

РЕЗЮМЕ

Курсовая работа: Методы исследования морфологии лейкоцитов: 21 страница, 2 рисунка, 2 таблицы, 5 источников.

Лейкоциты, морфология лейкоцитов, цитохимические методы исследования лейкоцитов.

Цель работы: обобщить литературные данные по методам дифференцировки популяции лейкоцитов.

Область применения: образование, медицина.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ПОПУЛЯЦИИ ЛЕЙКОЦИТОВ: ОСНОВНЫЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ	5
1.2 Базофилы	5
1.3 Эозинофилы	6
1.4 Нейтрофилы	7
1.4 Моноциты	7
1.5 Лимфоциты	8
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МОРФОЛОГИИ ЛЕЙКОЦИТОВ	10
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	20
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	21

ВВЕДЕНИЕ

Лейкоциты (греческое leukos – белый, kytos –местилище) – это одна из трех разновидностей форменных элементов крови позвоночных животных и человека.

Лейкоциты, если сравнивать их с эритроцитами, это ядросодержащие клетки, структурная организация лейкоцитов идентична другим клеткам нашего организма. Лейкоцитарная клетка ограничена цитоплазматической мембраной, в цитоплазме содержатся митохондрии, лизосомы с набором гидролитических ферментов и биологически активных соединений, имеется аппарат Гольджи, система эндоплазматического ретикулула, белоксинтезирующая система, представленная рибосомами и полирибосомами, и другие органоиды.

Размеры лейкоцитов находятся в диапазоне от 4 до 20 мкм. Продолжительность их жизни также весьма различная и может составлять от 4 до 20 дней для элементов гранулоцито-моноцитарного ряда, а для лимфоцитов 100–200 дней. Количество лейкоцитов в периферической крови здорового взрослого человека колеблется от $4 \times 10^9/\text{л}$ до $9 \times 10^9/\text{л}$.

Роль лейкоцитов в организме человека – защитная. Они защищают организм от внешних и внутренних патогенных агентов, от реализации типичных патологических процессов.

Резкое увеличение выработки лейкоцитов происходит в ответ на любое повреждение тканей или возникновение вредоносных агентов для того, чтобы вовремя дать воспалительный ответ, целью которого является изоляция повреждения, уничтожение возбудителя и восстановление тканей.

Поэтому анализ на лейкоциты назначается, например, для постановки диагноза при различных подозрениях на воспалительные процессы в организме, инфекционные заболевания, паразитарные инвазии, аллергические реакции. Некоторые изменения в лейкоцитарном составе могут свидетельствовать даже об онкологии, при этом пациенту будет

назначено более глубокое исследование. Еще такой общий анализ крови применяется для оценки качества лечения.

В этой связи исследовать лейкоциты, методики их анализа является важным и актуальным.

Целью данной работы является обобщить литературные данные по методам дифференцировки популяции лейкоцитов.

ГЛАВА 1. ПОПУЛЯЦИИ ЛЕЙКОЦИТОВ: ОСНОВНЫЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ

Как указывалось ранее, лейкоциты – это клетки крови, которые содержат ядро. При этом лейкоциты, в цитоплазме которых, содержатся гранулы называют *гранулоцитами*. Те, у кого зернистость отсутствует называют *агранулоцитами*.

Можно выделить три формы гранулоцитов. Те у которых, гранулы окрашиваются кислыми красителями (эозином), называют *эозинофилами*. Лейкоциты, у которых зернистость восприимчива к основным красителям, *базофилами*. Лейкоциты, гранулы которых можно окрасить и кислыми и основными красителями, относятся к *нейтрофилам*.

Агранулоциты подразделяются на *моноциты* и *лимфоциты*. Все гранулоциты и моноциты образуются в красном костном мозге и называются клетками миелоидного ряда. Лимфоциты также образуются из стволовых клеток костного мозга, но размножаются в лимфатических узлах, миндалинах, аппендиксе, селезенке, тимусе, лимфатических бляшках кишечника. Это клетки лимфоидного ряда.

Общая функция всех лейкоцитов – это защита организма от бактериальных и вирусных инфекций, а также паразитарных инвазий, поддержание тканевого гомеостаза и еще участие в регенерации тканей. [1]

1.2 Базофилы

Их количество в крови составляет до 1% от общего числа лейкоцитов. Базофилы образуются в костном мозге. Так же, как и нейтрофилы, они находятся в периферической крови примерно 1—2 суток.

Ядра базофилов сегментированы и содержат 2—3 дольки. Также для них характерно наличие специфических крупных метахроматических гранул, они часто закрывают ядро.

Базофилы являются клетками округлой формы, при этом нужно отметить, что в крови присутствуют по большей части наиболее зрелые формы (сегментоядерные).

Базофилы опосредуют воспаление, а также секретируют эозинофильный хемотаксический фактор. Их гранулы содержат протеогликаны, гликозаминогликаны (в том числе гепарин), вазоактивный гистамин и гепарин, нейтральные протеазы. Часть гранул представляет собой модифицированные лизосомы. Дегрануляция базофилов происходит в реакциях гиперчувствительности немедленного типа (при анафилаксии, астме, сыпи, которая может ассоциироваться с покраснением кожи). Пусковой механизм анафилактической дегрануляции – это рецептор для иммуноглобулина класса E. Метахромазия обусловлена наличием гепарина — кислого гликозаминогликана.

Кроме специфических гранул, в базофилах содержатся еще и азурофильные гранулы (лизосомы). Базофилы так же, как и тучные клетки соединительной ткани, выделяют гепарин и гистамин и участвуют в регуляции процессов свертывания крови, а также проницаемости сосудов. Базофилы участвуют в иммунологических реакциях организма, в частности в реакциях аллергического характера.

Функциями базофилов является:

- ✓ поддержание кровотока в мелких сосудах;
- ✓ обеспечение миграции других лейкоцитов в ткани;
- ✓ защита кишечника, кожи и слизистых оболочек при инфицировании их гельминтами и клещами;
- ✓ участие в формировании аллергических реакций.

Базофильные гранулоциты способны к фагоцитозу, миграции из кровеносного русла в ткани и передвижению в них. До 10 дней

1.3 Эозинофилы

Их количество в крови составляет от 1 до 5 % от общего числа лейкоцитов.

Ядро эозинофилов имеет 2 сегмента, которые соединены между собой перемычкой. Органеллы общего назначения и гранулы расположены в цитоплазме. Гранулы делят на азурофильные (первичные) и эозинофильные (вторичные). Эозинофильные гранулы являются специфическими и заполняют собой почти всю цитоплазму.

Эозинофилы могут способствовать снижению содержания гистамина в тканях несколькими различными путями. Они могут разрушать гистамин с помощью фермента гистаминазы, фагоцитировать гистаминсодержащие гранулы тучных клеток, адсорбировать гистамин на плазмолемме, с помощью связывания его рецепторами, а также они могут вырабатывать фактор, который тормозит дегрануляцию и освобождение гистамина из тучных клеток. Это защита организма от паразитарной инфекции (шистосомы, трихинеллы, гельминты, аскариды и др.); инактивация биологически активных соединений, образующихся при аллергических реакциях; препятствуют длительному действию биологически активных веществ, секретлируемых тучными клетками и базофилами; обладают фагоцитарной и бактериоцидной активностью.

Эозинофилы обладают также такой специфичной функцией, как антипаразитарная. Например, при паразитарных заболеваниях (это могут быть гельминтозы, шистосомоз и др.) наблюдается резкое увеличение числа эозинофилов. Они убивают личинки паразитов, которые поступили в кровь или органы (например, в слизистую оболочку кишки).

1.4 Нейтрофилы

Нейтрофилы являются самой многочисленной группой лейкоцитов и составляют 48—78% от общего числа лейкоцитов.

Ядро зрелого сегментоядерного нейтрофила содержит 3—5 сегментов, которые соединены между собой тонкими перемычками.

В популяции нейтрофилов крови могут находиться клетки различной степени зрелости — юные (0.1), палочкоядерные(1-6) и сегментоядерные(60-65).

В нейтрофилах можно различают два типа гранул: специфические и азурофильные, которые окружены одинарной мембраной.

Основной функцией нейтрофилов является фагоцитоз микроорганизмов, отсюда и еще одно название — микрофаги.

При фагоцитозе бактерий сначала с образующейся фагосомой сливаются специфические гранулы, ферменты которой убивают бактерию, при этом образуется комплекс, который состоит из фагосомы и специфической гранулы. После этого с комплексом сливается лизосома и ее гидролитические ферменты переваривают микроорганизмы. При этом в очаге воспаления убитые бактерии и погибшие нейтрофилы образуют гной.

Нейтрофилы обнаруживают бактерии, затем охватывают их псевдоподиями и перемещают их внутрь цитоплазмы, при этом заключая в вакуоли, которые называются фагосомами, их мембраны происходят из плазмолеммы нейтрофила. Затем специфические гранулы сливаются с фагосомами, выделяя в них свое содержимое. рН внутри вакуоли снижается примерно до 5,0 при помощи протонного насоса в мембране фагосомы, что и является оптимальным значением рН, которое может обеспечивать максимальную активность лизосомальных ферментов.

1.4 Моноциты

Данный вид клеток крупнее других лейкоцитов. В крови человека содержание моноцитов находится в диапазоне от 6 до 8 % от общего числа лейкоцитов. Они не содержат гранул.

При этом ядра у моноцитов встречаются в разных формах, а именно бобовидные, подковообразные, реже — дольчатые.

Цитоплазма у моноцитов менее базофильна, чем цитоплазма лимфоцитов. Цвет цитоплазмы — бледно-голубой, но по периферии окрашивается несколько темнее, чем около ядра. В ней содержится различное

количество очень мелких азурофильных зерен (лизосом), которые в большинстве случаев расположены около ядра.

Также для моноцитов характерно наличие пальцеобразных выростов цитоплазмы и образование фагоцитарных вакуолей. В цитоплазме расположено множество пиноцитозных везикул (относительно небольшие внутриклеточные органеллы, мембрано-защищённые сумки, в которых запасаются или транспортируются питательные вещества).

Образование моноцитов происходит в костном мозге.

Функциями моноцитов являются:

- ✓ фагоцитарная защита *организма против микробной инфекции*;
- ✓ участие в иммунном ответе организма и воспалении;
- ✓ регенерация тканей и противоопухолевая защита;
- ✓ регуляция гемопоэза;
- ✓ фагоцитоз старых и поврежденных клеток крови.

1.5 Лимфоциты

В крови у взрослых людей лимфоциты составляют 20—35% от общего числа лейкоцитов.

Лимфоциты разделяют на малые лимфоциты, средние и большие. Большие лимфоциты встречаются в крови новорожденных и детей, у взрослых они отсутствуют. Малые лимфоциты составляют большую часть всех лимфоцитов крови человека.

У всех видов лимфоцитов есть интенсивно окрашенное ядро округлой или же бобовидной формы. В цитоплазме у лимфоцитов содержится небольшое количество азурофильных гранул (лизосом).

Основная функция лимфоцитов – участие в иммунных реакциях. Следует отметить, что популяция лимфоцитов гетерогенна по характеристике поверхностных рецепторов, а также по роли в реакциях иммунитета.

Лимфоциты можно разделить на три основных функциональных класса: В-лимфоциты, Т-лимфоциты и так называемые нулевые лимфоциты.

В костном мозге образуются В-лимфоциты. Их главной функцией является участие в выработке антител, то есть обеспечение гуморального иммунитета. В плазмолемме В-лимфоцитов содержится множество иммуноглобулиновых рецепторов. Клетки, которые способны синтезировать и секретировать защитные белки – антитела, или иммуноглобулины, которые поступают в кровь, обеспечивают гуморальный иммунитет.

Из стволовых клеток костного мозга образуются Т-лимфоциты, а созревают в тимусе. Основные функции Т-лимфоцитов это обеспечение реакций клеточного иммунитета и регуляция гуморального иммунитета (т.е. стимуляция или подавление дифференцировки В-лимфоцитов). Для Т-лимфоцитов характерно явление рециркуляции, т.е. выход из крови в ткани и возвращение по лимфатическим путям снова в кровь.

Существует еще одна группа лимфоцитов, так называемые нулевые лимфоциты, они не проходят дифференцирования в органах иммунной системы, но при необходимости способны превратиться в В- или Т-лимфоциты. Они составляют около 10-20% лимфоцитов крови.

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МОРФОЛОГИИ ЛЕЙКОЦИТОВ

Лейкоциты, как известно, различаются по структуре, и форме ядра, характеру цитоплазмы, её грануляции, а также ядерно-цитоплазматическому соотношению. Перечисленные признаки – это основные критерии при исследовании лейкограммы в окрашенных мазках крови. Лейкограмма, которую еще можно назвать лейкоцитарной формулой – это процентное соотношение в периферической крови различных форм лейкоцитов.

В норме в крови должны быть выявлены базофилы, эозинофилы, нейтрофилы палочкоядерные и сегментоядерные, лимфоциты, моноциты. Если в мазках крови обнаруживаются такие виды клеток, как : плазматические клетки, незрелые, бластные, трудно дифференцируемые формы лейкоцитов их вводят в лейкограмму, а также описывают их морфологию. Пример лейкограмма представлен в качестве таблицы 1.

Таблица 1 – Лейкограмма

Базофилы	Эозинофилы	Нейтрофилы				Лимфоциты	Моноциты
		Миелоциты	Юные	Палочко-ядерные	Сегментоядерные		
0.5 – 1	2 – 5	–	0.5	3 – 5	60 – 65	20 – 35	6 – 8

Но следует учитывать тот факт, что лейкоцитарная формула способна дать представление только об относительных величинах. Более объективное представление о составе лейкоцитов крови может дать вычисление их абсолютного количества, это значит, что нужно высчитывать содержание каждого вида лейкоцитов в каком-либо определенном объеме крови. Следует учитывать также тот факт, что лейкоцитарная формула имеет некие возрастные особенности, поэтому ее сдвиги должны оцениваться с позиции возрастной нормы, так у молодняка, особенно в период новорожденности, соотношение клеток резко отличается от взрослых.

Морфологически можно выделить 5 основных популяций лейкоцитов: моноциты, лимфоциты, эозинофилы, нейтрофилы, и базофилы. Каждая популяция лейкоцитов несет в себе функциональную специфическую нагрузку. В обобщённом виде морфологические характеристики лейкоцитов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Морфологическая характеристика лейкоцитов при окраске гематоксилином и эозином [3]

Крите-рий	Гранулоциты					Агранулоциты	
	базо-фильные	эозино-фильные	нейтрофильные			Лимфо-циты	Моно-циты
			юные	Пало-чко-ядерные	Сегмен-то-ядерные		
При-мерные размеры клеток	В 1,5 раза крупнее эритро-цитов	В 2 раза крупнее эритроци-тов	В 1,5 раза крупнее эритроци-тов	В 1,5 раза крупнее эритроци-тов	В 1,5 раза крупнее эритроци-тов	Как у эритроцит-ов либо крупнее в 1,5-2 раза	В 3 раза крупнее эритроцит-ов, самые крупные клетки крови
При-мерное количество цитоплазмы	Среднее, часто не определяется из-за гранул	Среднее	Среднее	Среднее	Среднее	Малое, цито-плазма располо-жена вокруг ядра в виде узкой полоски	Большое
Окраска	Синяя, зернистая	Ярко-розовая,	Бледно-розовая,	Бледно-розовая,	Бледно-розовая,	Бледно-розовая,	Бледно-розовая,

цитоплазмы		зернистая	гомогенная	гомогенная	гомогенная	гомогенная	гомогенная
Размеры ядра	Средние	Средние	Средние	Средние	Средние	Средние	Большие
Форма ядра	Ядро сегментировано, часто закрыто гранулами	Ядро обычно состоит из двух крупных сегментов	Ядро бобовидное	Ядро в виде изогнутой палочки	Ядро разделено на 3-4 сегмента	Ядро округлое либо бобовидное	Ядро бобовидное

Продолжение таблицы 2.

Интенсивность окраски ядра	Ядро скрыто под тёмными гранулами	Высокая (ядра тёмные)	Средняя	Высокая	Высокая	Высокая у малых и средних лимфоцитов, средняя у больших	Низкая (самые светлые ядра)
-----------------------------------	-----------------------------------	-----------------------	---------	---------	---------	---	-----------------------------

Окраска с помощью гематоксилина и эозина – это один из самых распространенных методов в гистологии. Гематоксин окрашивает базофильные клеточные структуры ярко-синим цветом, а эозин Y окрашивает эозинофильные структуры клетки красно-розовым цветом.

Один из наиболее часто используемых методов окраски бактерий и клеточных структур и тканей самой различной структуры – это метод окраски по Романовскому-Гимзе. Он используется в том числе и для исследований крови с помощью световой оптической микроскопии. Данный метод был впервые предложен в 1904 году. С помощью такого метода окрашиваются ацидофильные образования в различные оттенки красного цвета. А образования базофильного характера окрашиваются в цвет от пурпурного до синего.

Для проведения анализа готовый краситель (в жидком виде) разводят в дистиллированной воде при этом соблюдая соотношение 1-2 капли красителя на 1 мг воды. Мазки необходимо окрашивать во влажной камере при температуре 37 °С в течение 20-25 минут. После завершения процесса окрашивания мазки необходимо промыть проточной водой, затем высушить на воздухе, а потом они уже исследуются с помощью масляных импрессий.

Красящую смесь Романовского-Гимзы, в основе которой имеется краска Романовского Райта, необходимо растворить в смеси объемах глицерина и метанола (50/50) в соотношении 800 мг красителя к 100 мл растворителя.

Следует заострить внимание, что на приготовление данного красителя требуется несколько дней. Готовую красящую смесь необходимо хранить в плотно закрытом сосуде в прохладном сухом месте.

Мазки, акцентированные в метиловом спирте, необходимо окрашивать на протяжении 40-120 минут раствором, в составе которого 1 мл приготовленной краски жидкой формы, 2 мл главного буферного раствора, а также 47 мл дистиллированной воды. Вид мазка оказывает влияние на рН фосфатного буфера, который используют при анализе:

- ✓ мазок крови — 6,4 — 6,5;
- ✓ выявление простейших — 6,8;
- ✓ малярийные плазмодия — 7,0 — 7,2.

Затем в дистиллированной воде проводят ополаскивание, потом высушивают и изучают при иммерсии.

В результате данного анализа:

- ✓ цитоплазма лимфоцитов окрашивается в сине-голубой цвет, их ядра — в цвета от интенсивно пурпурного до фиолетового;

- ✓ цитоплазма моноцитов окрашивается в мутный голубовато-серый цвет, их ядра — в более светлый пурпурно-красный, нежная азурофильная зернистость;
- ✓ гранулы базофилов окрашиваются в интенсивный сине-фиолетовый цвет;
- ✓ гранулы эозинофилов окрашиваются в оранжево-розовый цвет;
- ✓ гранулы нейтрофилов окрашиваются в цвета от пурпурного до фиолетового;
- ✓ ядра лейкоцитов фиолетово-красного цвета с хорошо видимой структурой хроматина; хорошо выделяются ядрышки;
- ✓ грануломеры тромбоцитов окрашиваются в красный,
- ✓ гиаломеры — в голубой;
- ✓ розовая окраска принадлежит гемоглобину.

На рисунке 1 один приведена схема, как выглядит мазок крови. [2]

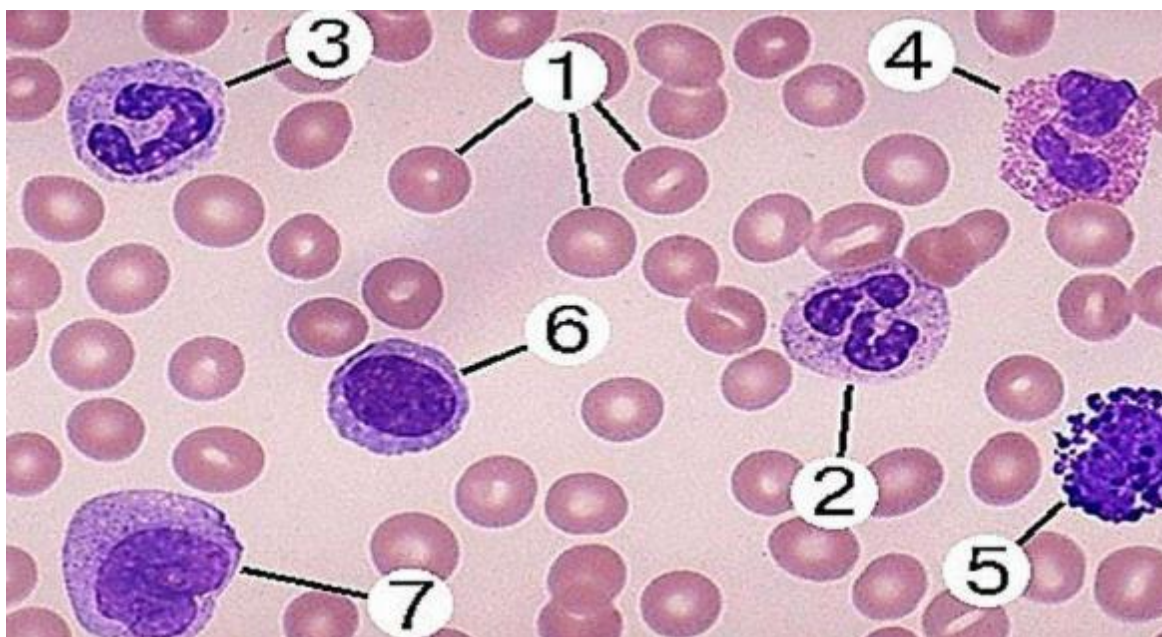


Рисунок 1 – Мазок крови (окраска по Романовскому-Гимза): 1) эритроциты; 2) сегментоядерный нейтрофил; 3) палочкоядерный нейтрофил; 4) эозинофил; 5) базофил; 6) лимфоцит; 7) моноцит.

Чтобы подсчитать количество лейкоцитов можно использовать счетную камеру Горяева. Для анализа нужно развести кровь в 20 раз. Чтобы это сделать нужно набрать кровь в лейкоцитарный до метки 0,5, далее это все нужно разбавить жидкостью Тюрка (3-5% раствор уксусной кислоты, подкрашенный несколькими каплями метиленового синего), при этом наполняя меланжер до метки 11. После этого меланжер необходимо встряхнуть в течение 20-30 секунд. [2]

Или другим способом можно в сухую пробирку (пенициллиновый флакончик) нужно внести 0,4 мл жидкости Тюрка. Затем используя капиллярную пипетку от гемометра Сали набрать 0,02 мл крови. После всего этого кровь в пробирке нужно тщательно перемешать, закрыть и оставить на 4 мин просто стоять, при этом иногда перемешивая содержимое.

Для подготовки счетной камеры, ее предварительно нужно тщательно обезжирить спиртом, после промыть дистиллированной водой и высушить под феном, затем протереть мягкой фланелью. [2]

После того в подготовленную камеру чистое и сухое покровное стекло притирают к камере так, чтобы появились радужные кольца. Кровь в пробирке снова нужно перемешать стеклянной палочкой.

Затем нужно взять каплю крови с помощью Пастеровской пипетки или же стеклянной палочки и заполнить счётную камеру. Лейкоциты необходимо начать подсчитывать через 1 мин после заполнения камеры, когда осядут клетки крови, пользуясь малым увеличением микроскопа при затемненном поле, для чего нужно опустить конденсор или сузить диафрагму.

Лейкоциты подсчитывают в 100 больших (1600 малых) квадратах расположенных по всей сетке группами по четыре. Необходимо отметить, что считать лейкоциты следует не позже 2-4 ч после взятия крови.

Расчёт числа лейкоцитов в 1 мкл (X) проводят по формуле, приведенной на рисунке 2:

$$X = \frac{n}{1600} \times 4000 \times 20 \quad (10)$$

Рисунок 2 – Формула подсчета лейкоцитов, где n – число сосчитанных лейкоцитов; 1600 - среднеарифметическое число лейкоцитов в одном малом квадрате; 4000 – во столько раз объём одного малого квадрата меньше 1 мкл; 20 – разведение крови [2]

При исследованиях лейкоцитов очень популярными являются цитохимические методы. Это микроскопические методы исследования, позволяющие проводить анализ химического состава клетки и локализации в ней исследуемых веществ при сохранении структуры клетки. Цитохимические методы широко используют в цитологии, эмбриологии, патологической анатомии, физиологии, фармакологии. Они помогают определять характер, интенсивность обмена веществ в клетке, а также изучать различные специализированные функции клетки. В отличие от гистохимических цитохимические методы применяют для анализа только отдельных клеток или их групп, причем цитохимические методы обладают

большой чувствительностью. Они обладают рядом достоинств: просты в исполнении, воспроизводимы, не требуют сложной, дорогостоящей аппаратуры, информативны. Кроме того, дополняют биохимические исследования, выявляя специфичность тканевых клеток, точно определяя локализацию исследуемых веществ в клетке. Современная цитохимия основана на цветных химических реакциях, выявляющих в клетках специфические вещества и ферменты. Лейкозные клетки сохраняют свойства своих нормальных аналогов; выявление этих свойств и, благодаря этому, принадлежности лейкозных бластов к определенному клеточному типу, способствует установлению формы острого лейкоза. Это необходимо для проведения адекватной и эффективной терапии.

С помощью цитохимических реакций можно выявить следующие компоненты клетки:

✓ ферменты

- миелопероксидаза – фермент лизосом нейтрофилов, служит маркером клеток миелоидного ряда. В клетках миелопероксидаза участвует в реакции разрушения токсичной перекиси водорода, которая образуется в процессе жизнедеятельности клетки.

- щелочная фосфатаза – относится к группе гидролитических ферментов, осуществляет гидролиз однозамещенных эфиров ортофосфата. Содержится преимущественно в зрелых нейтрофилах. Базофилы, лимфоциты, моноциты, эритроциты и тромбоциты не содержат щелочную фосфатазу, как в норме, так и в патологических состояниях.

- кислая фосфатаза – является гидролитическим ферментом. Обнаруживают преимущественно в нейтрофилах и лимфоцитах. По мере созревания клеток активность фермента снижается. Локализована кислая фосфатаза в основном в первичных гранулах и отсутствует во вторичных. В лимфоцитах активность весьма вариабельна.