови отмечается преобладание микроцитов. Эритроцитарная гистограмма при железодефицитной анемии уплощается и значительно растягивается вдоль оси X и смещается влево. Выраженное снижение объема эритроцитов отражается и на тромбоцитарной гистограмме: она не заканчивается на базисной кривой, а поднимается правой своей частью вверх. Количество лейкоцитов и тромбоцитов при ЖДА остается в пределах нормы. СОЭ чаще бывает нормальной, при выраженной анемии отмечается ускорение.

В периферической крови с использованием специальных методов окраски выявляется пониженное количество или полное отсутствие железосодержащих клеток - сидероцитов (нормальное количество – 0,8-1%).

Для диагностики железодефицитной анемии используют показатели транспортного фонда железа – ОЖСС, ЛЖСС и др. Однако данные показатели не всегда достаточно чувствительны, так как могут быть нормальными даже при истощении запасов железа (снижение сывороточного ферритина). Кроме того уровень сывороточного железа и ОЖСС могут изменяться при различных инфекционных и воспалительных процессах, онкологических заболеваниях, заболеваниях печени.

При железодефицитных анемиях оценивают состояние депо железа и для этого используют определение содержания ферритина и непрямой метод определения коэффициента насыщения трансферрина в сыворотке крови. Коэффициент насыщения является расчетным показателем, определяемым по отношению количества сывороточного железа к общей железосвязывающей способности и умноженному на 100. В норме коэффициент составляет 20-30% и следует отметить, что при снижении сывороточного железа и изменении ОЖСС, не связанных с дефицитом железа, соотношение этих показателей остается в пределах нормальных величин, что имеет дифференциально-диагностическое значение.

Ферритин является основной формой депонирования железа в организме, его концентрация в сыворотке крови прямо пропорциональна количеству депонированного железа в организме. Низкий уровень ферритина при нормальном количестве гемоглобина указывает на истощение запасов железа. Однако этот показатель не является абсолютно достоверным, так как ферритин может снижаться при наличии гипотиреоза, при дефиците витамина С, может повышаться при заболеваниях печени, воспалительных, инфекционных, злокачественных процессах, где он выступает в качестве белка острой фазы.

Помимо определения ферритина и коэффициента насыщения трансферрина, для оценки состояния запасов железа в организме используют десфераловый тест – определение уровня железа в суточном количестве мочи после введения пациенту 500 мг комплекса десферамин. При железодефицитной анемии экскреция железа с мочой снижена и составляет менее 0,4 мг.

Для железодефицитной анемии характерным является достоверное увеличение количества растворимых

трансферриновых рецепторов в сыворотке крови. Концентрация растворимых рецепторов к трансферину отражает потребности преимущественно эритроидных клеток в железе, поэтому в случае повышения эритропоэтической активности костного мозга и выраженного дефицита железа отмечается повышение их содержания в сыворотке крови. Количество sTfR остается стабильным при воспалительных процессах и беременности.

ЖДА характеризуется снижением содержания железа, ферритина в сыворотке крови, % насыщения трансферрина железом, повышением концентрации растворимых рецепторов к трансферину (sTfR), ОЖСС, трансферрина, увеличением свободных протопорфиринов эритроцитов. Однако все перечисленные показатели должны оцениваться только в комплексе с гематологическими показателями, так как их изменения могут наблюдаться при самых разных заболеваниях.

Картина костного мозга

При железодефицитной анемии костный мозг нормоклеточный с некоторым расширением эритроидного ростка с преобладанием базофильных и полихроматофильных нормобластов. В костном мозге снижено количество сидеробластов (менее 10%), макрофагов с гранулами гемосидерина.

Лабораторная диагностика сидеробластных анемий

Сидеробластные анемии (железонасыщенные) – это микроцитарные, гипохромные анемии, обусловленные недостаточной или аномальной утилизацией внутриклеточного железа при синтезе гемоглобина на фоне нормального или даже повышенного уровня железа в митохондриях эритрокариоцитов. Такие дефекты могут быть обусловлены наследственными нарушениями синтеза порфиринов или приобретенными, например в результате отравления свинцом или вследствие недостаточности витамина В₆. В результате нарушений, железо не используется для синтеза гема, а откладывается в митохондриях эритрокариоцитов, в макрофагах костного мозга в

виде ферритина, а также в различных органах и тканях, вызывая гемосидероз внутренних органов.

Классификация

Различают следующие сидеробластные анемии:

1. Наследственные:
 - X-сцепленные, с мутацией генов ALAS-2 и hABC7;
 - аутосомно-доминантные и аутосомно-рецессивные сидеробластные анемии с неустановленной этиологией;
 - с митохондриальными цитопатиями вследствие делеций ДНК;
 - синдром Вольфрама с мутациями в гене WFS1/ wolframin.
2. Врожденные сидеробластные анемии - спорадическая группа анемий неустановленной этиологии.
3. Приобретенные сидеробластные анемии - на фоне миелодисплазии, отравления свинцом, этанолом, лекарственными препаратами (изониазидом, азотиоприном, цитостатиками), на фоне дефицита витамина В6, меди, связанные со злокачественными и воспалительными заболеваниями.

Этиология. Патогенез

Заболевание в случае наследуемых или врожденных сидеробластных анемий, связано с дефектом синтеза дельта - аминолевулиновой кислоты и как следствие – нарушением образования протопорфирина. Уровень протопорфирина при врожденной и наследственных сидеробластных анемиях снижен. Образование дельта-аминолевулиновой кислоты – один из главных этапов синтеза гема, 80% гема в организме синтезируется в эритрокариоцитах костного мозга. Известны два гена кодирующих образование синтазы дельта - аминолевулиновой кислоты: ALAS-1 и ALAS-2.

Ген ALAS-2 кодирует образование синтазы дельта - аминолевулиновой кислоты в эритрокариоцитах. Ген локализуется в X-хромосоме. Мутация этого гена может снижать чувствительность к пиридоксальфосфату и повышать чувствительность к митохондриальным протеазам.

Ген ALAS-1 кодирует образование дельта - аминолевулиновой кислоты во всех других клетках организма.

Там же синтезируется гем для образования цитохромов, которые обеспечивают жизнедеятельность клетки.

Нарушение образования протопорфиринов приводит к нарушению образования гема, неиспользуемое железо накапливается в организме. Если железо поступает преимущественно в печень, то развивается цирроз, при отложении в поджелудочной железе возникает сахарный диабет, отложение железа в мышцах сердца приводит к сердечной недостаточности. В яичках – к евнухоидизму и т.д. В костном мозге при специальных способах окраски выявляется большое количество кольцевидных сидеробластов – ядродержащих эритрокариоцитов с околядерным венчиком, представляющим собой заполненные железом митохондрии, расположенные в виде перинуклеарного кольца. Наличие кольцевидных сидеробластов является наиболее характерным признаком сидеробластных анемий, выявляется у 15-20% больных при исследовании костного мозга. Постепенное прогрессирование анемии связано вначале с нарушением синтеза гема, а затем с отложением железа в эритрокариоцитах. Продолжительность жизни таких эритрокариоцитов снижена, что сопровождается формированием неэффективного эритропоза и развитием гипохромной микроцитарной анемии. Избыточное количество железа приводит к тому, что молекулы железа катализируют образование свободных радикалов, перекисное окисление белков и липидов, повреждение ДНК и как следствие - к повреждению ферментов в митохондриях, отвечающих за восстановление поврежденных участков ДНК. Повышение свободных радикалов ускоряет апоптоз эритрокариоцитов.

При воздействии свинца на организм происходит блокирование ферментов, участвующих в синтезе гема (синтетазы дельта – аминолевулиновой кислоты и феррохелатазы), снижение скорости синтеза альфа - полипептидных цепей глобина. В результате дефицита одного из ферментов синтеза гема развивается порфирия и происходит накопление промежуточных продуктов. Аминолевулиновая кислота, порфобилиноген и уропорфириноген водорастворимы, поэтому при накоплении экскретируются с мочой, при этом моча приобретает розовый или красный оттенок. Копропорфирин и

протопорфирин нерастворимы в воде, поэтому они экскретируются с желчью и определяются в кале. Кроме того, свинец оказывает токсическое воздействие на различные органы и системы, фиксируясь на мембране эритроцитов, нарушает активность натрий-калий-зависимой АТФ-азы, что приводит к снижению калия в эритроцитах и укорочению продолжительности жизни эритроцитов.

Клиника

Пациентов беспокоит общая слабость, снижение работоспособности, повышенная утомляемость, одышка, сердцебиение при физической нагрузке, нарушение сна, тремор рук.

При осмотре кожные покровы бледные с темно-серым оттенком. Постепенно появляются жалобы, связанные с вторичным гемохроматозом – отложением железа в органах и тканях и, соответственно, увеличением их в размерах и нарушением функций. Так, например, отложение железа в яичках вызывает отставание мальчиков в половом развитии, связанном с недостаточной секрецией половых гормонов.

При свинцовом отравлении поражается нервная, сердечно-сосудистая система, желудочно-кишечный тракт, наблюдается отложение свинца в костях.

Характерным для длительной свинцовой интоксикации можно считать развитие полиневритов с нарушением чувствительности в области нижних и верхних конечностей, снижением силы в мышцах рук и ног и снижением сухожильных рефлексов. Для свинцового полиневрита характерно симметричное поражение разгибателей кистей и пальцев рук и в меньшей степени – сгибателей, может быть тетрапарез. В ряде случаев свинцовый полиневрит проявляется интенсивными болями по ходу нервных стволов.

Поражение пищеварительной системы проявляется тошнотой, рвотой, отсутствием аппетита, сильными схваткообразными болями в животе разной локализации. Свинцовые колики могут продолжаться от нескольких часов до нескольких дней, сопровождаются рвотой, повышением температуры, давлением, запорами, снижением диуреза. Характерно также появление лиловой каймы на деснах.

При поражении сердечно-сосудистой системы наблюдается картина токсического миокардита – одышка, тахикардия, расширение границ сердца возможно нарушение ритма. На электрокардиограмме выявляется снижение амплитуды зубца Т в нескольких отведениях, нарушение ритма, проводимости. Характерным является развитие артериальной гипертензии.

Сидеробластные анемии, сцепленные с X-хромосомой, чаще встречаются у мужчин, при этом наблюдается поражение двух независимых генов на X-хромосоме, чаще это ALAS-2. У женщин - гетерозигот заболевание может проявляться в пожилом возрасте вследствие прогрессирующей инактивации гена ALAS-2, находящегося на нормальной X-хромосоме. В результате мутации гена hABC7 (кодирующего АТФ-связывающую кассету на хромосоме Xq13.1-q13.3) развивается наследственная сидеробластная анемия с тяжелой врожденной атаксией. В основе аутосомно-доминантного и аутосомно-рецессивного типов сидеробластных анемий лежит дефект генов, подавляющих биосинтез или активность гена ALAS с последующим нарушением функции гена. Вследствие делеции генома митохондрий развивается гетерогенная группа сидеробластных анемий – митохондриальные цитопатии. Дефект наследуется в 50% случаев. Заболевание описано как синдром Пирсона – сочетание лактат-ацидоза, патологии почек и экзокринной дисфункции поджелудочной железы.

Синдром Вольфрама характеризуется сочетанием несахарного, сахарного диабета, атрофии зрительного нерва и глухоты.

Диагностика

В периферической крови отмечается снижение гемоглобина, эритроцитов, эритроцитарных показателей – MCV, MCH, MCHC, гематокрита. Наблюдается выраженный анизоцитоз за счет микроцитов, увеличение показателя анизоцитоза (RDW). Отмечается пойкилоцитоз: среди эритроцитов встречаются стоматоциты, овалоциты, шизоциты, отдельные мишеневидные эритроциты. Наблюдается базофильная пунктация эритроцитов. Количество ретикулоцитов

увеличено. Количество лейкоцитов и тромбоцитов в пределах референтных величин.

При биохимическом исследовании обнаруживается увеличение содержания сывороточного железа, ферритина, насыщение трансферина железом достигает 100%, ОЖСС, ЛЖСС снижены. При нарушении синтеза протопорфирина наблюдается уменьшение количества свободного эритроцитарного протопорфирина и увеличение количества дельта - аминолевулиновой кислоты в сыворотке и повышение ее экскреции с мочой. При отравлении свинцом наблюдается увеличение протопорфирина, копропорфирина, дельта - аминолевулиновой кислоты, билирубина, свинца мочи, уробилиногена, уропорфирина. Отмечается гипокалиемия, гиперкальциемия.

При исследовании костного мозга наблюдается гиперплазия красного ростка, увеличение кольцевидных сидеробластов, при митохондриальных цитопатиях - наличие в эритрокариоцитах вакуолей.

При молекулярно-генетическом исследовании определяются мутации генов ALAS, hABC7, WFS1/wolframin.

Дифференциальная диагностика

В первую очередь следует дифференцировать железодефицитные анемии с сидеробластными (как наследственными, так и приобретенными, в том числе с анемией при свинцовой интоксикации), которые также являются гипохромным, характерным отличием сидеробластных анемий является избыток железа в организме.

К гипохромным анемиям относится талассемия – наследственная гемолитическая анемия, в диагностике которой имеет значение семейный анамнез, наличие признаков гемолиза и определение фракций гемоглобина. Кроме того при выявлении микроцитоза очень важно оценить гомогенность популяции красных клеток крови, при железодефицитной анемии показатель анизоцитоза (RDW) повышен и нормальный при талассемии, где популяция эритроцитов более гомогенная.

Следует дифференцировать железодефицитные анемии с железоперераспределительной, или анемией хронических заболеваний, при которой также наблюдается гипохромная анемия с невысоким уровнем ретикулоцитов. В отличие от железодефицитной анемии при железоперераспределительной анемии наблюдается нормальный уровень ферритина и растворимых рецепторов трансферина в сыворотке крови (табл. 17).

Таблица 17. – Дифференциальная диагностика гипохромных микроцитарных анемий

Признаки	Сидеробластная анемия вследствие свинцовой интоксикации	Гомозиготная бета-талассемия	ЖДА
Особенности анамнеза	Контакт со свинцом на работе или в быту	Прослеживается наследственный фактор и проживание в определенных географических регионах	Наличие хронической кровопотери
Окраска кожи	Землисто-серая бледность	Лимонно-желтая	Выраженная бледность
Сидеропенический синдром	Отсутствует	Отсутствует	Характерен
Увеличение печени, селезенки	При развитии вторичного гемохроматоза	Характерно	Не характерно
Количество ретикулоцитов	Повышено	Повышено	Нормальное
Особенности миелограммы	Гиперплазия красного ростка кроветворения, кольцевидные сидеробласты	Гиперплазия красного ростка кроветворения	Красный росток нормальный или несколько уменьшен, количество сидеробластов снижено
Проба с десфералом	Выделение железа с мочой повышено	Выделение железа с мочой повышено	Выделение железа с мочой снижено
Содержание сывороточного железа	Повышено	Повышено	Снижено
Общая железо связывающая способность	Понижена	Нормальная	Повышена
Коэффициент насыщения трансферина	Повышен	Нормальный	Понижен

Содержание ферритина в крови	Повышено	Повышено	Снижено
Содержание билирубина в крови	Повышено за счет конъюгированного и неконъюгированного	Повышено за счет неконъюгированного	Нормальное
Соотношение фракций гемоглобина	Нормальное	Увеличение Hb A2 и HbF	Нормальное
Содержание растворимых рецепторов трансферина	Нормальное	Нормальное	Повышено

Лабораторная диагностика мегалобластных анемий

Мегалобластные анемии – это гиперхромные, макроцитарные анемии, которые развиваются в результате нарушения синтеза ДНК в гемопоэтических клетках, связанного с дефицитом витамина В12 и/или фолиевой кислоты и характеризующиеся мегалобластным типом кроветворения. Дефицит витамина В12 и/или фолиевой кислоты ведет к нарушению синтеза ДНК не только в кроветворных клетках, но и во всех быстро делящихся клетках – клетках кожи, желудочно-кишечного тракта и др.

Лабораторная диагностика В12-дефицитной анемии

эпидемиология

Наиболее часто заболевание встречается у людей в возрасте 60-70 лет.

Заболеваемость В12- дефицитной анемией среди людей старше 40 лет составляет 25 человек на 100 000 населения в год.

Суточная потребность в витамине В12 составляет 5-7 мкг. В организме здорового человека содержится около 2-5 мг кобаламина, запасов которого хватает на 3-5 лет после полного прекращения всасывания витамина в кишечнике. Наибольшее количество витамина В12 депонируется в печени.

Свободный витамин В12 в организме превращается в два кофермента, благодаря которым участвует в важных для организма реакциях.

Кофермент витамина В12 метилкобаламин обеспечивает созревание, развитие и размножение клеток с наиболее высокой пролиферативной активностью - кроветворных (прежде всего клеток красного ростка) и эпителия желудочно-кишечного тракта.

Метилкобаламин катализирует переход фолиевой кислоты в ее активную форму – 5,10 – метилтетрафолиевую кислоту, необходимую для синтеза тимидинмонофосфата, кроме того принимает участие в превращении уридинмонофосфата в тимидинмонофосфат, входящий в состав ДНК, т.е. необходим для синтеза ДНК.

С участием кофермента 5- дезоксиаденозилкобаламина происходит расщепление и синтез жирных кислот, превращение продукта метаболизма жирных кислот метилмалоновой кислоты в янтарную кислоту, обеспечивая тем самым оптимальный метаболизм миелина в нервной системе.

Кроме того, витамин В12 является кофактором ферментной системы, обеспечивающей синтез метионина из гомоцистеина, недостаток кобаламина приводит к повышению уровня общего гомоцистеина в сыворотке крови.

Этиология

Основные причины развития В12- дефицитной анемии:

1. Нарушение секреции гастромукопротеина париетальными клетками желудка:

1.1 Атрофический аутоиммунный гастрит с выработкой антител к париетальным клеткам и гастромукопротеину.

1.2 Тотальная, реже субтотальная гастроэктомия.

1.3 Рак желудка.

1.4 Полипоз желудка.

1.5 Врожденное нарушение секреции гастромукопротеина.

1.6 Токсическое действие высоких доз алкоголя на слизистую оболочку желудка.

2. Нарушение всасывания витамина В12 в тонком кишечнике:

- 2.1 Рак тонкого кишечника, лимфома тонкой кишки.
- 2.2 Резекция участка подвздошной кишки.
- 2.3 Синдром мальабсорбции различного генеза (ферментопатии, энтериты, целиакия и т.д.).
- 2.4 Хронический панкреатит с нарушением секреции трипсина.
- 2.5 Врожденное отсутствие рецепторов к комплексу «витамин В12 + гастромукопротеин» в подвздошной кишке.
- 2.6 Нарушение всасывания кобаламина, вызванное лекарственными препаратами (неомицин, циметидин и т.д.).
3. Конкурентное расходование витамина В12:
 - 3.1 Инвазия широким лентецом.
 - 3.2 Инвазия власоглавом.
 - 3.3 Множественные дивертикулы тонкого кишечника с дивертикулитом.
 - 3.4 Образование послеоперационных «слепых петель» в тонком кишечнике.
4. Повышенный расход витамина В12:
 - 4.1 Хроническая гемолитическая анемия.
 - 4.2 Миелопролиферативные заболевания.
 - 4.3 Тиреотоксикоз.
 - 4.4 Многоплодная беременность.
 - 4.5 Множественная миелома и другие новообразования.
5. Нарушение поступления витамина В12 с пищей.
Строгое вегетарианство.
6. Снижение запасов витамина В12.
Выраженный цирроз печени.
7. Нарушение транспорта витамина В12.
Отсутствие транскобаламина II или появление антител к нему.
8. Врожденные нарушения внутриклеточного метаболизма витамина В12, вследствие мутации гена ABCD4, кодирующего белок cblIF, который обеспечивает транспорт витамина В12 из адсорбирующих его лизосом в цитоплазму клетки.
9. Аутоиммунные антитела к париетальным клеткам желудка и внутреннему фактору.

Патогенез

Воздействие этиологических факторов приводит к недостатку витамина В12 и соответственно к недостатку коферментов. Дефицит кофермента витамина В12 метилкобаламина приводит к нарушению синтеза тимидина, входящего в состав ДНК и как следствие – к нарушению синтеза ДНК и процессов митоза в клетках организма. Более всего страдают клетки быстрорастущих тканей – костного мозга и желудочно-кишечного тракта. Клетки костного мозга утрачивают способность к нормальному созреванию – замедляется удвоение ДНК, уменьшается количество митозов, но увеличивается продолжительность митотических циклов, нарушается синхронность созревания ядра и цитоплазмы. Особенно выражены нарушения со стороны красного ростка кроветворения. Наблюдается неэффективный эритропоэз с образованием и накоплением в костном мозге большого количества мегалобластов – крупных клеток, характеризующихся замедленным созреванием ядра на фоне сохраненной гемоглобинизации цитоплазмы, сокращением продолжительности жизни образующихся клеток и повышенным их распадом с развитием в периферической крови анемии. В периферическую кровь выходят макроциты и мегалоциты – эритроциты огромных размеров, более 8 мкм до 12 мкм в диаметре, с укороченной в 2-3 раза продолжительностью жизни.

Одновременно наблюдается нарушение гранулоцитопоэза, тромбоцитопоэза с развитием неэффективного гранулоцитопоэза и тромбоцитопоэза с формированием гигантских форм гранулоцитов, тромбоцитов и развитием тромбоцитопении, лейкопении. Кроме того, дефицит метилкобаламина приводит к нарушению созревания эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта и как следствие к развитию атрофии слизистой оболочки желудка и кишечника.

Результатом дефицита кофактора 5-дезоксиденозилкобаламина является накопление токсичных продуктов обмена жирных кислот – метилмалоновой и пропионовой кислот. Это приводит к повреждению головного мозга, задних и боковых столбов спинного мозга, снижению миелинизации

периферических нервных волокон и развитию фуникулярного миелоза.

Мутация гена ABCD4, кодирующего белок cb1F, приводит к нарушению транспорта витамина В12 из адсорбирующих его лизосом в цитоплазму клетки и развитию комбинированной гомоцистеинурии и метилмалоновой ацидурии (cb1F – Hcy – MMA). Кроме того данная мутация замедляет активность АТФ, который обеспечивает энергией биохимические реакции в клетках.

Клиника

Для клинической картины заболевания характерны симптомы поражения кроветворной, пищеварительной и нервной систем.

Нарушение кроветворной системы является ведущим в клинической картине заболевания и проявляется анемией разной степени выраженности. Пациенты жалуются на слабость, быструю утомляемость, сердцебиение, одышку, головокружение, обморочные состояния. При осмотре обращают на себя внимание бледность кожных покровов с лимонно-желтым оттенком (за счет гемолиза), желтушность склер, одутловатость лица, пастозность в области голеней и стоп.

Поражение желудочно-кишечного тракта проявляется снижением аппетита, ощущением тяжести и полноты в эпигастральной области после еды, отрыжку воздухом и съеденной пищей, боль и жжение в языке, в области десен, губ.

При осмотре характерны атрофические изменения слизистой оболочки полости рта и языка (глоссит) – сосочки языка атрофированы («лакированный язык»), выявляются участки воспаления, трещины, иногда изъязвления, слизистая полости рта бледная с явлениями афтозного стоматита. При пальпации живота определяется интенсивная боль в эпигастральной области, может быть увеличена печень, селезенка. При дефиците витамина В12 за счет нарушения всасывания в тонком кишечнике, наряду с анемическим синдромом, имеются также симптомы мальабсорбции.

Поражение нервной системы проявляется нарушением сна, появлением парестезий в виде чувства «ползанья мурашек»,

«ватных ног», при развитии фуникулярного миелоза наблюдаются болезненные парестезии, атаксическая походка. Преимущественное поражение задних столбов спинного мозга сопровождается нарушением пространственной и вибрационной чувствительности, появляется сенсорная атаксия, снижение сухожильных рефлексов, атрофия мышц нижних конечностей, затруднения при ходьбе. Кроме того, наблюдается нарушение функции тазовых органов (недержание мочи, кала). При преимущественном поражении боковых столбов спинного мозга наблюдается иная симптоматика – развивается нижний спастический парез с резким повышением сухожильных рефлексов и тонуса мышц нижних конечностей, нарушением функции тазовых органов, которое проявляется задержкой мочеиспускания, дефекации. При этом обращает на себя внимание несоответствие между тяжестью неврологических нарушений и проявлениями анемии. Примерно у 25% пациентов имеет место главным образом неврологическая симптоматика при нормальных или почти нормальных показателях со стороны кроветворной системы.

В патологический процесс могут вовлекаться глазные нервы, вегетативная нервная система, иногда возможны нервно-психические расстройства в виде депрессии, эмоциональной лабильности, нарушения памяти. При отсутствии адекватной терапии нарушения со стороны ЦНС могут привести к психическим расстройствам с появлением бреда и галлюцинаций.

Диагностика

Основное значение в диагностике В12-дефицитной анемии принадлежит морфологическим исследованиям периферической крови и костного мозга.

Картина периферической крови

В общем анализе крови – снижение количества эритроцитов в большей степени, чем гемоглобина, гиперхромный характер анемии, пойкилоцитоз, анизоцитоз за счет макроцитов. Средний диаметр эритроцитов составляет 8,5 мкм и выше, отмечается наличие мегалоцитов – клеток, диаметр которых составляет 11-12 мкм. Отмечается увеличение эритроцитарных индексов: средний объем эритроцитов (MCV) более 100 фл, среднее содержание

гемоглобина в эритроците (MCH) более 32 пг, средняя концентрация гемоглобина в эритроците MCHC более 36 г/дл. Значение коэффициента анизотропии эритроцитов (RDW) находится в пределах нормы, что указывает на гомогенность популяции макроцитов.

Во многих макроцитах (мегалоцитах) обнаруживаются включения – наличие телец Жолли, колец Кебота, что объясняется замедлением процесса созревания ядра, в результате ядро не выталкивается из цитоплазмы, а подвергается фрагментации. При исследовании мазка периферической крови выявляются эритроциты с базофильной пунктацией. Для В12-дефицитной анемии характерен низкий уровень ретикулоцитов, снижение количества лейкоцитов за счет нейтрофилов, сдвиг лейкоцитарной формулы вправо - появление гиперсегментированных полиморфноядерных гранулоцитов с количеством сегментов от 6-8 до 12. Одновременно можно наблюдать сдвиг формулы влево до мета- и даже миелоцитов, снижение количества эозинофилов вплоть до исчезновения, снижение количества моноцитов, относительный лимфоцитоз. У 50% больных отмечается тромбоцитопения, нередко тромбоциты увеличены в размерах и имеют необычную форму, однако их активность сохранена и поэтому явлений кровоточивости нет.

СОЭ не ускорена, но при тяжелой степени анемии возможно небольшое ускорение (18-20 мм/ч).

При обнаружении в периферической крови панцитопении – анемии, лейкопении, тромбоцитопении особенно у людей пожилого возраста необходимо исключить мегалобластную анемию.

При В12-дефицитной анемии довольно часто наблюдается гемолитический синдром, обусловленный внутрикостномозговым распадом эритрокариоцитов и макроцитов в периферической крови. Это проявляется увеличением количества свободного билирубина, уровня сывороточного железа, активности лактатдегидрогеназы. При В12-дефицитной анемии наблюдается снижение уровня витамина В12 в сыворотке крови, гипергомоцистеинемия, повышенная экскреция с мочой гомоцистеина, метилмалоновой кислоты (в норме с мочой выделяется до 3,5 мг метилмалоновой кислоты).

Картина костного мозга

В костном мозге при В12-дефицитной анемии отмечается эритроидная гиперплазия с мегалобластической реакцией. Костномозговой лейкоэритроцитарный индекс составляет 1:1; 1:2; 1:3 (при норме 2,5-4:1). Клетки эритроидного ряда увеличены в размерах (гигантские клетки), ядро расположено эксцентрично, выглядит менее зрелым по сравнению с цитоплазмой, структура хроматина более нежная, глыбки выглядят как мелкие зернышки («земля, испещренная каплями только что начавшегося небольшого дождя»), ядрышки в ядрах мегалобластов отсутствуют. Особенностью мегалобластов является асинхронное созревание ядра и цитоплазмы (гемоглобинизация цитоплазмы при сохранившейся незрелой нежной структуре хроматина). Мегалобласты бывают базофильными, полихроматофильными и оксифильными. При тяжелом течении анемии кроветворение в костном мозге полностью протекает по мегалобластному типу, если преобладают промегалобласты и базофильные мегалобласты, имеет место так называемая картина «синего костного мозга» за счет базофильной цитоплазмы, при преобладании оксифильных мегалобластов – картина «красного костного мозга», так как оксифильные мегалобласты в большей мере насыщены гемоглобином. При В12-дефицитной анемии характерно изменение клеток миелоидного ряда - макроцитоз, гиперсегментация нейтрофилов, чаще всего увеличиваются в размерах метамиелоциты и палочкоядерные нейтрофилы. Количество мегакариоцитов в норме, при тяжелом течении заболевания – снижение за счет мегалобластоидных изменений ядер.

При развитии В12-дефицитной анемии на фоне аутоиммунного процесса в сыворотке крови выявляются антитела к париетальным клеткам, гастромукопротеину или комплексу «витамин В12 + гастромукопротеин». При цитогенетическом исследовании выявляются мутации гена ABCD4, встречаемые при В12-дефицитной анемии.

В диагностике В12-дефицитной анемии наибольшее значение придается основным диагностическим критериям, прежде всего обнаружению в стерильном пунктате мегалобластов и количеству в крови витамина В12. После

установления диагноза необходимо выяснить причину дефицита витамина В12.

В ходе лечения В12-дефицитной анемии мегалобластическое кроветворение в костном мозге меняется и проходит по смешанному типу – клетки красного ряда представлены эритроблантами, нормоблантами, промegalоблантами, мегалоблантами. По мере выздоровления кроветворение становится все более нормобластическим. Уровень сывороточного железа во время лечения снижается, так как активно используется для эритропоэза. В периферической крови на 5-7 день лечения отмечается так называемый ретикулоцитарный криз – увеличение количества ретикулоцитов – хороший прогностический признак, свидетельствующий о гематологической ремиссии. Макроцитоз нейтрофилов может сохраняться в течение 1-2 месяцев после наступления гематологической ремиссии.

Дифференциальный диагноз

В12-дефицитную анемию следует дифференцировать с заболеваниями, при которых наблюдается увеличение размера эритроцитов не связанное с мегалобластическим кроветворением, т.е. не является следствием нарушения синтеза ДНК, а следствием других причин, с заболеваниями, при которых обнаруживается синдром панцитопении и гемолиза.

При остром эритромиелозе наблюдается мегалобластоидный тип кроветворения, в отличие от мегалобластного, характерного для В12-дефицитной анемии. Наблюдается увеличение количества миелобластов в костном мозге и появление их в периферической крови, отсутствие гиперсегментированных нейтрофилов. Для болезни Гульельмо характерна высокая температура, боли в костях, тромбоцитопения, часто сочетающаяся с геморрагическим синдромом, нормальное содержание витамина В12 в крови, отсутствие эффекта от пробной терапии витамином В12. Макроцитарную анемию с панцитопенией могут вызывать как гипо-, так и гипертиреозидизм, алкогольная интоксикация, хронические заболевания печени. Макроцитоз может также наблюдаться при хронических заболеваниях почек, курении,

большое число ретикулоцитов может повышать показатель среднего объема эритроцитов. К мегалобластозу может приводить прием лекарственных препаратов, в частности, цитостатического ряда, ингибирующих синтез ДНК.

Наличие панцитопении и выраженного гемолитического синдрома требует дифференциальной диагностики В12-дефицитной анемии с аутоиммунной гемолитической анемией. Однако аутоиммунная гемолитическая анемия – нормохромная, номоцитарная в отличие от В12-дефицитной анемии. При аутоиммунной гемолитической анемии нехарактерен мегалобластный тип кроветворения, наличие гиперсегментированных нейтрофилов. В костномозговом пунктате наблюдается увеличение нормобластов, мегалобласты отсутствуют. Количество ретикулоцитов в периферической крови при аутоиммунной гемолитической анемии увеличено, содержание витамина В12 нормальное, также отсутствует эффект от лечения витамином В12. Характерным для аутоиммунной гемолитической анемии является положительная проба Кумбса (наличие антиэритроцитарных антител).

Наследственные формы В12-дефицитной анемии, такие как наследственный дефиците гастромукопротеина, проявляются не ранее 6 месяцев жизни (чаще всего в возрасте 2-6 лет) и характеризуются отсутствием внутреннего фактора Касла в желудочном соке, наличие антител к нему и париетальным клеткам желудка. Для синдрома Иммерслунд-Гресбека характерно селективное нарушение всасывания витамина В12 в подвздошной кишке связанное с отсутствием рецепторов в слизистой оболочке к комплексу «витамин В12+ гастромукопротеин». При наследственном дефиците транскобаламина характерными признаками заболевания является нормальное содержание в крови витамина В12 и отсутствие транскобаламина II.

В12-дефицитную анемию следует дифференцировать с фолиеводефицитной анемией, которая также относится к анемиям с мегалобластным типом кроветворения.

Лабораторная диагностика фолиеводефицитной анемии

Фолиеводефицитная анемия является мегалобластной анемией, обусловленной дефицитом фолатов в организме. Фолиеводефицитная анемия чаще встречается у детей, людей молодого и среднего возраста.

Фолиевая кислота относится к водорастворимым, термолабильным витаминам. В пищевых продуктах животного и растительного происхождения и клетках содержится в виде фолатов – фолиевокислых солей. Общее содержание фолатов в организме – 5-10 мг, в депо (печени) – 2,5-5 мг, суточная потребность организма в фолиевой кислоте – 100-200мкг. В случае полного прекращения поступления витамина в организм, депо обеспечивает потребность в фолиевой кислоте в течение 4-5 месяцев.

Этиология

К основным причинам развития фолиеводефицитной анемии относятся:

1. Недостаточное поступление фолатов с пищей – частая причина фолиеводефицитной анемии. Фолиевая кислота содержится в мясе, субпродуктах, шпинате, листьях салата, фасоли, спарже, овощах, грибах, фруктах, недостаточное употребление которых или неправильная их кулинарная обработка может привести к дефициту фолиевой кислоты и развитию мегалобластной анемии.

2. Нарушение всасывания фолатов в кишечнике. Фолиевая кислота всасывается в 12-перстной и проксимальном отделе тощей кишки. Причины, приводящие к нарушению всасывания фолиевой кислоты аналогичны таковым при В12- дефицитной анемии – энтеропатии, синдром мальабсорбции, резекция кишечника и т.д.

3. Повышенная потребность в фолатах – во время беременности, у детей первого года жизни, в период интенсивного роста, полового созревания, при хронических воспалительных процессах, гемолитических анемиях, гемобластозах, раковых заболеваниях и т.д.

4. Хроническая алкогольная интоксикация. Алкоголь нарушает всасывание фолатов в кишечнике.

5. Повышенная потеря фолатов – сердечная недостаточность, цирроз печени, у пациентов на гемодиализе.

6. Прием лекарственных препаратов – лечение цитостатиками, прием сульфаниламидов, противотуберкулезных, противосудорожных препаратов, которые нарушают всасывание и использование фолиевой кислоты, угнетают ферменты, участвующие в обмене фолиевой кислоты (дегидрофолатредуктаза, рибонуклеотидредуктаза).

6. Наследственный дефицит ферментов – дигидрофолатредуктазы, 5-ТН-трансферазы, формимино-трансферазы, принимающих участие в метаболизме фолиевой кислоты в организме.

Патогенез

Этиологические факторы нарушают формирование активной формы фолиевой кислоты – 5-10-метилентетрагидрофолиевой кислоты, необходимой для синтеза тимидинмонофосфата из уридинмонофосфата. В результате чего нарушается синтез ДНК в кроветворных клетках с развитием мегалобластной анемии.

Клиника. Диагностика

Клиническая картина при фолиеводефицитной анемии аналогична клинической картине при В12-дефицитной анемии, за исключением развития атрофического глоссита, гастрита, ахилии и фуникулярного миелоза.

Лабораторные данные общего анализа крови, костного мозга при фолиеводефицитной анемии такие же, как и при В12-дефицитной анемии. Для дифференциальной диагностики используют окраску стернального пунктата ализариновым красным, который окрашивает мегалобласты в красный цвет при В12-дефицитной анемии и не окрашивает при фолиеводефицитной. В биохимическом анализе крови обращает на себя внимание нормальный уровень витамина В12 и снижение содержания фолиевой кислоты. Суточная экскреция

метилмалоновой кислоты с мочой при фолиеводефицитной анемии нормальная в отличие от В12-дефицитной анемии.

Использование гистидиновой пробы позволяет дифференцировать фолиеводефицитную анемию, при которой проба с гистидином положительная в отличие от В12-дефицитной. При фолиеводефицитной анемии выделение с мочой формиминглутаминовой кислоты после приема 15 г гистидина значительно увеличивается, так как не происходит превращения гистидина под действие фолиевой кислоты в глутаминовую кислоту.

Лабораторная диагностика гемолитических анемий

Гемолитические анемии – группа анемий, характеризующихся синдромом гемолиза – сниженной продолжительностью жизни и повышенным разрушением эритроцитов, при которых процессы кроверазрушения преобладают над процессами кровообразования. Гемолиз эритроцитов может быть компенсированным и некомпенсированным. В том случае, когда красный кровяной росток работает активно, количество эритроцитов, разрушенных в результате гемолиза, восполняется, и анемия не развивается – компенсированный гемолиз, уровень гемоглобина и эритроцитов в пределах нормальных значений. При необходимости костный мозг может повысить кроветворную функцию в 6-8 раз и компенсировать гемолиз, если укорочение жизни эритроцитов составляет 1/6 - 1/8 от нормы.

В том случае, когда гемолитические кризы развиваются часто, продолжительность жизни эритроцитов составляет менее 30 дней костный мозг не в состоянии восполнить необходимое количество эритроцитов и гемоглобина развивается декомпенсированный гемолиз. Скорость разрушения клеток превышает максимальную способность костного мозга к продукции эритроцитов, развивается гемолитическая анемия.

В норме продолжительность жизни эритроцитов составляет 90-120 дней, затем эритроциты разрушаются. В зависимости от того, где происходит разрушение эритроцитов, различают внутриклеточный и внутрисосудистый гемолиз.

Клинически важно подразделять гемолитические анемии в зависимости от локализации гемолиза (табл. 18).

Примерно 90% эритроцитов разрушается и фагоцитируется макрофагами селезенки (внутриклеточный гемолиз) с последующим образованием желчных пигментов.

Гемолитические анемии с внутриклеточным гемолизом чаще носят наследственный характер и имеют хроническое течение. Обострения заболевания проявляются гемолитическими кризами, которые развиваются в любом возрасте, под действием любых провоцирующих факторов – прием лекарственных препаратов, вакцинация, после инфекций и без видимых причин. Во время криза гемолиз эритроцитов усиливается. Разрушение происходит в клетках системы фагоцитирующих мононуклеаров (селезенка, в меньшей степени печень, костный мозг).

Таблица 18. – Виды гемолитических анемий

Гемолитические анемии с внутриклеточным гемолизом	Гемолитические анемии с внутрисосудистым гемолизом
Обусловленные дефектами мембраны эритроцитов (наследственный сфероцитоз и другие дефекты)	Вследствие травматического гемолиза
Обусловленные дефектами метаболизма эритроцитов (недостаточность пируваткиназы и другие дефекты)	Вследствие переливания несовместимой крови
Болезнь нестабильного гемоглобина	Пароксизмальная ночная гемоглобинурия
Гемолитические анемии, обусловленные нарушением синтеза гемоглобина (гемоглобинопатии)	Вследствие инфекций, паразитозов (клостридии, малярийный плазмодий),
На фоне избыточного количества эритроцитов (физиологическая желтуха новорожденных, эритремия – при количестве эритроцитов более $6-7 \times 10^9/\text{л}$).	Вследствие дефицита глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы
	Приобретенные аутоиммунные гемолитические анемии

Клинические проявления внутриклеточного гемолиза: анемия, желтуха, увеличение размеров селезенки, вплоть до спленомегалии.

Лабораторные признаки повышенного внутриклеточного гемолиза: гипербилирубинемия за счет неконъюгированной фракции, увеличение стеркобилина в кале, уробилиногенурия.

Около 10% эритроцитов разрушается в кровеносном русле (внутрисосудистый гемолиз с участием комплемента) с образованием свободного гемоглобина, т.е. в кровеносном русле всегда есть небольшое количество свободного гемоглобина. Частично, свободный гемоглобин реабсорбируется в канальцах почек и попадая в печень, превращается в билирубин. Большая часть свободного гемоглобина соединяется с гаптоглобином в комплекс, который утилизируется в печени, костном мозге. Гаптоглобин может связать не более 1,0 г/л свободного гемоглобина, поэтому при повышении в плазме крови свободного гемоглобина он выделяется с мочой. При гемоглобинурии моча приобретает темный, почти черный цвет. Проходя через почечные канальцы, свободный гемоглобин, частично разрушаясь, откладывается в эпителии канальцев и появляется в моче в виде зерен гемосидерина. Значительное повышение свободного гемоглобина в кровеносном русле приводит к его окислению до метгемоглобина, который придает крови лаковый вид, плазма при этом окрашивается в коричневый цвет. Клинически кризы при гемолитических анемиях с внутрисосудистым гемолизом проявляются лихорадкой, ознобом, болями разной локализации, умеренно выраженной желтушностью склер. Гемоглобинурия может привести к обструкции канальцев и развитию острой почечной недостаточности, возможно также развитие синдрома ДВС.

Лабораторные признаки внутрисосудистого гемолиза: гемоглобинемия (повышение свободного гемоглобина), метгемоглобинемия, снижение или отсутствие гаптоглобина в сыворотке крови, гемоглобинурия, гемосидеринурия, повышение концентрации железа в моче. Сравнительная характеристика некоторых лабораторных показателей в зависимости локализации гемолиза (табл. 19).

Таблица 19. – Сравнительная характеристика некоторых лабораторных показателей при внутриклеточном и внутрисосудистом видах гемолиза

Лабораторные признаки гемолиза	Внутриклеточный гемолиз	Внутрисосудистый гемолиз
Морфологические изменения эритроцитов в периферической крови	Характерны (микросфероциты, овалоциты и др.)	Как правило, отсутствуют
Высокий уровень в крови свободного гемоглобина, снижение или отсутствие гаптоглобина в сыворотке крови	Не характерно	Характерно
Гемоглобинурия, гемосидеринурия, повышение концентрации железа в моче	Не характерны	Характерны
Уробилиногенурия, увеличение стеркобилина в кале	Характерны	Не характерны
Снижение осмотической резистентности эритроцитов	Характерно	Не характерно

Мембранопатии

К мембранопатиям относят группу гемолитических анемий, как правило, наследственного характера, обусловленных нарушением структуры мембраны эритроцитов, что сопровождается изменением их формы. Мембранопатии относятся к гемолитическим анемиям с внутриклеточным гемолизом, при котором эритроциты разрушаются преимущественно макрофагами селезенки

В зависимости от формы эритроцитов различают следующие мембранопатии:

1. Сфероцитоз.
2. Овалоцитоз.
3. Анемия с выраженным анизоцитозом и пойкилоцитозом (пиропойкилоцитоз).

4. Стоматоцитоз.
5. Акантоцитоз.
6. Эллиптоцитоз.

Наиболее частой аномалией является наследственный сфероцитоз, реже встречается овалоцитоз, и относительно редкими являются остальные виды мембранопатий.

Лабораторная диагностика наследственного микросфероцитоза

Наследственный микросфероцитоз (Болезнь Минковского – Шоффара)- группа наследственных гемолитических анемий, имеющих сходную клиническую картину, но отличающихся друг от друга характером изменений молекулярного строения белков мембраны эритроцитов, что приводит к циркуляции в периферическом русле эритроцитов небольшого диаметра сферической формы - микросфероцитов.

Эпидемиология

Заболевание наследуется преимущественно по аутосомно-доминантному типу, чаще встречается гетерозиготная форма носительства. Нередко клинические признаки заболевания проявляются уже в неонатальном периоде, но чаще болезнь проявляется в возрасте 3-15 лет.

Патогенез

В основе изменений при сфероцитозе лежит нарушение структуры мембраны эритроцитов. Нарушения структуры мембраны обусловлены различными дефектами белковой части мембраны - белков спектрина, актина и анкирина, нарушением их связывания, структуры, полное отсутствие. Независимо от молекулярной основы сфероцитоза у всех пациентов обнаруживаются эритроциты шаровидной формы, очень мелкие – микросфероциты, с ригидной мембраной. Из-за отсутствия или дефекта белков не происходит стабилизации мембраны (взаимодействия белков с двойным слоем липидов или другими белками) и наблюдается снижение пластичности мембраны. Формирующиеся сфероциты длительно задерживаются в красной пульпе селезенки, теряют способность деформироваться в узких

участках кровотока ее синусов и легко подвергаются фагоцитозу. Снижение эластичности мембраны приводит к ее фрагментации при прохождении эритроцита через капилляры, что сопровождается уменьшением размеров эритроцитов. Преждевременная сферуляция эритроцитов (не вследствие старения) в периферической крови ведет к укорочению продолжительности жизни эритроцитов и их фагированию макрофагами селезенки. Длительность жизни эритроцитов укорачивается до 12-14 дней, что сопровождается развитием гемолитической анемии и компенсаторным усилением работы эритроидного ростка кроветворения.

Клиника

Наследственный микросфероцитоз относится к наследственным гемолитическим анемиям с внутриклеточным распадом эритроцитов. Это обуславливает клинические проявления болезни – гемолитические кризы, желтушность кожных покровов и слизистых, увеличение селезенки, по мере снижения компенсаторных возможностей кроветворения развивается анемический синдром разной степени выраженности, отмечается склонность к образованию камней в желчном пузыре. Образование камней в желчном пузыре и в желчевыводящих путях – одно из самых частых осложнений сфероцитоза, выявляющееся чаще всего в подростковом возрасте. Отмечается также задержка роста и развития (спленогенный инфантилизм), деформация скелета, особенно черепа, снижение толерантности к нагрузкам (заболевание провоцируется физической нагрузкой или эмоциональным стрессом).

Диагностика

Картина периферической крови

Анемия различной степени выраженности, у большинства пациентов умеренная. Гемоглобин вне гемолитического криза снижен незначительно – 100-110 г/л, в период криза может снижаться до 40-50 г/л. Кризы провоцируются различными неблагоприятными факторами, чаще инфекцией.

Диагноз сфероцитарной анемии основывается на наличии у пациента характерных морфологических изменений эритроцитов.

Для наследственного сфероцитоза характерны следующие особенности эритроцитов: склонность к шарообразной форме, уменьшение диаметра - средний диаметр, как правило, составляет 5,8-6,4 мкм (в норме 7,2- 7,5 мкм), толщина клеток увеличена до 2,5-3 мкм (в норме 1,9 – 2,1 мкм), отсутствие центрального просветления. Эритроцитарные показатели при наследственном сфероцитозе не претерпевают значительных изменений, у части пациентов показатель МСНС может быть повышен. Количество микросфероцитов в период ремиссии и при латентной форме болезни не бывает высоким и может значительно повышаться при гемолитическом кризе, что обычно сопровождается выраженными признаками гемолиза. В периферической крови отмечаются признаки активного костномозгового эритропоэза – полихроматофилия, ретикулоцитоз, нормобластоз.

Содержание ретикулоцитов при наследственном сфероцитозе повышено: в период вне криза не превышает 10% (норма 0,2-1,0%), после гемолитического криза может достигать 50-60%. В периферической крови на фоне гемолитического криза появляются нормобласты, иногда могут появляться единичные эритрокариоциты. Количество лейкоцитов при сфероцитозе чаще нормальное, во время кризов – лейкоцитоз, иногда с выраженным сдвигом влево. Количество тромбоцитов остается в пределах референтных величин. СОЭ в период криза ускорена.

Одним из характерных признаков при сфероцитозе является снижение осмотической резистентности эритроцитов. При наследственном сфероцитозе гемолиз начинается при концентрации раствора хлорида натрия близкой к физиологическому раствору, иногда наблюдается гемолиз 7-10% микросфероцитов уже при концентрации раствора равной 0,75%. Однако такие выраженные изменения встречаются не у всех пациентов. Осмотическая резистентность может быть нормальной при наличии сфероцитоза и тогда ее исследуют после суточной инкубации эритроцитов.

Количество билирубина у пациентов со сфероцитозом повышено за счет неконъюгированной фракции, уровень зависит от тяжести заболевания и периода исследования. Вне криза уровень свободного билирубина может колебаться в пределах от нормальных величин до 50-80 мкмоль/л, в период

криза наблюдается значительное повышение. Степень билирубинемии определяется не только интенсивностью гемолиза, но и зависит от функционального состояния печени. При осложнении микросфероцитоза обтурационной желтухой, связанной с желчнокаменной болезнью уровень и тип билирубина изменяются. В этих случаях содержание билирубина может достигать высоких цифр.

При наследственном микросфероцитозе прямая реакция Кумбса отрицательная в отличие от иммунных гемолитических анемий.

Картина костного мозга

В костном мозге выявляется компенсаторное усиление эритропоэза в виде эритроидной реакции нормобластического типа. Костномозговое кроветворение гипер- или регенераторное, в результате чего наблюдается увеличение количества миелокариоцитов с преобладанием эритробластов, которые составляют 60-70% от общего числа костномозговых клеток. Лейкоэритробластический индекс составляет 1:1, 0,5:1 (в норме 2,5-4:1). Соотношение между клетками красного ряда чаще всего не нарушено. После гемолитического криза в костном мозге могут появляться мегалобласты, что обусловлено быстрым расходом фолиевой кислоты и развитием ее умеренного дефицита.

В моче при сфероцитозе повышено содержание уробилина, моча имеет коричнево-красный оттенок.

Каловые массы интенсивно окрашены из-за большого количества стеркобилина.

Дифференциальный диагноз

Дифференциальная диагностика при микросфероцитозе начинается, прежде всего, с диагностики гемолитической анемии. Преимущественное увеличение содержания непрямого билирубина, ретикулоцитов, выявление микросфероцитов в мазке периферической крови и наличие близких родственников с таким же заболеванием дают основание для установления правильного диагноза. После того как установлен факт гемолитической анемии, необходим дифференциальный диагноз с

несфероцитарными анемиями. Большинство сфероцитарных анемий наследуются по доминантному типу в отличие от ферментозависимых гемолитических анемий, наследуемых по рецессивному типу. Для дифференциальной диагностики сфероцитоза с другими гемолитическими анемиями, наследуемыми доминантно и связанными с дефектом мембран эритроцитов (стоматоцитоз, эллиптоцитоз) используется оценка мазка периферической крови и реакций, выявляющих нестабильность гемоглобина.

При аутоиммунной гемолитической анемии обнаруживается такой же микросфероцитоз, как и при наследственном сфероцитозе, пониженная осмотическая резистентность. В этом случае для дифференциальной диагностики необходим тщательно собранный анамнез, выявление подобного заболевания у родственников, давность заболевания, прямая проба Кумбса, позволяющая выявить антитела при аутоиммунной гемолитической анемии.

Если у больного наблюдается увеличение непрямого билирубина, значительное увеличение размеров селезенки, то наследственный сфероцитоз следует дифференцировать с дизэритропоэтической анемией. При дизэритропоэтической анемии наблюдается невыраженный сфероцитоз и характерная картина костного мозга – кроме раздражения красного ростка кроветворения, наличие двухядерных эритрокариоцитов.

При вирусном гепатите наблюдается выраженная реакция печеночных ферментов, обнаружение антител к вирусам, выявление ДНК вируса, в отличие от наследственного сфероцитоза, помогают также данные ультразвукового исследования печени.

Энзимопатии

В 40-х годах прошлого столетия появились описания случаев наследственных гемолитических анемий без микросфероцитоза. В дальнейшем было установлено, что гемолитические анемии развиваются в результате патологии ферментов эритроцитов.

К энзимопатиям (ферментопатиям) относятся гемолитические анемии, как правило, наследственного характера,

обусловленные количественными или качественными нарушениями со стороны ферментных систем эритроцитов, что сопровождается повышенной чувствительностью эритроцитов к различным воздействиям. В настоящее время известно более 20 реакций в метаболизме эритроцитов, нарушение которых приводит к укорочению продолжительности их жизни, потере клетками устойчивости к действию окислителей, лекарственных препаратов, пылицы цветов и др. и преждевременному их разрушению. Гемолитические анемии, обусловленные дефицитом ферментов эритроцитов (несфероцитарные гемолитические анемии), имеют рецессивный тип наследования. Клинические и гематологические проявления болезни зависят от локализации ферментного дефекта в эритроцитах. В зависимости от того, дефект какого фермента играет ключевую роль в развитии заболевания, выделяют три основные формы энзимопатий:

1) с патологией ферментов, относящихся к пентозофосфатному пути и системе глутатиона (дефицит пируваткиназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и другие);

2) с патологией ферментов, относящихся к пути Эмбдена (дефицит гексакиназы, фосфофруктокиназы и другие);

3) с патологией ферментов, относящихся к метаболизму нуклеотидов (дефицит АТФ-азы и другие).

Наследственные нарушения обмена в большинстве случаев обусловлены недостаточной активностью ферментов, участвующих в обмене глюкозы. Чаще всего энзимопатии связаны с дефектом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, реже встречается анемия при дефиците пируваткиназы, глутатионредуктазы. Энзимопатии с дефектами других метаболических путей редки и не имеют практического значения в развитии гемолитических анемий.

Лабораторная диагностика наследственной гемолитической анемии, связанной с патологией г-6-ФДГ

Дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы - наиболее частый наследственный дефект эритроцитов, который приводит к

снижению продолжительности жизни эритроцитов и развитию гемолитической анемии.

Эпидемиология

Гемолитическая анемия, обусловленная дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, превалирует среди жителей бассейна Средиземного моря, Юго-Восточной Азии, Индии.

Наследование активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы сцеплено с X – хромосомой. Структурный ген, который отвечает за синтез фермента, располагается в области длинного плеча X-хромосомы (Xq28). Болезнь проявляется чаще у мужчин гомозиготных носителей патологического гена, унаследовавших заболевание от практически здоровой матери; у женщин, гомозиготных носителей патологического гена, унаследовавших его как от матери, так и от отца. У женщин, гетерозиготных носителей патологического гена, заболевание может вообще не проявляться или иметь легкое течение.

Патогенез

Гемолитический криз могут провоцировать инфекционные заболевания, прием в пищу конских бобов (фавизм), вдыхание цветочной пыльцы. Наиболее полно изучен патогенез гемолитических кризов, вызванных приемом лекарственных препаратов. Гемолитические кризы вызывают лекарственные препараты, которые катализируют окислительную денатурацию гемоглобина молекулярным кислородом. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа является ферментом пентозофосфатного пути (второй путь распада глюкозы) и принимает участие в образовании восстановленной формы НАДФН, под действием которого окисленный глутатион превращается в восстановленный. Глутатион является главным антиоксидантом эритроцитов и защищает их от окисления свободными радикалами, перекисными соединениями, лекарственными средствами и другими веществами, которые могут запускать активацию перекисного окисления липидов мембраны эритроцитов и их последующее разрушение. При дефиците глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах не образуется восстановленная форма НАДФН, необходимая для

восстановления глутатиона. Снижение восстановительного потенциала делает эритроциты ранимыми к воздействию оксидативного стресса. Избыток перекиси водорода и свободных радикалов ведет к денатурации внутриклеточного белка и выпадению цепей глобина в осадок с образованием телец Гейнца. Проходя через селезенку, эритроциты утрачивают эти включения, превращаясь в «надкусанные» или шлемовидные эритроциты – дегмациты. Изменение формы, структуры мембраны эритроцитов снижает продолжительность их жизни и ведет к развитию острого внутрисосудистого гемолиза.

Клиника

Чаще всего дефицит активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы не дает клинических проявлений без провокаций. Носители патологического гена – практически здоровые люди, не знающие о своем заболевании. Тяжелые гемолитические кризы начинаются у них при приеме некоторых лекарственных препаратов, чаще всего:

- сульфаниламидных препаратов (септрим, сульфадемызин, норсульфазол и др.);
- противомаларийные препараты (примахин, хинин);
- препараты нитрофуранового ряда (фурадонин, фурагин и др.);
- производные оксихинолинов (энтеросептол, 5-НОК);
- производные нафтиридина (неграм, невигамон);
- противотуберкулезные препараты (тубазид, фтивазид);
- противоглистные препараты.

На 3-4 день после приема лекарственного препарата появляется легкая желтушность склер, темная моча. Дальнейший прием лекарственных препаратов приводит к развитию тяжелого гемолитического криза, для которого характерно повышение температуры тела, желтушность кожных покровов, резкая головная боль, боль в конечностях, снижение артериального давления. Часто гемолитический криз сопровождается увеличением селезенки, печени. Характерным является окрашивание мочи в черный или бурый цвет. Внутрисосудистый гемолиз провоцирует активацию свертывания крови, что может сопровождаться блокадой микроциркуляторного русла почек и

развитием острой почечной недостаточности. В редких случаях массивный распад эритроцитов может приводить к развитию синдрома ДВС.

Диагностика

Картина периферической крови

Вне криза картина периферической крови у большинства пациентов не изменена. При кризе отмечается резкое снижение количества эритроцитов, гемоглобина и гематокрита. Эритроцитарные показатели – средний объем эритроцитов, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроците в пределах нормальных значений. Развивается нормохромная, нормоцитарная анемия. В период кризов повышается количество ретикулоцитов, в мазке периферической крови отмечается полихроматофилия, наличие дегмацитов. В лейкоцитарной формуле наблюдается лейкоцитоз со сдвигом влево, иногда до миелоцитов. Количество тромбоцитов находится в пределах референтных величин. На фоне тяжелого криза при окраске эритроцитов кристаллическим фиолетовым в клетках можно видеть большое количество телец Гейнца.

В сыворотке крови отмечается гемоглобинемия, увеличение количества неконъюгированного билирубина, гипогалтоглобинемия, повышение активности лактатдегидрогеназы.

Со стороны *костного мозга* наблюдается картина резкого раздражения красного ростка кроветворения.

Моча во время криза имеет красный, бурый, черный цвет с высоким содержанием белка, эритроциты отсутствуют. Наблюдается гемоглобинурия, иногда гемосидеринурия.

Для диагностики дефицита активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы используют качественные и количественные методы исследования активности фермента (см. главу I).

Гемоглобинопатии

К гемоглобинопатиям относятся гемолитические анемии вследствие нарушения структуры гемоглобина – качественные гемоглобинопатии, или синтеза гемоглобина – количественные гемоглобинопатии.

Лабораторная диагностика талассемий

Талассемии – это гетерогенная группа заболеваний с наследственным нарушением синтеза одной из полипептидных цепей глобина, что приводит к избыточной продукции других полипептидных цепей и развитию дисбаланса между ними. Несбалансированный синтез цепей глобина приводит к сокращению продолжительности жизни эритроцитов и развитию гемолитической анемии.

Эпидемиология

Заболевание передается по аутосомно-доминантному типу. Наиболее часто заболевание встречается в странах Средиземноморья – Италии, Греции, Испании, встречается заболевание в Португалии, Таиланде, Индии, Пакистане. В странах СНГ заболевание наиболее часто встречается в Азербайджане, Грузии, в остальных регионах встречаются в виде sporadic cases.

Патогенез

Талассемия, при которой наблюдается нарушение синтеза бета-цепи глобина, называют бета-талассемией, при нарушении синтеза альфа-цепи – альфа-талассемией, описаны заболевания связанные с нарушением синтеза гамма- и дельта -цепей. Наиболее часто встречается бета-талассемия.

Механизм нарушения синтеза связан с генетическими аномалиями (делеция, точечные мутации, нарушение фрагментации мРНК и т.д.), например, описано около 200 различных мутаций приводящих к развитию бета - талассемии. Наблюдаются варианты с полным отсутствием продукции цепей и редуцированной продукцией полипептидных цепей.

В норме синтез полипептидных цепей глобина сбалансирован. Количество альфа, бета, гамма, дельта цепей одинаковое и, свободные цепи практически не встречаются. При нарушении синтеза одной из полипептидных цепей, цепи, синтезируемые в избыточном количестве, накапливаются и откладываются в эритрокариоцитах костного мозга и в эритроцитах периферической крови, вызывая повреждение

мембраны и преждевременную гибель клеток. В результате дефекта синтеза полипептидных цепей продукция гемоглобина снижается, концентрация гемоглобина в эритроците падает, вызывая гипохромию. Избыточный синтез одной из цепей гемоглобина приводит к повреждению мембраны, снижению продолжительности жизни эритроцитов, преждевременному их разрушению и развитию анемии. В качестве компенсаторной реакции происходит интенсивная эритроидная гиперплазия со значительным расширением зон кроветворения, появлением экстрамедуллярных очагов кроветворения в печени, селезенке, костях.

В результате дефекта синтеза гемоглобина и потери гема при преципитации у больных развивается нарушение обмена железа и накопление его в эритроидных клетках, в различных органах и тканях с развитием вторичного гемохроматоза.

Гомозиготная бета-талассемия (большая талассемия), или болезнь Кули. Это тяжелая средиземноморская форма гемолитической анемии, при которой сохраняется синтез около 10% нормальной цепи. Клинические признаки заболевания проявляются чаще всего в конце первого года жизни, когда происходит замена фетального гемоглобина на гемоглобин А.

У детей наблюдается резко выраженная бледность кожных покровов, желтушность кожи и слизистых с сероватым оттенком, спленомегалия, увеличение печени. Резкая гиперплазия красного ростка с развитием экстрамедуллярных очагов кроветворения приводит к нарушению скелета – у детей наблюдается так называемое талассемическое лицо (с выступающей лобной частью, высокими выступающими скулами, сужением глазных щелей, широкой переносицей). Дети отстают в физическом, психическом и половом развитии. Одним из тяжелейших осложнений большой талассемии является перегрузка железом различных органов и тканей и нарушением их функций.

Картина периферической крови

Наблюдается снижение количества эритроцитов – до $2-3 \times 10^{12}/л$, гемоглобина до 30-50 г/л, эритроцитарные индексы снижены, показатель анизоцитоза в пределах нормальных величин – гипохромная микроцитарная анемия. В мазке

периферической крови выявляется анизоцитоз за счет микроцитов, пойкилоцитоз - мишеневидные эритроциты. В эритроцитах наблюдается базофильная пунктация. Осмотическая резистентность эритроцитов повышена.

В периферическую кровь выходит большое количество нормобластов (до 100 на лейкоцитарную формулу). При специальных методах окраски в периферической крови выявляется повышенное количество сидероцитов (нормальное количество 0,8-1,0%).

Количество ретикулоцитов увеличено до 5-7% неадекватно раздражению красного ростка кроветворения (даже при тяжелой анемии ретикулоцитоз не бывает высоким) так как в костном мозге наблюдается выраженный неэффективный эритропоэз.

В лейкоцитарной формуле отмечается лейкопения, с относительным лимфоцитозом. Во время гемолитического криза может наблюдаться лейкоцитоз со сдвигом влево. Количество тромбоцитов не изменено.

Биохимическое исследование сыворотки крови выявляет гипербилирубинемия за счет неконъюгированной фракции билирубина, повышение уровня гемоглобина, сывороточного железа, ферритина, снижение ОЖСС. Накопление железа в организме – один из наиболее серьезных осложнений талассемии. По мере накопления железа, трансферрин становится полностью насыщенным, и появляется фракция плазменного железа, не связанная с трансферрином. Она способствует образованию свободных радикальных групп, которые оказывают токсическое воздействие на различные органы и ткани.

Десфераловый тест подтверждает избыточное накопление железа в организме.

Электрофорез гемоглобина выявляет снижение фракции А до 10% (в норме – 96-97%) увеличение фракции F (фетального) гемоглобина до 50-90% (норма 1-3%) и небольшое увеличение А2 фракции (норма 2-4%).

Молекулярно-биологические методы выявляют мутации генов, кодирующих синтез полипептидных цепей, тип наследования.

Картина костного мозга

В костном мозге наблюдается гиперплазия красного ростка кроветворения, костномозговой лейкоэритроэритробластический индекс составляет 0,2-0,5: 1 (в норме 2,5-4,0:1), отмечается появление мегалобластов (из-за недостатка фолиевой кислоты) и значительное увеличение количества сидеробластов (нормальное количество 20-40%).

В моче наблюдается уробилинурия, каловые массы имеют насыщенный темный цвет за счет повышения уровня стеркобилина.

Для гетерозиготной бета-талассемии (малой талассемии) характерны такие же клинические и лабораторные проявления, как и для гомозиготной, но они выражены слабее. Нет изменений скелета, характерных для гомозиготной формы заболевания. При гетерозиготной форме гемолитической анемии, заболевание впервые может проявить себя во взрослом возрасте, известны случаи бессимптомного течения заболевания.

Диагноз устанавливается на основании результатов определения малых фракций гемоглобина HbA₂ и HbF. Электрофорез гемоглобина выявляет увеличение фракции A₂ до 5-9%, небольшое увеличение фетального гемоглобина до 2,5-7%. В отличие от железодефицитной анемии при малой бета-талассемии наблюдается компенсаторное увеличение эритроцитов. При малой талассемии нет дефицита или избытка железа.

Лабораторная диагностика серповидноклеточной анемии

Качественные гемоглобинопатии - анемии, связанные с нарушением структуры цепей глобина - это группа заболеваний, обусловленных заменой одной или нескольких аминокислот в цепи глобина, отсутствием участка цепи или ее удлинением. Как правило, заболевания наследуются по аутосомно-доминантному типу. К клинически выраженным гемоглобинопатиям, проявляющимся гемолизом, чаще всего приводят одиночные аминокислотные замены в бета-цепях.

Этиология. Патогенез

В 1949 г. при исследовании фракций гемоглобина при серповидноклеточной анемии обнаружили менее подвижную по сравнению с гемоглобином А фракцию и назвали ее S - гемоглобином. В 1956 г. Ingram и соавторы открыли, что аномальный гемоглобин S образуется вследствие мутации гена, локализованного на хромосоме 11. В результате мутации наблюдается нарушение строения бета – цепи глобина - замена в бета - полипептидной цепи глютаминовой кислоты на валин. При гомозиготном носительстве патологического гена развивается серповидноклеточная анемия, при гетерозиготном – серповидноклеточная аномалия.

Для нормальной циркуляции эритроцитов необходимо, чтобы при разном уровне оксигенации крови гемоглобин оставался в растворимой форме. Если эритроциты содержат преимущественно гемоглобин S, то в условиях пониженной концентрации кислорода (например, при прохождении по сосудам селезенки, печени, суставов) патологический гемоглобин S полимеризуется с образованием кристаллов, повреждающих мембрану эритроцитов. Причиной этого является низкая растворимость аномального гемоглобина и выпадение его в осадок. Это приводит к тому, что эритроциты необратимо деформируются и приобретают форму серпов. Продолжительность жизни эритроцитов при гомозиготном носительстве снижается и составляет 17-20 дней, эритроциты легко подвергаются гемолизу с развитием тяжелой гемолитической анемии. Феномен серповидноклеточности приводит к поражению и других клеток – эндотелия, лейкоцитов, активирует факторы свертывания, запускает цитокиново - воспалительный каскад.

При гетерозиготном носительстве продолжительность жизни эритроцитов нормальная, но характерным является замедление кровотока, повышение вязкости крови и развитие гипоксии, стимулирующее образование серповидноклеточных эритроцитов и нарушение кровоснабжения жизненно важных органов.

Клиника

Гомозиготная форма гемоглинопатии S начинает проявляться в период с 3 по 6 месяцев после рождения, когда происходит замена фетального гемоглибина на гемоглибин А. При серповидноклеточной анемии гемоглибин S составляет 90%. Клиническая картина складывается из умеренной номохромной анемии и тромботических осложнений. При серповидноклеточной анемии наблюдается бледность кожных покровов, желтушность кожи и склер с возрастом она нарастает, наблюдается увеличение печени и селезенки. Наиболее характерными симптомами является поражение костно-суставной системы – резкая болезненность суставов, припухлость стоп, голеней, кистей, образование трофических язв, сильные абдоминальные боли, нарушение зрения, инсульты, обусловленные тромбозами сосудов. Еще одним характерным для данного заболевания проявлением является острый синдром грудной клетки, который проявляется лихорадкой, болью в груди, гипоксией и инфильтрацией легких. Характерно также раннее развитие почечных дисфункций. В результате нарушения микроциркуляции и формирования очаговых инфарктов в ряде органов постепенно развивается фиброз.

Дети отстают в физическом, психическом и половом развитии от своих сверстников.

Гетерозиготное носительство протекает доброкачественно, без клинических проявлений. Патологический гемоглибин составляет 20-40% от всего гемоглибина, остальная часть представлена гемоглибином А. Заболевание проявляется в высокогорных районах на фоне снижения кислорода в атмосферном воздухе. В этих случаях могут быть тромботические осложнения.

Диагностика

Картина периферической крови вне криза

Умеренная номохромная анемия, феномен серповидности вне криза плохо виден в мазках периферической крови, поэтому обнаруживается редко. Для выявления серповидноклеточных эритроцитов используют пробы:

1. Кровь смешивают на предметном стекле с 2% раствором гипосульфита натрия или метабисульфита 1:1, покрывают покровным и тщательно смазывают края вазелиновым маслом, создавая анаэробные условия. Через 24 и 48 часов каплю просматривают под микроскопом, используя объектив х40. Проба считается положительной, если эритроциты постепенно приобретают форму серпа или полулуний.

2. Основание пальца пережимают жгутом в течение 5 минут, берут кровь, выполняют мазок крови и просматривают под микроскопом неокрашенным. В результате искусственной локальной гипоксии в крови образуются серповидноклеточные эритроциты.

3. Проба на растворимость гемоглобина с дитионитом: в присутствии дитионита гемоглобин S превращается в дезоксигемоглобин S, который в высокомолярном фосфатном буфере выпадает в осадок. В присутствии гемоглобина S раствор становится мутным, в отсутствии – остается прозрачным.

Картина крови во время криза

Наблюдается глубокая анемия – гемоглобин 50-60г/л, эритроциты $1,5-2 \times 10^{12}$ /л, пойкилоцитоз за счет серповидноклеточных эритроцитов, встречаются эритроциты в виде овсяных зерен, полихроматофилия.

Ретикулоцитоз – 20-30% ретикулоцитов в периферической крови, наличие большого количества нормобластов.

Отмечается лейкоцитоз со сдвигом влево, тромбоцитоз, скорость оседания эритроцитов замедлена.

При биохимическом исследовании крови наблюдается гипербилирубинемия за счет неконъюгированного билирубина, увеличение свободного гемоглобина, сывороточного железа, повышение активности печеночных ферментов, снижение гаптоглобина.

Для выявления аномального гемоглобина у новорожденных используют:

1. Электрофорез исследуемого образца крови в кислой и щелочной среде для выявления разных форм гемоглобина, основанный на различии в их скорости движения в электрическом поле.

2. Изоэлектрическое фокусирование образцов крови, при этом движение гемоглобина прекращается в зоне изоэлектрической точки, т.е. в зоне такого значения рН, при котором суммарный заряд молекулы гемоглобина равен нулю. У здоровых новорожденных образуется две полосы, соответствующие фракции гемоглобина А и F, у больных с серповидноклеточной анемией - F и S, тогда как у больных с серповидноклеточной аномалией – три полосы, соответствующие фракциям гемоглобинов А, F, S.

Картина костного мозга

Наблюдается гиперплазия красного ростка кроветворения, выраженная эритронормобластическая реакция.

Во время криза в моче отмечается уробилинурия, протеинурия, наличие цилиндров. При гетерозиготной форме заболевания может быть спонтанная гематурия (за счет мелких инфарктов сосудов почек).

Лабораторная диагностика апластических анемий

Апластическая анемия – тяжелое заболевание кроветворной системы, характеризующееся недостаточностью костномозгового кроветворения и глубокой панцитопенией в периферической крови.

Эпидемиология

Заболевание впервые описано П. Эрлихом в 1889 г. Встречается с разной частотой в разных регионах мира, в среднем наблюдается 2 случая на 1 000 000 населения в год. Апластическая анемия наблюдается во всех возрастных группах.

Классификация

I. Варианты апластической анемии в зависимости от этиологического фактора:

- 1) наследственные;
- 2) приобретенные:
 - идиопатическая апластическая анемия;

- с предполагаемым этиологическим фактором;
- вторичные апластические анемии на фоне системных аутоиммунных заболеваний.

II. Классификация апластической анемии в зависимости от течения заболевания:

- острая апластическая анемия;
- хроническая апластическая анемия.

III. Варианты апластической анемии в зависимости от тяжести заболевания (в соответствии с «критериями Camtta», 1979 г.):

1. Умеренно тяжелая апластическая анемия (нетяжелая).

В периферической крови:

- гранулоцитов более $0,5 \times 10^9/\text{л}$;
- тромбоцитов более $20 \times 10^9/\text{л}$;
- ретикулоцитов более 1%.

В костном мозге наблюдается сочетание участков с пониженной клеточностью и сохраненным кроветворением.

2. Тяжелая апластическая анемия.

В периферической крови:

- гранулоцитов менее $0,5 \times 10^9/\text{л}$;
- тромбоцитов менее $20 \times 10^9/\text{л}$;
- ретикулоцитов менее 1%.

В костном мозге наблюдается аплазия костного мозга, клеточность снижена на 30% от нормального количества. Тяжелая форма апластической анемии устанавливается при наличии двух любых из перечисленных критериев.

3. Сверхтяжелая апластическая анемия.

Для установления варианта используются все критерии, перечисленные в случае первого варианта, кроме количества гранулоцитов, которое при сверхтяжелом варианте составляет менее $0,2 \times 10^9/\text{л}$. Отмечается глубокая панцитопения до единичных клеток в мазке.

В костном мозге количество миелокариоцитов менее $15 \times 10^9/\text{л}$, отсутствуют пролиферирующие клетки, часто повышено количество плазматических клеток.

При трепанобиопсии выявляют только жировую ткань.

Этиология

Этиологические факторы, вызывающие заболевание до конца не изучены. Предполагается, что причиной развития апластической анемии является:

– прием лекарственных препаратов (сульфаниламиды, антибактериальные, противотуберкулезные препараты, неспецифические противовоспалительные средства, противодиабетические);

– влияние химических соединений (бензол, лаки, пестициды);

– вирусы (вирусы гепатитов, герпеса, парвовирус 19, цитомегаловирус);

– воздействие физических факторов.

Из числа эндогенных факторов, угнетающих гемопоэз – нарушение функции яичников, щитовидной железы, тимуса.

Развитие заболевания связывают также с генетическими аномалиями, которые в 26% случаев встречаются при апластических анемиях.

Как один из механизмов повреждающего воздействия на кроветворение и развитие апластической анемии рассматривается нарушение экспрессии нитрооксидсинтетазы, выявляемое в мононуклеарных клетках костного мозга больных апластической анемией. Снижение нитрооксидсинтетазы ведет к повышению концентрации оксида азота, который оказывает токсическое действие на клетки костного мозга.

Патогенез

Представление о развитии апластической анемии сформировалось в семидесятые годы прошлого столетия и остается открытым до сих пор.

Предполагаемые механизмы развития апластической анемии:

- вследствие дефекта стволовых кроветворных клеток (уменьшение количества клеток, экспрессирующих маркер CD 34, характерный для ранних гемопоэтических клеток-предшественников, снижение колониеобразующей способности клеток-предшественников гемопоэза);

- вследствие снижения чувствительности гемопоэтических клеток к факторам роста, и в целом к воздействию регуляторных механизмов;

- нарушение регуляции кроветворения иммунокомпетентными лимфоидными клетками; наблюдается уменьшение Т-лимфоцитов хелперов (CD4+) и высокий уровень цитотоксических Т-лимфоцитов (CD 8+), продуцирующих фактор некроза опухоли, гамма-интерферон, которые угнетают гемопоэз и подавляют образование гемопоэтических колоний;

- индукция апоптоза, так как на поверхности гемопоэтических клеток отмечается повышенная экспрессия рецепторов, являющихся маркерами апоптоза (CD 95+).

Совместный эффект всех механизмов приводит к снижению чувствительности гемопоэтических клеток к факторам роста и механизмам регуляции гемопоэза, нарушению жизнеспособности гемопоэтических клеток и аплазии костного мозга.

Клиника

В клинической картине заболевания отмечают:

- анемический синдром (одышка, тахикардия, слабость, головокружение);

- геморрагический синдром (кровоподтеки, петехии, носовые кровотечения);

- частые инфекции, воспалительные процессы (локальные и генерализованные) за счет нейтропении.

Клинические симптомы развиваются в зависимости от того, какой росток кроветворения угнетается в первую очередь, а затем присоединяются симптомы, характерные для угнетения других ростков кроветворения. Не характерно увеличение печени и селезенки.

Диагностика

Картина периферической крови

Нормохромная, нормоцитарная анемия с резким снижением количества гемоглобина (25-80 г/л), эритроцитов $0,7-2,5 \times 10^{12}/л$. Среднее содержание гемоглобина в эритроците (МСН), средняя концентрация гемоглобина в эритроците (МСНС) в пределах референтных величин, средний объем эритроцитов (МСV) более

95 фл – наблюдается тенденция к макроцитозу. Количество ретикулоцитов снижено. Со стороны гранулоцитарного ряда наблюдается выраженная лейкопения, абсолютная нейтропения. В лейкоцитарной формуле отмечается относительный лимфоцитоз, увеличение количества эозинофилов. Со стороны тромбоцитарного ростка отмечается резко выраженная тромбоцитопения ($2,0-25,0 \times 10^9/\text{л}$). Наблюдается значительное ускорение оседания эритроцитов – СОЭ -50-70 мм/час. Характерной особенностью апластической анемии является то, что при свертяжем варианте апластической анемии не наблюдается морфологических изменений со стороны клеток эритроидного, гранулоцитарного ряда, не выходят в периферическую кровь нормобласты

Картина костного мозга

Аплазия костного мозга, единичные очаги кроветворения. Резко снижено количество миелокариоцитов (менее $40,0 \times 10^9/\text{л}$), мегакариоцитов, наблюдается нарушение функции мегакариоцитов образовывать тромбоциты.

На фоне снижения абсолютного числа гранулоцитов наблюдается относительное увеличение количества лимфоцитов, плазматических клеток. Эритропоэз характеризуется абсолютным уменьшением количества эритрокариоцитов и нарушением их дифференцировки. Количество сидеробластов повышено.

Трепанобиопсия

Костномозговые синусы заполнены жировой тканью, наблюдается увеличение количества стромальных клеток.

Дифференциальный диагноз проводится с острыми лейкозами и другими заболеваниями, которые сопровождаются панцитопенией. При остром лейкозе в костном мозге наблюдается тотальная бластная гиперплазия. Для подтверждения диагноза острого лейкоза используются цитохимические, цитогенетические, молекулярно-генетические исследования.

Парциальная красноклеточная аплазия

Редкое гематологическое заболевание, характеризующееся избирательной аплазией эритроидного ростка костного мозга и развитием нормохромной, макроцитарной анемией, ретикулоцитопенией. Парциальная красноклеточная аплазия может быть наследственной и приобретенной. Наследственная парциальная красноклеточная анемия Даймонда – Блэкфана – врожденная форма эритроидной аплазии семейного характера с аутосомно-доминантным или рецессивным наследованием. Встречается с частотой 5-7 случаев на 1 000 000 населения в год.

Этиология заболевания до конца не изучена. Предполагается, что заболевание возникает в результате мутаций, наследственных дефектов или развивается без всяких причин, ассоциировано с лимфомами, лейкозами, вирусными гепатитами, с приемом лекарственных препаратов.

Патогенез

Предполагается, что эритроидная аплазия связана с прямым или косвенным подавлением созревания клеток красного ростка кроветворения. В основе лежат иммунологические механизмы развития заболевания, что подтверждается наличием аутоантител к клеткам-предшественникам эритропоэза.

Клиника

Анемия выявляется на 1-3 месяце жизни, сочетается с черепно-лицевыми аномалиями, отставанием пациентов в росте. Психомоторное развитие ребенка не нарушается. Отмечается гепатоспленомегалия, вторичный гемохроматоз (на фоне частых гемотрансфузий), лимфатические узлы не увеличены, нет геморрагических проявлений.

Диагностика

Картина периферической крови

Наблюдается нормохромная макроцитарная анемия, снижение количества ретикулоцитов, повышение количества

сидероцитов. Количество лейкоцитов, тромбоцитов находится в пределах референтных величин.

В сыворотке крови увеличено количество сывороточного железа, эритропоэтина.

Иммунофлюоресцентный метод выявляет антитела к эритрокариоцитам.

Картина костного мозга

Костный мозг нормоклеточный, отмечается изолированный дефицит клеток эритроидного ростка. У некоторых пациентов наблюдаются признаки неэффективного эритропоза с нарушением созревания эритроидных клеток на стадии полихроматофильных нормобластов, отмечается увеличение количества сидеробластов. Гранулоцитопоз не нарушен, количество мегакариоцитов в норме.

Для уточнения диагноза используются молекулярно-генетические исследования, иммуногистохимические методы и метод проточной цитометрии.

Наследственная апластическая анемия Фанкони

Характерным является сочетание прогрессирующей костномозговой недостаточности на фоне множественных врожденных соматических аномалий. Заболевание встречается с одинаковой частотой, как у мальчиков, так и у девочек – 1:3000 населения. Наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Врожденные пороки встречаются у 70-80% пациентов – пороки развития костной системы (добавочный палец, отсутствие фаланг и другие), пороки строения черепа (микроцефалия), зрительного аппарата (микрофтальмия) врожденные аномалии скелета, диспигментация кожи, пороки половой, мочевыделительной системы, задержка психического развития. Отмечается анемический, геморрагический синдромы различной степени выраженности, инфекционные осложнения. Характерным для анемии является высокая чувствительность клеток к ДНК-повреждающим агентам, что сопровождается нестабильностью генома.

Диагностика

Картина периферической крови

Отмечается панцитопения: нормохромная нормоцитарная анемия, ретикулоцитопения, лейкопения, тромбоцитопения.

Картина костного мозга

Вначале заболевания на фоне раздражения костного мозга отмечается увеличение клеток лимфоцитарного ряда, плазматических клеток, базофилов, эозинофилов. Затем, по мере развития заболевания – панмиелофтиз – отсутствие костного мозга. В терминальной стадии наблюдается миелофиброз.

Лабораторная диагностика агранулоцитоза

Агранулоцитоз – клинико-гематологический синдром, характеризующийся снижением гранулоцитов в периферической крови до полного их исчезновения ($0,75 \times 10^9/\text{л} - 0$) на фоне снижения лейкоцитов до $1,0 \times 10^9/\text{л}$.

Различают:

- 1) миелотоксический агранулоцитоз;
- 2) иммунный агранулоцитоз;
- 3) идиопатический агранулоцитоз.

Миелотоксический агранулоцитоз

Этиология. Патогенез

Причинами, вызывающими агранулоцитоз, являются:

- лекарственные препараты;
- химические вещества;
- ионизирующее излучение;
- вирусные инфекции.

В результате воздействия факторов, угнетающих гранулоцитопоез, происходит подавление клеток - предшественников миелопоэза, с последующим нарушением пролиферативной активности, дифференцировки клеток гранулоцитарного ряда.

Быстрое снижение клеток нейтрофильного ряда приводит к нарушению клеточного и гуморального иммунитета и развитию инфекционно-воспалительных осложнений.

Клиника

Сначала наблюдается скрытый период заболевания, для которого характерны неспецифические клинические симптомы: слабость, повышенная утомляемость, снижение аппетита. Затем присоединяется лихорадка, язвенно-некротические поражения кожи и слизистых (стоматит, ангина и т.д.). Дальнейшее развитие заболевания сопровождается некробиотическими изменениями кожи и слизистых (некротический энтероколит, сепсис, перитонит и т.д.).

Диагностика

Картина периферической крови

В периферической крови отмечается анемия, ретикулоцитопения, снижение количества лейкоцитов. Сохранившиеся клетки гранулоцитарного ряда имеют выраженные дегенеративные изменения: токсогенную зернистость, пикноз ядер, вакуолизацию ядра и др. Отмечается снижение эозинофилов, базофилов. Отмечается тромбоцитопения.

Картина костного мозга

При миелотоксическом агранулоцитозе наблюдается этапность развития изменений в костном мозге:

- 1 этап – снижение количества зрелых форм нейтрофилов (палочкоядерных, сегментоядерных) при одновременном повышении миелоцитов – метамиелоцитов – миелоцитарно-метамиелоцитарный костный мозг;
- 2 этап – снижение количества миелоцитов и юных, увеличение количества промиелоцитов – миелоцитарно-промиелоцитарный костный мозг. Снижение общего количества клеток за счет нейтрофилов.
- 3 этап – панцитопения – подавление всех ростков кроветворения, сохраняется ретикулярный остов, в клетках наблюдаются дегенеративные изменения.

- 4 этап – в костном мозге обнаруживаются только адипоциты – жировое перерождение костного мозга;
- 5 этап – наблюдается отсутствие клеток в костном мозге – панмиелофтиз (отсутствие костного мозга), фиброз.

Костный мозг на 1-3 стадиях можно восстановить.

Появление в периферической крови молодых клеток – бластных клеток, промиелоцитов, миелоцитов – подтверждает выход из состояния агранулоцитоза.

Иммунный агранулоцитоз характеризуется гибелью гранулоцитов в результате выработки антител к клеткам гранулоцитарного ряда.

Различают:

- 1) гаптеновый агранулоцитоз;
- 2) аутоиммунный агранулоцитоз.

Гаптеновый агранулоцитоз

Лекарственные препараты, соединяясь с белками, приобретают антигенные свойства, в организме в ответ на такие комплексы вырабатываются антитела. При повторном введении препарата в сенсibilизированный организм гранулоциты разрушаются. Для данного варианта не характерно поражение эритроидного и тромбоцитарного ростков кроветворения.

Аутоиммунный агранулоцитоз

Данный вариант агранулоцитоза развивается на фоне аутоиммунных заболеваний – системной красной волчанки, ревматоидного артрита. К клеткам гранулоцитарного ряда развиваются аутоантитела с последующим развитием агранулоцитоза. В периферической крови наблюдается снижение гранулоцитов, моноцитов, в оставшихся клетках – выраженные дегенеративные изменения.

При выходе из аутоиммунного агранулоцитоза в периферической крови появляются крупные клетки похожие на промиелоциты, но с пылевидной зернистостью. На следующий день – морфологически характерные промиелоциты, а затем более зрелые гранулоциты, плазматические клетки, наблюдается моноцитоз. В течение недели состав крови восстанавливается.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ:

1. Методы клинических лабораторных исследований. Учебное пособие/ В. С. Камышников и др. / Под ред. В.С. Камышникова – 6- изд., перераб. – М. : Медпресс – генформ, 2013 – 736 с.: ил.
2. Лабораторная диагностика анемий. Учебно-методическое пособие / Т. С. Дальнова, С. Г. Василиу-Светлицкая; Мн. – 2011 – 14с.
3. Гематология: Новейший справочник / Под общей редакцией К. М. Абдулкадырова. М.: Издательство Эсмо; СПб: Издательство Сова. 2004.- 982 с., ил.
4. Гематологические анализаторы. Интерпретация анализа крови: Методические рекомендации / С. А. Луговская, М. Е. Почтарь, В. В. Долгов. – М.- Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2007. – 112 с., 115 ил.
6. Лабораторная диагностика анемий. – 2 издание, доп. / В. В. Долгов, С. А. Почтарь, В. Т. Морозова, М. Е. Почтарь.- М.- Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2009. – 148 с., 92 ил.
7. Гематологический атлас. 3 издание, дополненное / С.А. Луговская, М.Е. Почтарь. – Москва-Тверь: ООО «Издательство «Триада». 2011. – 368 с. 1620 ил.
8. Гематология: руководство для врачей/ под редакцией Н. Н. Мамаева, С. И. Рябова. – СПб.: СпецЛит, 2008. – 548 с.:ил.
9. Механизмы развития болезней и синдромов. Учебное пособие. Книга 1/ А. Ш. Зайчик, Л. П. Чурилов. – СПб: ЭЛБИ-СПб.- 507 с., ил.
10. Практическая и лабораторная гематология / С. М. Льюис, Б. Бэйн, И. Бэйтс; пер. с англ. под ред. А. Г. Румянцева. – М.: ГОЭТАР-Медиа, 2009. – 672 с.: ил.
11. С. Бетти. Руководство по лабораторной гематологии. Перевод с английского под общей редакцией А. И. Воробьева. – М.: Практическая медицина. 2011. – 352.: ил.
13. Гемостазиология в клинической и лабораторной практике: учебное пособие/ В. С. Камышников (и др.). – Минск: Адукацыя і выхаванне, 2011. – 320с.: ил.

Учебное издание

Степень Татьяна Петровна
Лелевич Сегрей Владимирович

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ГЕМАТОЛОГИЯ

*Пособие для студентов
медико-диагностического факультета
(специальность 1-79 01 04 Медико-диагностическое дело)
с приложением на компакт-диске*

Ответственный за выпуск: В. В. Воробьев

Компьютерная верстка С. В. Петрушиной
Корректор Л. С. Засельская

Подписано в печать 02.06.2016.
Формат 60x84/16. Бумага офсетная.
Гарнитура Таймс. Ризография.
Усл. печ. л. 13,48. Уч.-изд. л. 10,06. Тираж 50 экз. Заказ 49.

Издатель и полиграфическое исполнение
учреждение образования
«Гродненский государственный медицинский университет»
ЛП № 02330/445 от 18.12.2013.
Ул. Горького, 80, 230009, Гродно.