

*Запорізький державний медичний університет
Кафедра клінічної лабораторної діагностики*

Методи дослідження та клінічний аналіз мієлограм.

Диференційна діагностика анемічних станів

доц. Горбачова С.В.

2016 – 2017 н.р.

Мієлограма - процентний вміст мієлокаріоцитів у кістковому мозку

- *Кістковий мозок досліджують для:*
 - *підтвердження та встановлення діагнозу різних форм анемій та гемобластозів*
 - *Ураженні його туберкульозом, гістіоцитозами, метастазами пухлин*
- *Дослідження проводять у динаміці, обов'язково зіставляючи її з показниками периферичної крові*

- *Кістковий мозок отримують за допомогою аспіраційної біопсії в області грудини на рівні третього-четвертого міжребер'я або в області рукоятки грудини, а також гребеня або бугристості клубової кістки.*
- *Місце проколу обробляється йодом або іншим антисептиком.*
- *Проводиться місцева анестезія 1-2% розчином новокаїну пошарово: шкіра-підшкірна клітковина - окістя.*

- Пункція кісткового мозку проводиться лікарем у стерильній операційній при дотриманні правил асептики.
- Голку Касирського вводять строго перпендикулярно поверхні грудини в кістково-мозковий канал;
- щиток голки встановлюють на відстані 0,8 - 2 см від грудини в залежності від конституції пацієнта.
- Після вилучення мандрена з голки на неї насаджується 10-20-мілілітровий шприц і проводиться аспірація кісткового мозку, після чого голку витягують і обробляють місце проколу антисептиком.



- *Кількість аспірованої суспензії клітин залежить від обсягу та характеру передбачуваних досліджень.*
- *Для цілей морфологічної діагностики достатньо 0,1-0,2 мл, щоб уникнути домішок крові,*
- *однак для проведення цитогенетичних, культуральних, імунологічних, цитохімічних та інших досліджень потрібно кілька мілілітрів кісткового мозку*

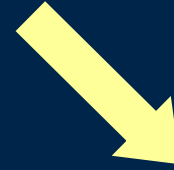
- *Кістковий мозок зі шприца поміщають на предметне скло і частину матеріалу негайно вносять у пробірки для подальших досліджень.*
- *Відразу після цього на предметних стеклах кутом шліфувального скла роблять тонкі мазки для оцінки клітинного складу кісткового мозку.*
- *Щоб уникнути зсідання кісткового мозку всі перелічені процедури робляться дуже швидко.*

Червоний кістковий мозок



Клітини ретикулярної
строми (не $>2\%$)

- Фібробласти
- Osteобласти
- Жирові клітини
- Клітини, позбавлені точної морфологічної визначеності



Клітини
гемопоетичної
тканини



Клітини гемопоетичної тканини

- еритробласт – пронормоцит – нормоцит базофільний – нормоцит поліхроматофільний - нормоцит оксифільний – ретикулоцит – еритроцит
- мегакаріобласт – промегакаріоцит – мегакаріоцит – тромбоцити.
- лімфобласт – пролімфоцит – лімфоцит
- монобласт – промоноцит – моноцит
- мієлобласти – промієлоцит нейтрофільний – мієлоцит нейтрофільний – метамієлоцит нейтрофільний – паличкоядерний нейтрофіл – сегментоядерний нейтрофіл
- мієлобласти - промієлоцит еозинофільний, мієлоцит еозинофільний – метамієлоцит еозинофільний – паличкоядерний еозинофіл – сегментоядерний еозинофіл
- Мієлобласти - промієлоцит базофільний – мієлоцит базофільний – метамієлоцит базофільний – паличкоядерний базофіли – сегментоядерний базофіл

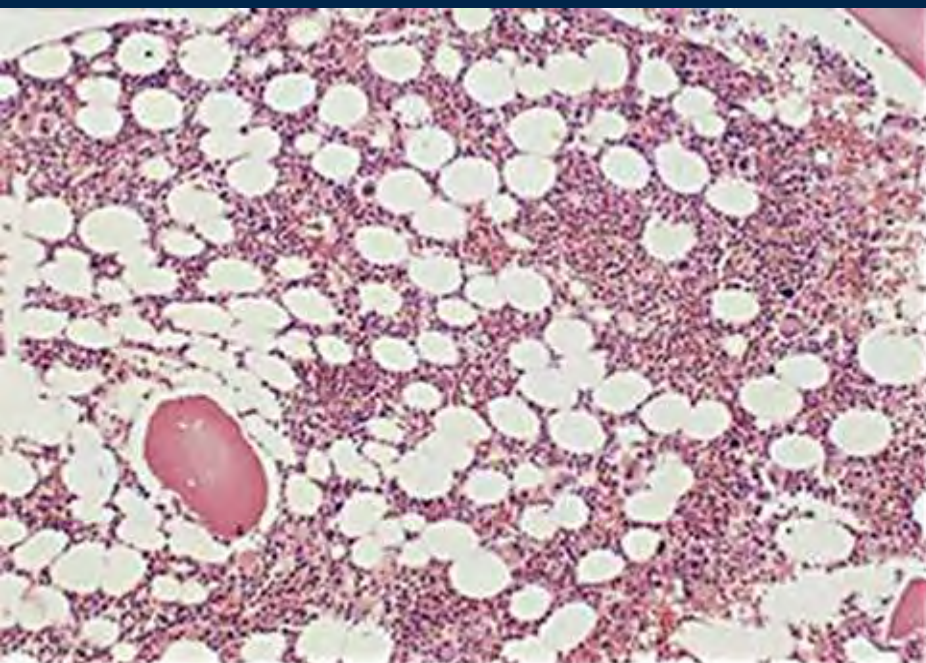
Методи підрахунку мієлограм

- **Метод Кост** – підраховують 500 або 1000 клітин лейкопоезу, окремо рахують клітини еритропоезу, а потім розраховують кількість клітин еритропоезу на 100 клітин лейкопоезу
- **Метод Арінкіна** – підраховують та диференціюють не менше 500 клітин усіх паростків, а потім визначають відсоток кожного виду клітин

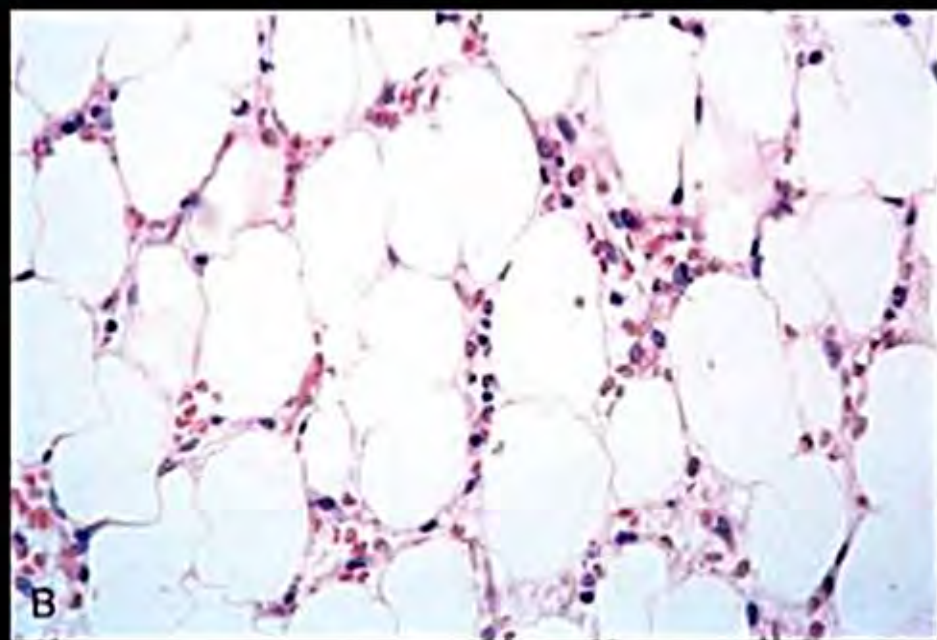
Показники мієлограми

1. Клітинність КМ

- оцінюється при малому збільшенні
- - гіпоклітинний, нормоклітинний, гіперклітинний



Нормальный костный мозг



При апластической анемии

Показники мієлограми

2. Лейко-еритро-співвідношення

3. Тип еритроїдної реакції в залежності від переваги того чи іншого виду клітин еритроїдного ряду: еритробластична, мегалобластична, пронормоцитарна, нормоцитарна

4. Кістковомозковий індекс дозрівання:

- нейтрофілів =
$$\frac{\text{промієлоцити} + \text{мієлоцити} + \text{метамієлоцити}}{\text{паличкоядерні} + \text{сегментоядерні нейтрофіли}}$$
- еритрокаріоцитів =
$$\frac{\text{поліхроматофільні} + \text{оксифільні нормоцити}}{\text{усі клітини еритропоезу}}$$

5. Визначення ступеня активності кісткомозкового кровотворення

- *В залежності від характеру і кількості мієлокаріоцитів:*
- *активний*
 - *гіперплазований (за одним або декількома ростками)*
 - *гіпопластичний*
- 

Цитохімічне дослідження КМ

- *Найбільш широко використовується у діагностиці різних форм гострих лейкозів*
- *Матеріалом є кістковий мозок та клітини периферичної крові*
- *У основі дослідження лежить здатність деяких речовин та ферментів вступати у реакцію з деякими фарбниками зі специфічним забарвленням*
- *У присутності в клітині досліджуваної речовини, ступеню активності ферменту дозволяє робити висновок про належність клітини до того чи іншого паростка*

- *Можливість проведення цитохімічної характеристики елементів гемопоєзу можливе лише з моменту морфологічного розпізнавання проліферативних клітин – це утворення еритробластів, мієлобластів, монобластів, лімфобластів.*
- *Перевага віддається реакціям, що мають діагностичне чи диференційно-діагностичне значення*

Основні цитохімічні реакції

- 1. Реакція на пероксидазу
- 2. Реакція на кислу фосфатазу
- 3. Реакція на неспецифічні естерази
- 4. Реакція на ліпіди
- 5. Реакція на складні вуглеводи (мукополісахариди, глікоген)

- По мірі дозрівання клітинних елементів гранулоцитопоезу активність різних ферментних систем, а також вміст глікогену та ліпідів підвищується
- Найбільш бідними у цитохімічному відношенні клітинами є лімфоцити.
- Лише незначна кількість лімфоцитів містить глікоген, кислу фосфатазу та альфа-нафтилацетатестеразу.
- У лімфоцитах ніколи не визначається активність мієлопероксидази та відсутні ліпіди

- При цитохімічному дослідженні використовується напівкількісна оцінка результатів (принцип Астальді), яка ґрунтується на визначенні різного ступеня інтенсивності специфічного забарвлення:
- (-) – негативна реакція;
- (+) – слабопозитивна реакція;
- (++) – позитивна реакція;
- (+++) – різко позитивна реакція

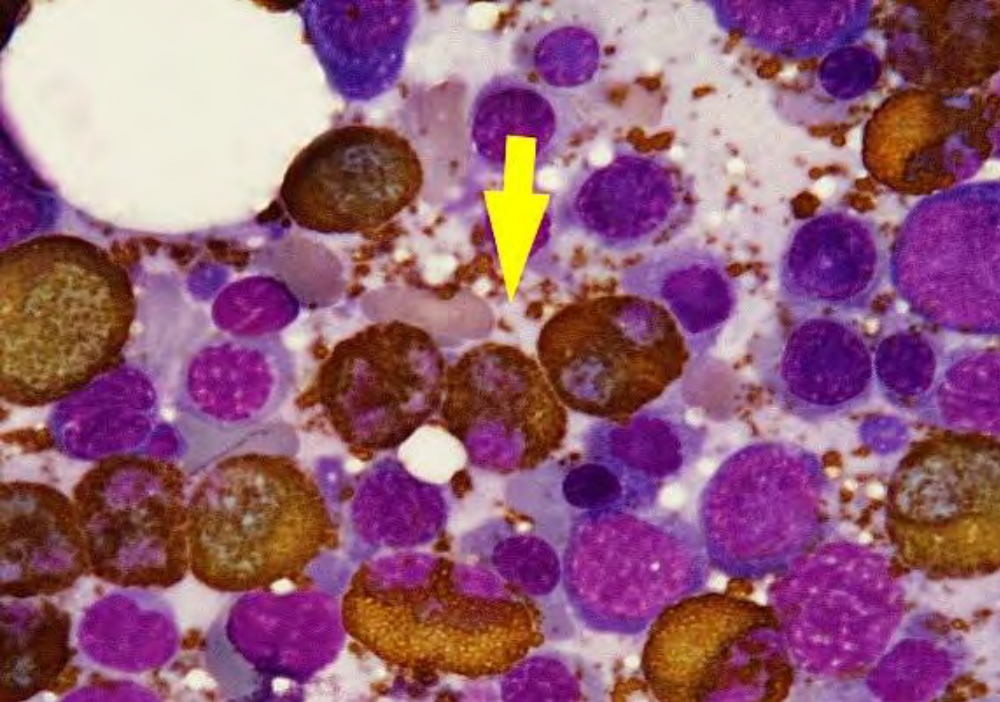
Реакція на мієлопероксидазу

- Мієлопероксидаза визначається у всіх клітинах гранулоцитарного ряду, починаючи з мієлобласту
- Активність ферменту зростає по мірі дозрівання клітин
- У сегментоядерних нейтрофілах здорових людей визначається висока активність МПО у вигляді гранул, що заповнюють усю цитоплазму
- У зрілих еозинофілів активність ферменту висока

Реакція на мієлопероксидазу

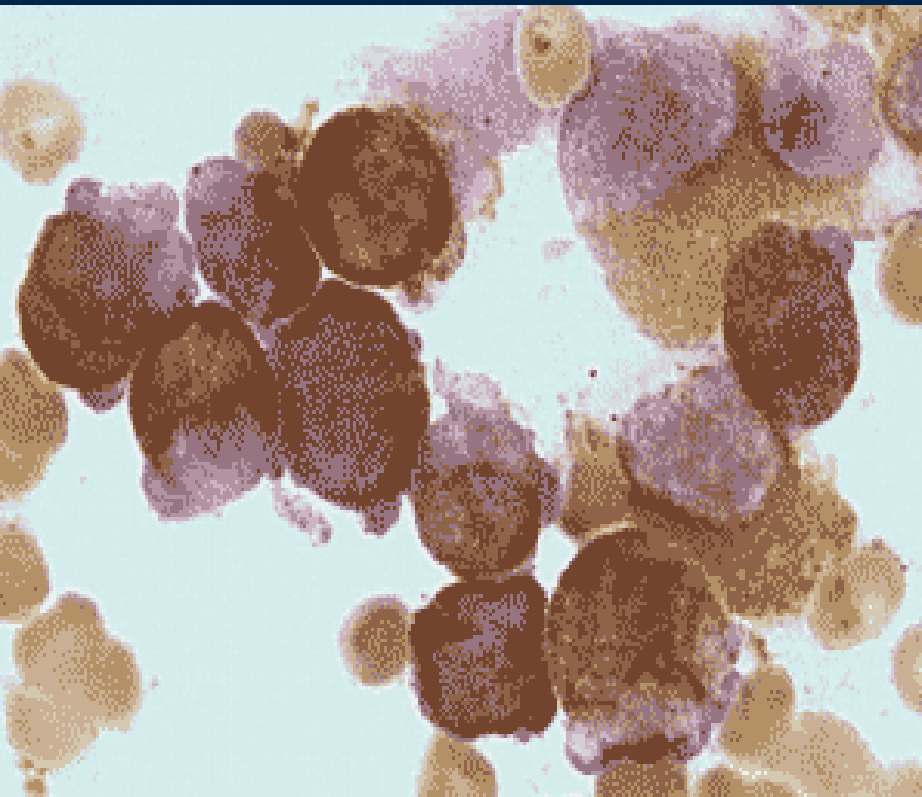
- У базофільних промієлоцитах і мієлоцитах активність МПО висока, але по мірі диференціації їх до зрілих форм активність ферменту знижується. Зрілі базофіли проявляють негативну, рідше слабопозитивну реакцію на МПО
- Слабопозитивна реакція спостерігається у різному процентному значенні моноцитів у вигляді малочисельних розсіяних гранул
- У еритрокаріоцитах, лімфоцитах та мегакаріоцитах МПО не визначається

- *Активність МПО дозволяє диференціювати мієлобласти та монобласти, які містять гранули з ферментом, від лімфобластів, які завжди показують негативну реакцію*
- *Активність МПО визначається у комплексі з іншими цитохімічними дослідженнями з метою об'єктивного встановлення походження клітин при різних лейкозах, які не можуть бути диференційовані при звичайному дослідженні*

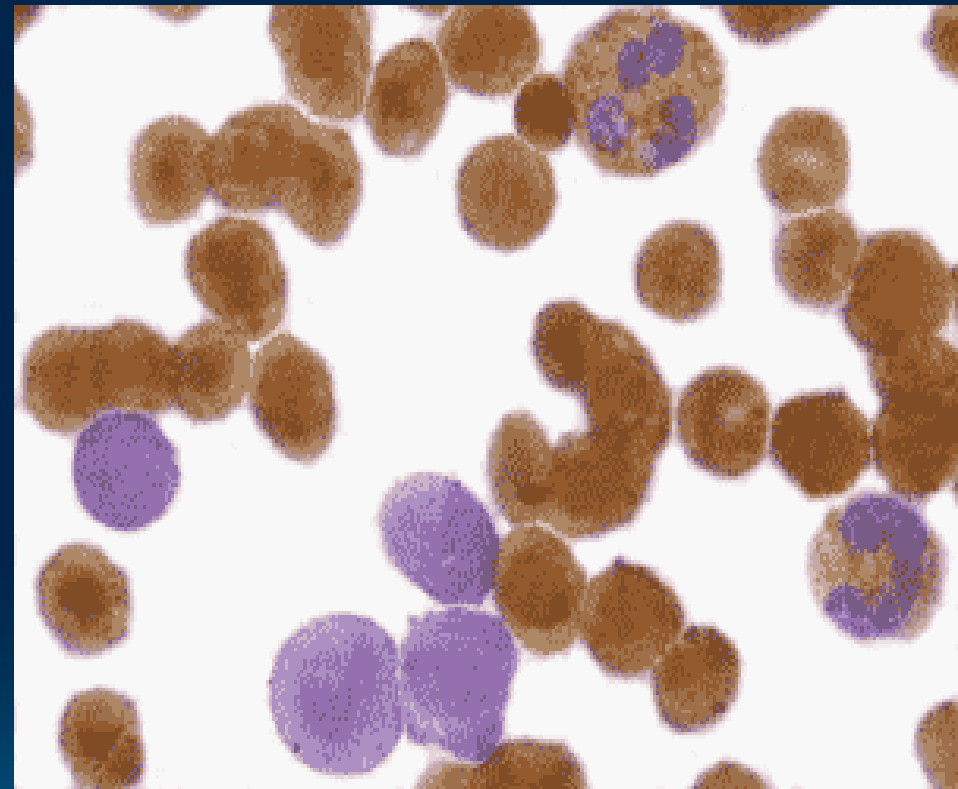


- Результат реакції:
- **МПО** забарвлюється у вигляді гранул синього кольору (при використанні бензидину) **або жовтого та коричневого кольору** (при використанні ортотолідину).

Реакція мієлобластів та інших клітин нейтрофільного ряду на пероксидазу



*Позитивна реакція на МПО у
бластах у КМ*



*Позитивна реакція на МПО у
нейтрофілах та негативна у
лімфобластах при гострому
лімфолейкозі*

Естерази

- Це неоднорідна група ферментів, які відрізняються один від одного по специфічності до субстрату, дії активаторів та інгібіторів
- У гематології найчастіше визначають α -нафтилацетатестеразу, хлорацетатестеразу, кислу α -нафтилацетатестеразу
- α -нафтилацетатестераза визначається у всіх клітинах мієлоїдного ряду, починаючи з мієлобласта
- Її активність визначається у всіх гранулоцитах, а також у незначній кількості лімфоцитів, еритрокаріоцитів, мегакаріоцитів та тромбоцитах
- Найбільш інтенсивна реакція визначається у моноцитах та макрофагах

Естерази

- Активність неспецифічної α -нафтилацетатестерази у клітинах моноцитарного ряду легко гальмується (інгібується) фторидом натрію, але залишається без змін у гранулоцитах
- Цей феномен дозволяє розрізнити клітини системи мононуклеарних фагоцитів від клітин інших ростків, які дають позитивну реакцію на цей фермент
- Кисла α -нафтилацетатестераза виявляється у процесі диференціювання Т-лімфоцитів у вигляді фокальної плями у цитоплазмі клітин

Реакція монобластів на альфа-нафтилацетатестеразу

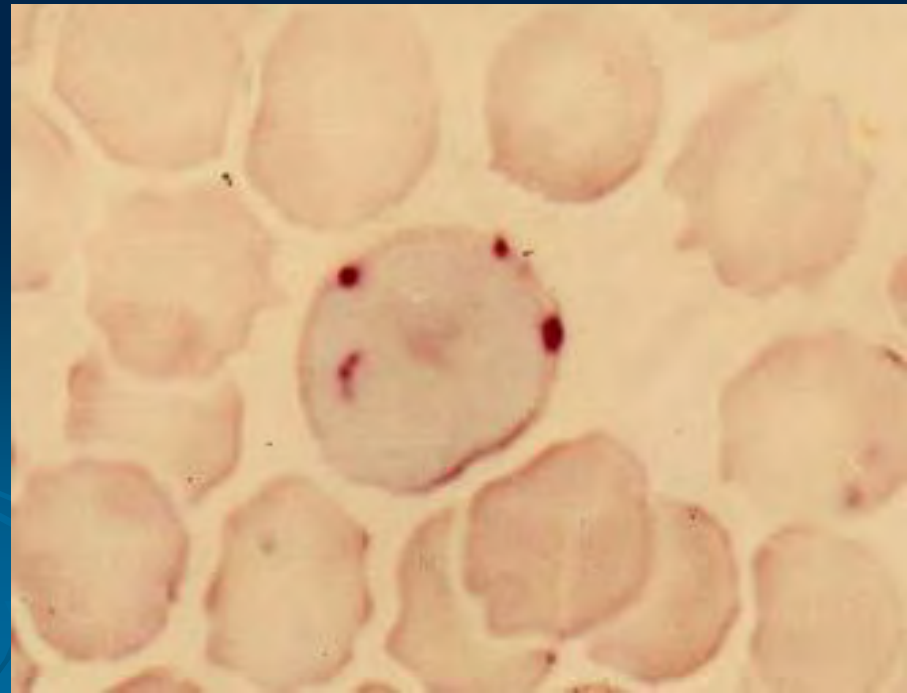
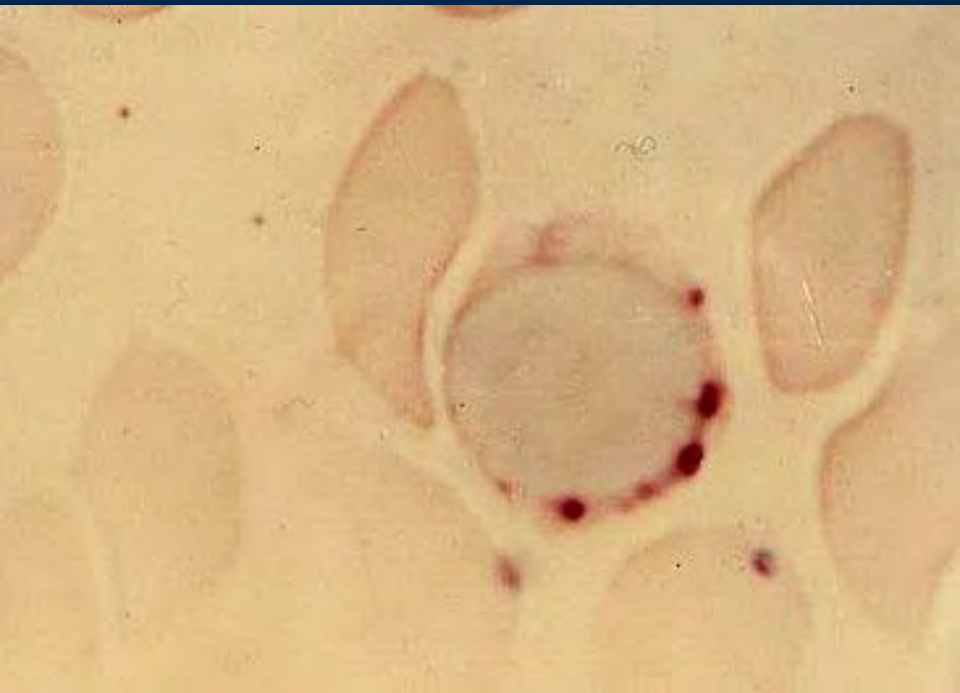


Кисла фосфатаза

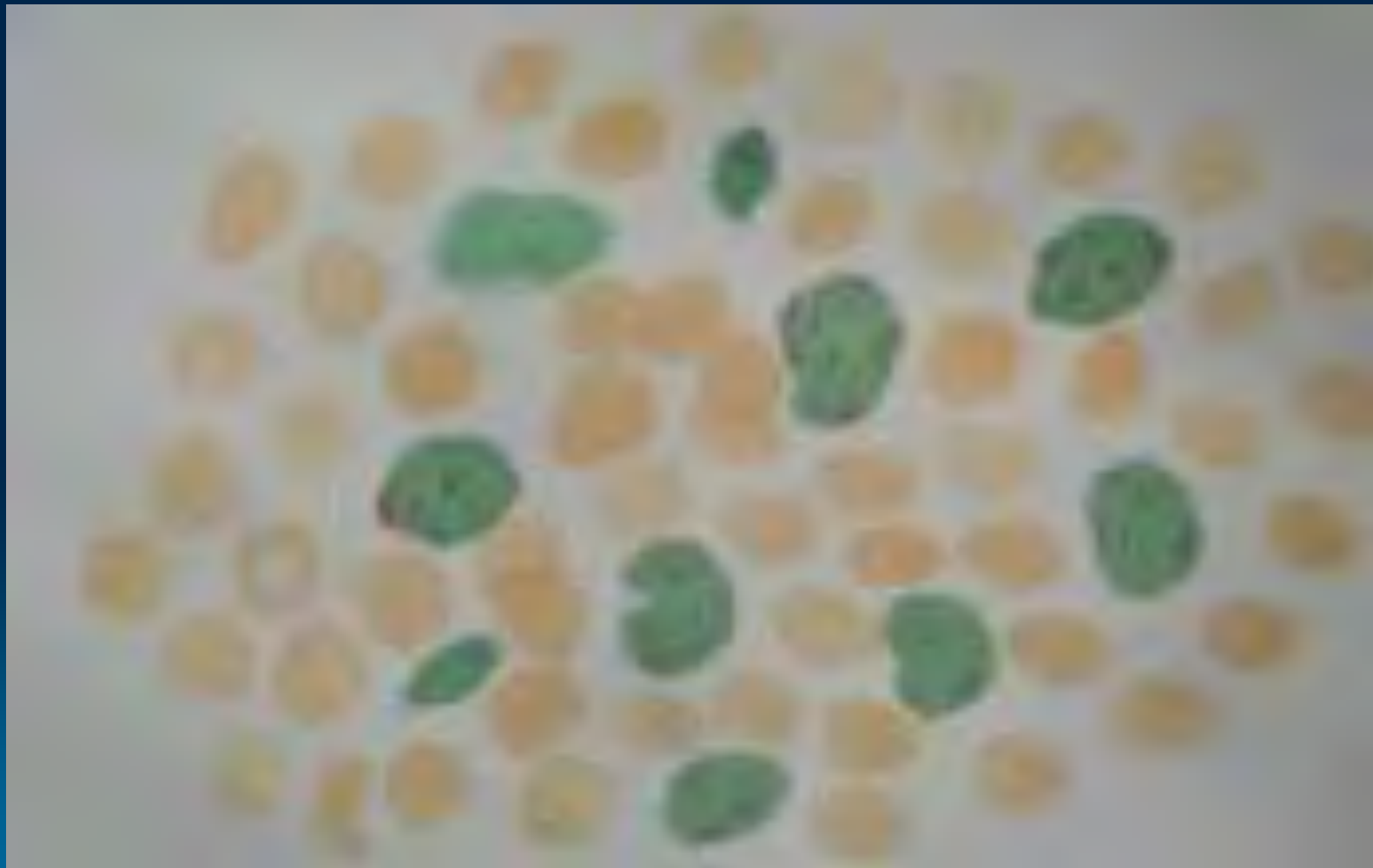
- Кисла фосфатаза визначається у всіх клітинах крові та бере участь у процесах синтезу та диференціювання клітин, фагоцитозу, піноцитозу або лізису.
- Плазматичні клітини виявляють різко позитивну реакцію на кислу фосфатазу у перинуклеарній зоні та в області апарату Гольджі

- *Нейтрофіли та еозинофіли по мірі дозрівання клітин втрачають активність кислої фосфатази. Зрілі клітини виявляють слабо позитивну або негативну реакцію*
- *T-лімфоцити, моноцити, макрофаги володіють високою активністю ферменту*
- *Висока активність ферменту визначається і у еритробластах та ретикулоцитах*
- *У еритроцитах реакція негативна*
- *Тромбоцити та мегакаріоцити виявляють різко позитивну реакцію*

- З метою цитохімічного дослідження використовують методи азосполучення
- У результаті в місцях локалізації ферменту утворюються гранули червоного або коричневого кольору на зеленому фоні



Реакція мієлобластів і монобластів на кислу фосфатазу



Реакція на ліпіди

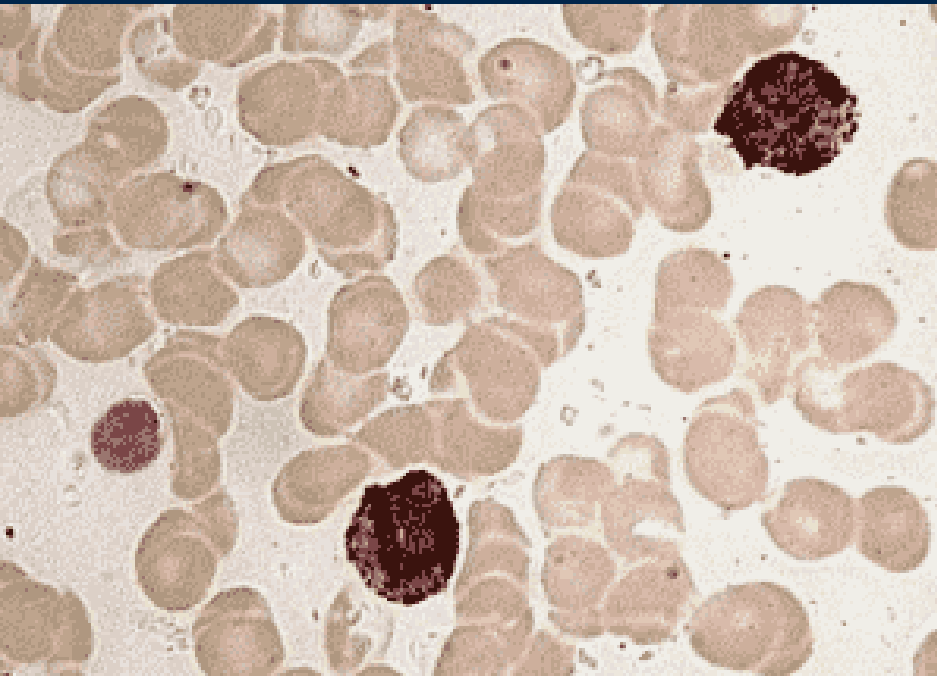
- Ліпіди визначаються практично у всіх лейкоцитах, за винятком лімфоцитів
- Однак основна маса ліпідів пов'язана з клітинами гранулоцитарного ряду
- Ліпіди входять до складу специфічних гранул та накопичуються по мірі дозрівання клітин
- У мієлобластах визначається незначна кількість гранул у перинуклеарній зоні
- У промієлоцитах їх стає більше
- У мієлоцитах та метамієлоцитах визначається значна кількість суданофільних гранул

Реакція на ліпіди

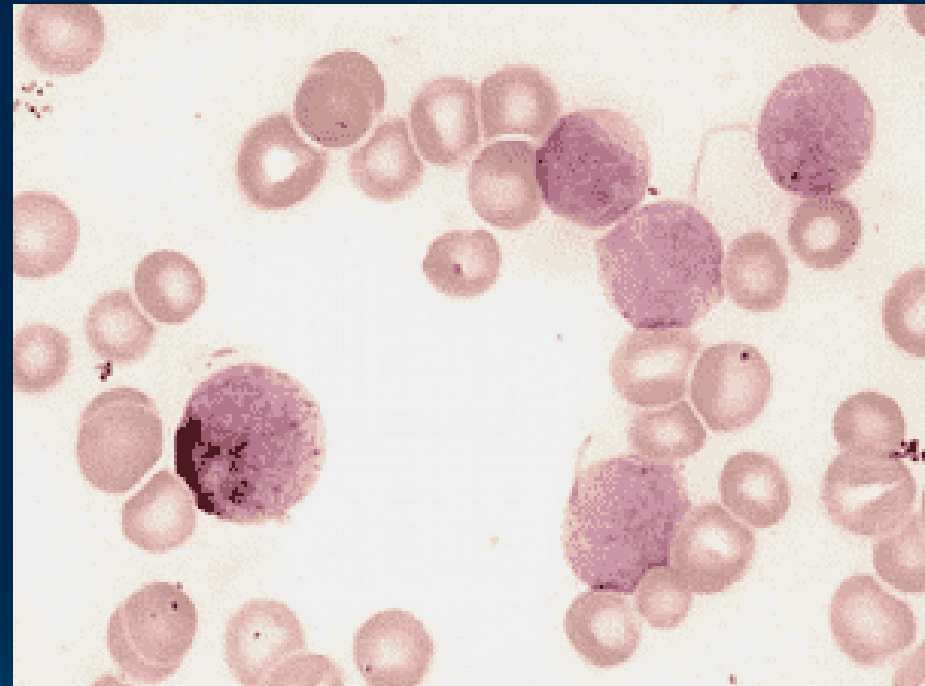
- У зрілих нейтрофілах ліпіди заповнюють всю цитоплазму
- У моноцитах та їхніх попередниках міститься різна кількість гранул різної величини, які розміщуються переважно навколо ядра або на периферії цитоплазми
- У клітинах лімфоцитарного ряду, еритрокаріоцитах, ретикулоцитах та еритроцитах ліпіди не виявляються

- Цитохімічне дослідження ґрунтується на використанні речовин, що розчинюються у жирах – судан III, судан IV, судан чорний та ін.).
- Для виявлення нейтрального жиру використовують судан III, який забарвлює його у помаранчевий колір
- Ліпоїди визначаються суданом чорним, який зафарбовує гранули у чорний колір

Реакція з суданом чорним на ліпіди



Позитивна реакція на ліпід у нейтрофілах та негативна у лімфоциті



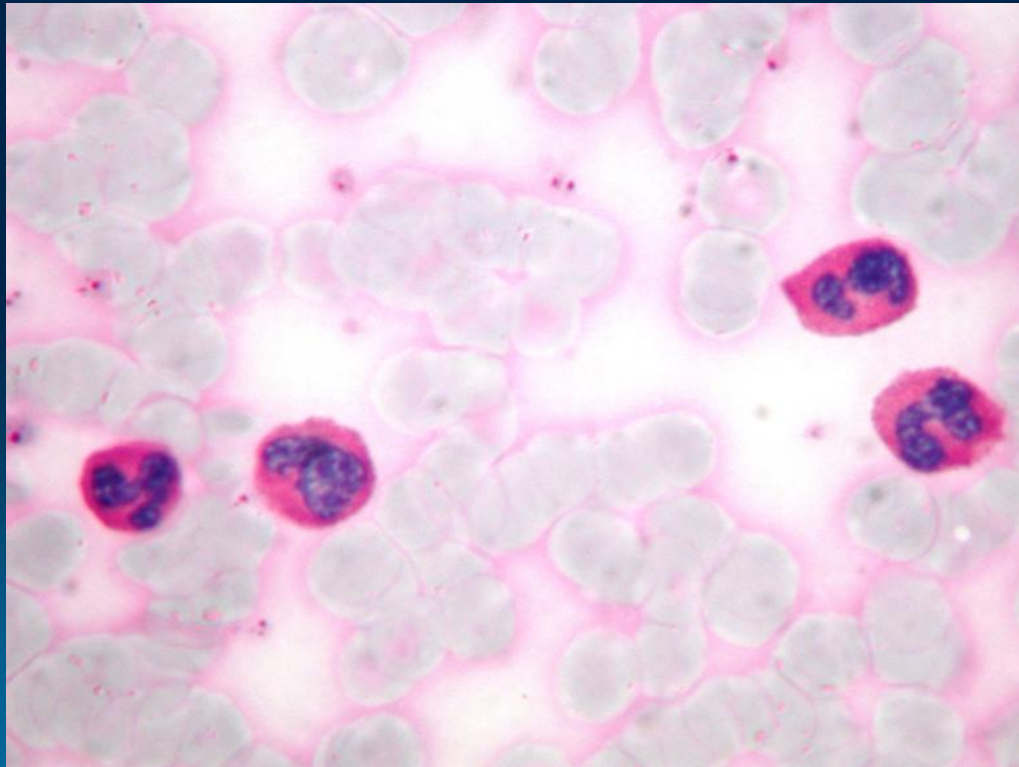
Позитивна реакція на ліпіди у бластах

PAS-реакція на мукополісахариди (глікоген)

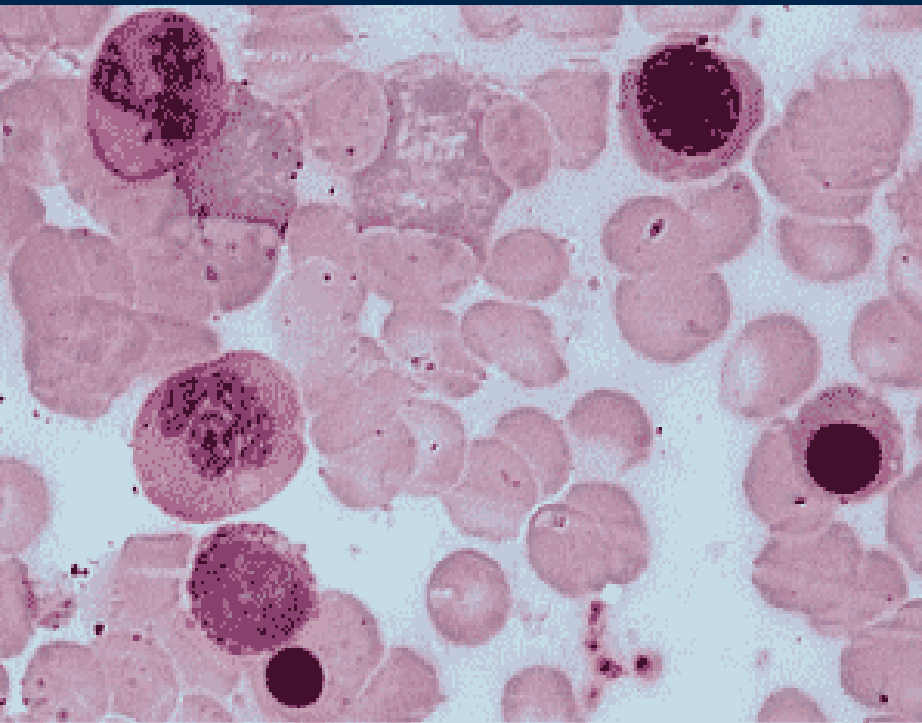
- *Глікоген є джерелом енергії для клітини*
- *Для його виявлення використовується PAS-реакція (ШИК-реакція).*
- *Максимальна кількість глікогену міститься у клітинах гранулоцитарного ряду. Виявляється починаючи з мієлобластів*
- *По мірі дозрівання клітин його кількість зростає*
- *Агранулоцити, як правило, не містять глікоген;*
- *У лімфоцитах визначається незначна кількість глікогену у вигляді чітких гранул*

- *Нормальні лімфобласти містять ще менше глікогену, ніж зрілі лімфоцити*
- *Моноцити містять глікоген у вигляді дрібної пилоподібної зернистості*
- *Еозинофільні лейкоцити – у незначній кількості, розміщений дифузно*
- *Нормальні клітини еритропоезу та плазматичні клітини глікоген не містять*

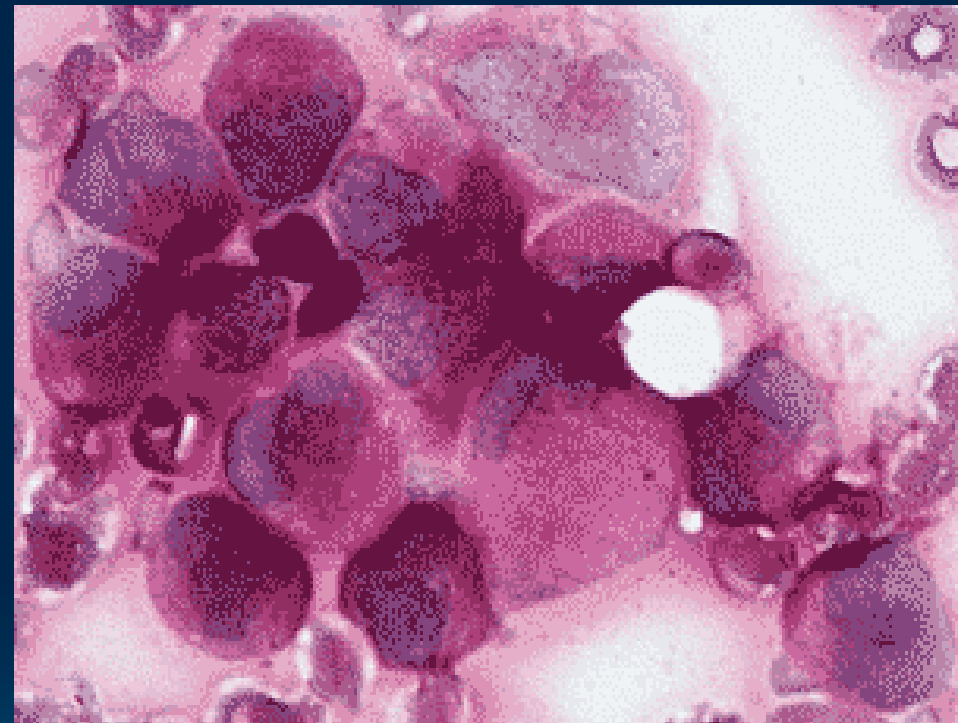
Принцип PAS-реакції ґрунтується на використанні реактиву Шиффа, який при взаємодії з похідними складних вуглеводів утворює сполуку червоного, вишнево-фіолетового кольору



PAS-реакція на мукополісахариди (глікоген)



*Дифузна PAS-реакція в
нейтрофілах,
гранулярна – у
лімфоциті*



*Дифузно-гранулярна
PAS-реакція у бластах*

Зміни показників КМ

- Підвищення вмісту мегакаріоцитів: мієлопроліферативні процеси, метастази злоякісних новоутворень в кістковий мозок.
- Підвищення значення співвідношення лейкоцити /еритроцити: хронічний мієлолейкоз, сублейкемічний мієлоз, лейкемоїдні реакції.

Зміни показників КМ

- Підвищення значення індексу дозрівання нейтрофілів: бластний криз, хронічний мієлолейкоз.
- Підвищення % бластів більш ніж 20%: гострий лейкоз.
- Підвищення % бластів до 20%: гострий лейкоз, мієлоїдний форми хронічного лейкозу, мієлодиспластичний синдром.

Зміни показників КМ

- **Підвищення промієлоцитів, мієлоцитів, метамієлоцитів:** хронічні мієлоїдні лейкози, лейкемоїдні реакції
- **Підвищення еозинофілів:** алергічні реакції, гельмінтози, злоякісні пухлини, гострий лейкоз, хронічний мієлолейкоз, лімфофанулематоз
- **Підвищення базофілів:** базофільний лейкоз, хронічний мієлолейкоз, еритремія.

Зміни показників КМ

- *Підвищення лімфоцитів: хронічний лімфолейкоз, апластична анемія.*
- *Підвищення моноцитів: хронічні мієлолейкози, моноцитарний лейкоз, туберкульоз, сепсис.*

Зміни показників КМ

- Підвищення плазматичних клітин більш ніж на 20%: мієломна хвороба.
- Підвищення плазматичні клітини до 20%: мієломна хвороба, апластична анемія, інфекції, імунний агранулоцитоз.
- Підвищення еритробластів: гемолітична, постгеморагічна, фолієводефіцитна і В12- дефіцитна анемії, гострий еритромієлоз

Зміни показників КМ

- **Зниження значення мегакаріоцитів в зразку пункції кісткового мозку:** гіпопластичні і апластичні, імунні і аутоімунні процеси, променеві та цитостатичні цитопенії.
- **Зниження коефіцієнту співвідношення лейкоцити /еритроцити:** гемоліз, крововтрата, еритремія, гострий еритромієлоз.
- **Зниження індексу дозрівання еритробластів:** В12-дефіцитна анемія, "неефективний" еритропоез при гемолізі, крововтрата

Зміни показників КМ

- *Зниження промієлоцитів, мієлоцитів, метамієлоцитів, паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів:*
апластична анемія, в результаті дії цитостатиків, іонізуючого випромінювання, імунний агранулоцитоз.
- *Зниження еритробластів:* *апластична анемія, в результаті дії цитостатиків, іонізуючого випромінювання, парціальна червоноклітинна аплазія.*

Зміни показників КМ

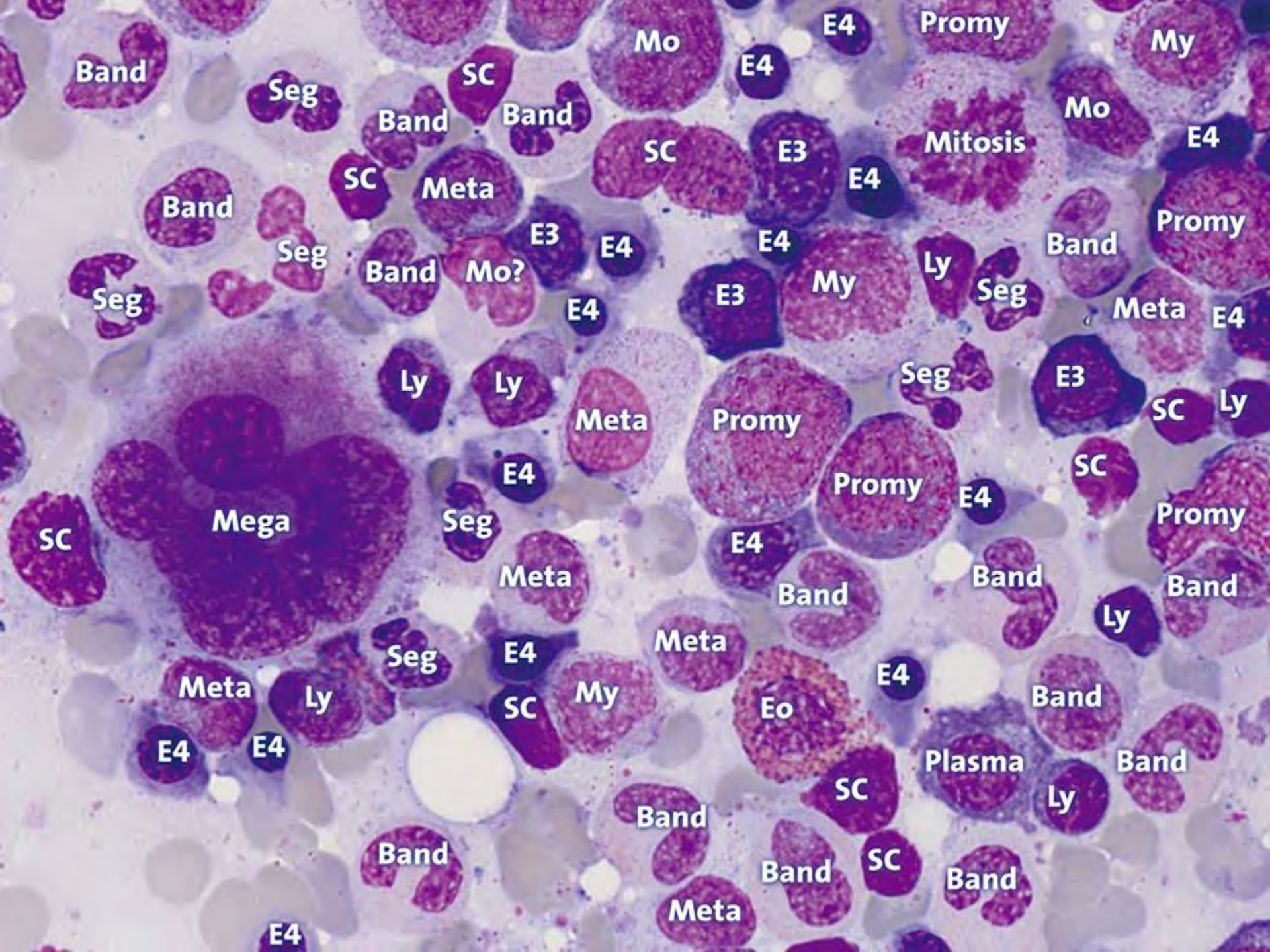
- *Гіпоплазія кісткового мозку*
характеризується зменшенням кількості мегакаріоцитів, цитопенією, переважанням жирової тканини над гемопоетичною
- *Гіпоплазія КМ може бути самостійним захворюванням (наприклад, апластична анемія).*
- *В рідкісних випадках вона супроводжує такі захворювання, як хронічний гепатит, злоякісні новоутворення, зустрічається при деяких формах мієлофіброзу, мармурової хвороби, аутоімунних захворюваннях.*

Зміни показників КМ

- При деяких захворюваннях зменшується кількість клітин одного ряду, наприклад, червоного (парціальна червоноклітинна аплазія), або клітин гранулоцитарного ряду (агранулоцитоз).
- При ряді патологічних станів, крім гіпоплазії кровотворення, можливий неефективний гемопоез, для якого характерні порушення дозрівання і виходу клітин гемопоезу в кров і їх інтрамедулярна загибель.

Зміни показників КМ

- *Гіперплазія кісткового мозку* має місце при різних лейкозах.
- Так, при гострому лейкозі з'являються незрілі (бластні) клітини;
- при хронічному лейкозі зростає кількість морфологічно зрілих клітин, наприклад лімфоцитів при лімфолейкозі, еритроцитів при еритремії, гранулоцитів при хронічному мієлолейкозі.
- Гіперплазія клітин еритроцитарного ряду характерна також для гемолітичних анемій, В12-дефіцитної анемії.



- *Band*: палочкоядерный нейтрофил,
- *E3*: полихромный эритробласт,
- *E4*: ортохромный эритробласт,
- *Eo*: эозинофильный гранулоцит,
- *Ly*: лимфоцит,
- *Mega*: мегакариоцит,
- *Meta*: метамиелоцит,
- *Mo*: моноцит,
- *Mu*: миелоцит,
- *Plasma*: плазмофит,
- *ProMu*: промиелоцит,
- *SC*: тельце Боткина–Гумпрехта,
- *Seg*: сегментоядерный нейтрофил,
- *?*: четкое определение не представляется возможным.