

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра здравоохранения



В.В. Колбанов

21 июня 2005 г.

Регистрационный № 33-0304

**ЦИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МЕТОД
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ
АУТОИММУННОГО ТИРЕОИДИТА**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Витебский государственный ордена
Дружбы народов медицинский университет

Авторы: А.А. Юхновец, канд. мед. наук, проф. А.Н. Огороков

В настоящее время заболевания щитовидной железы (ЩЖ) имеют большое значение для практического здравоохранения. Это обусловлено широкой распространенностью среди населения различных форм гипо- и гипертиреоза, аутоиммунных и онкологических поражений щитовидной железы и зависимостью ее патологии от ухудшающейся экологической обстановки.

Цитохимический анализ — это изучение химико-морфологического строения клеток в микроскопических препаратах с помощью гистохимических реакций, в процессе которых происходит окрашивание исследуемого субстрата.

Нами установлено, что цитохимические показатели лейкоцитов у больных аутоиммунным тиреоидитом (АИТ) меняются следующим образом: повышается количество гликогена, уровень липидов, активность щелочной и кислой фосфатаз, снижается содержание катионных белков. Цитохимический анализ лейкоцитов периферической крови может быть использован в качестве дополнительного дифференциально-диагностического теста при АИТ.

Цитохимическое исследование лейкоцитов периферической крови является легкодоступным, относительно недорогим, неинвазивным и необременительным для больного методом.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Цитохимические исследования лейкоцитов рекомендуется использовать в следующих обстоятельствах:

1. Наличие патологии ЩЖ с нарушенной или нормальной функцией.
2. В качестве дополнительного теста в комплексной дифференциальной диагностике АИТ.

ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Основным объектом исследования служат мазки периферической крови.

Для микроскопического исследования капиллярную кровь берут с помощью скарификатора из безымянного пальца левой руки после предварительной обработки кожи спиртом до приема больными ле-

карств и пищи в утренние часы. Далее капля крови наносится на обезжиренное предметное стекло для приготовления мазка. После высыхания крови выполняется фиксация в парах формалина. Для этого мазки помещают в чашки Петри на деревянные палочки, уложенные поверх фильтровальной бумаги, смоченной формалином. Затем производят окраску согласно выбранным цитохимическим методикам.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛИКОГЕНА МЕТОДОМ ШИК-РЕАКЦИИ В МОДИФИКАЦИИ А.Л. ШАБАДАША С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАКТИВА ШИФФА

Для цитохимического выявления гликогена рекомендуется метод Шабадаша А.Л. (1947), обладающий высокой чувствительностью и специфичностью (Павлов Б.А., Колпаков В.А., 1974; Николаева Л.К., Лецкий В.Б., 1976; Соловьева Е.А. и соавт., 1977). В литературе эта реакция известна как PAS- или ШИК-реакция. Сущность ее заключается в том, что под влиянием йодной кислоты или ее солей гликольные группы гликогена окисляются до альдегидов. В местах образования альдегидов происходит реакция с реактивом Шиффа, в результате чего появляется красное окрашивание, маркирующее молекулы гликогена.

Реактивы

1. Формалин (37% Solution of formaldehyde — Formalin) (CH_2O).
2. 1% раствор йодной кислоты (Periodic acid (meta) ($\text{HIO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (ЧДА).
3. Основной фуксин (Pararosaniline base) ($\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}$) (ЧДА).
4. Калия (или натрия) метабисульфит (Potassium metabisulfite) ($\text{K}_2\text{S}_5\text{O}_2$) (ЧДА).
5. 1 н. соляная кислота (Hydrochloric acid) (HCl) (ХЧ).
6. 2% водный раствор метилового зеленого (Methyl green) ($\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{BrClN}_3 \times \text{ZnCl}_2$) (ЧДА).
7. 10% водный раствор калия (или натрия) бисульфита (Potassium bisulfite) (ЧДА).

8. 0,1% раствор диастазы (α -amylase) (1,4- α -D-Glucan-glucanohydrolase, E.C. 3.2.1.1.) в 0,02 М фосфатном буфере (Phosphate buffer) с pH 6.

9. Дистиллированная вода.

Реактив Шиффа готовят, добавив 1 г основного фуксина к 200 мл кипящей дистиллированной воды; затем раствор охлаждают до комнатной температуры и добавляют 2 г калия метабисульфита и, перемешивая, 6–8 мл 1 н. соляной кислоты. Полученный раствор фильтруют, хранят в холодильнике в темноте. Перед употреблением реактив необходимо подогревать до комнатной температуры.

Ход реакции

Зафиксированные в течение 5 мин в парах формалина мазки промывают в проточной воде, после чего их обрабатывают в течение 10 мин 1% раствором йодной кислоты, которую готовят ex tempore и хранят в холоде. После этого мазки отмывают в нескольких сменах дистиллированной воды с последующим погружением в реактив Шиффа на 30 мин.

Затем в течение 3 мин прополаскивают мазки в нескольких сменах сульфитной воды.

Сульфитную воду готовят ex tempore посредством растворения 10 мл 10% водного раствора калия или натрия бисульфита в 200 мл дистиллированной воды и добавления 10 мл 1 н. соляной кислоты.

После этого промывают мазки в дистиллированной воде 10 мин, погружают их в 2% водный раствор метилового зеленого на 5 мин и ополаскивают в проточной воде 5 мин (Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М., 1983).

Результаты реакции

Гликоген окрашивается в вишнево-красный цвет, а ядра клеток — в зеленый.

Контроль специфичности реакции

Контроль специфичности реакции проводится с использованием 0,1% раствора диастазы в 0,02 М фосфатном буфере с pH 6. В полученный раствор погружают мазки на 30–60 мин при температуре 37 °С. После промывания мазки обрабатывают точно так же, как при описанном выше способе выявления гликогена. Исчезающая

под влиянием переваривания диастазой окраска после проведения ШИК-реакции свидетельствует о присутствии гликогена (Луппа Х. Основы гистохимии. М., 1980).

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЛИПИДОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СУДАНА ЧЕРНОГО Б
ПО SHEEHAN, STOREY (1974)
В МОДИФИКАЦИИ КОЗИНЦА Г.И. (1998)**

Исследование липидов лейкоцитов с помощью судана черного Б, относящегося к азокрасителям, является достаточно простым и надежным. Суданы хорошо растворимы в жирах, в результате чего краситель переходит из раствора в липиды, маркируя их. Окрашивание суданом черным Б имеет высокую чувствительность и дает высокую контрастность окраски.

Реактивы

1. Формалин (37% Solution of formaldehyde — Formalin) (CH_2O).
2. Этанол (Ethanol) ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$).
3. Судан черный Б (Sudan black B) ($\text{C}_{29}\text{H}_{24}\text{N}_6$).
4. Фенол кристаллический (Phenol) ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$).
5. Натрия фосфат двухзамещенный (Disodium phosphate) (Na_2HPO_4) (ЧДА).
6. 2% водный раствор метилового зеленого (Methyl green) ($\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{BrClN}_3 \times \text{ZnCl}_2$) (ЧДА).
7. Ацетон (Acetone) ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) (ХЧ).
8. Дистиллированная вода.

Ход реакции

Сухие свежие мазки периферической крови фиксируют 10 мин в парах формалина и споласкивают в проточной воде. Помещают их на 30 с в 70% этанол и затем в раствор судана черного Б на 1 ч.

Раствор судана черного Б готовят, добавив 90 мг судана черного Б в 30 мл этанола; полученный раствор соединяют с буфером, состоящим из 3,2 г кристаллического фенола, 6 мл этанола, 14 мл дистиллированной воды, содержащей 23,7 мг натрия фосфата двухзамещенного.

Затем промывают мазки 2–3 мин 30% этанолом, 2 мин — проточной водой. Мазки высушивают и контрастируют ядра 2% водным раствором метилового зеленого (Атлас клеток крови / Под ред. Г.И. Козинца. М., 1998; Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М. 1983).

Результаты реакции

Липиды окрашиваются в черный цвет, а ядра клеток — в зеленый.

Контроль специфичности реакции

Контроль специфичности окрашивания выполняется в параллельных мазках с помощью экстракции ацетоном, после проведения которой окраска суданом черным Б дает отрицательный результат (Луппа Х. Основы гистохимии. М., 1980).

Цитохимическое выявление фосфатаз методами азосочетания основано на образовании нерастворимого окрашенного осадка азокрасителя в местах, где происходит гидролиз субстрата. В качестве субстрата используются производные нафтола, в частности для выявления кислой фосфатазы — нафтол AS фосфат, для выявления щелочной фосфатазы — нафтол AS-MX фосфат. В качестве солей диазония для формирования азокрасителя использовались гексазотированный парарозанилин — для выявления кислой фосфатазы, прочный синий ББ — для выявления щелочной фосфатазы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ ПО МЕТОДУ BARKA И ANDERSON (1962)

Сочетание нафтол AS фосфата и свежегексазотированного парарозанилина для выявления кислой фосфатазы широко используется в гематологии и дает хорошо различимый и воспроизводимый характер окраски (Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М., 1983; Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. М., 1982).

Реактивы

1. Формалин (37% Solution of formaldehyde — Formalin) (CH_2O).
2. Нафтол AS фосфат (Naftol AS phosphate) ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{NO}_5\text{P}$).
3. Диметилформаид (N_1N — Dimethylformamide) ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$) (Ч).

4. 0,1 н. раствор натрия ацетат (Sodium acetate) ($C_2H_3O_2Na$) (ЧДА).

5. 4% парарозанилин (Pararosaniline base) ($C_{19}H_{18}N_3O$) (ЧДА).

6. 2 н. соляная кислота (Hydrochloric acid) (HCl) (ХЧ).

7. 4% водный раствор натрия азотистого (Sodium nitrite) ($NaNO_2$) (ЧДА).

8. 0,1 н. соляная кислота (HCl) (ХЧ).

9. 2% водный раствор метилового зеленого (Methyl green) ($C_{27}H_{35}BrClN_3$ Ч $ZnCl_2$) (ЧДА).

Ход реакции

Сухие свежие мазки крови, зафиксированные в парах формалина, промывают в проточной воде и высушивают. Мазки помещают на 2 ч в термостат при $37^\circ C$ в профильтрованный реактив, приготовленный из 20 мг нафтол AS фосфата, 0,5 мл диметилформаида, 40 мл 0,1 н. раствора натрия ацетата, 8 капель 4% парарозанилина (8 г реактива в 200 мг 2 н. соляной кислоте), 8 капель 4% натрия азотистого (4 г реактива в 100 мл дистиллированной воды) с pH среды 5,2–5,4, доведенным при помощи 0,1 н. соляной кислоты. Затем мазки промывают 5–10 мин в проточной воде, высушивают и докрашивают 2% водным раствором метилового зеленого в течение 10 мин (Атлас клеток крови / Под ред. Г.И. Козинца. М., 1998).

Результаты реакции

Кислая фосфатаза выявляется в виде розового окрашивания, а ядра клеток окрашиваются в зеленый цвет.

Контроль специфичности реакции

Контроль специфичности реакции выполняется проведением методики без использования субстрата (нафтол AS фосфата) (Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. М., 1982).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ ПО МЕТОДУ BEURSTON (1962)

Реактивы

1. Формалин (37% Solution of formaldehyde — Formalin) (CH_2O).

2. Нафтол AS - MX фосфат (Naftol AS — MX phosphate) ($C_{19}H_{18}NO_3P$).

3. Прочный синий ББ (Fast blue BB salt) ($C_{17}H_{18}N_3O_3 \times 1/2 ZnCl_4$) (ЧДА).

4. Диметилформаид (N_1N — Dimethylformamide) (C_3H_7NO) (Ч).

5. 0,9% водный раствор натрия хлорида (Sodium chloride) (NaCl) (ХЧ).

6. 0,2М трис-буфер с рН 8,7 (Tris [hydroxymethyl] — aminomethane hydrochloride) ($C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$) (Ч).

7. 1% водный раствор сафранина (Safranin O) ($C_{20}H_{19}N_4Cl$) (ЧДА).

Ход реакции

Мазки крови, высушенные на воздухе и зафиксированные в течение 10 мин в парах формалина, промывают в проточной воде и высушивают. Затем стекла погружают на 45 мин в подогретую до 37 °С инкубационную среду, состоящую из 10 мг нафтол AS-MX фосфата и 50 мг прочного синего ББ, растворенных по отдельности в 0,2 и 0,25 мл соответственно диметилформаида, и соединенных соответственно с 25 мл физиологического раствора хлорида натрия и 25 мл 0,2 М трис-буфера с рН 8,7. Затем стекла промывают водой и докрашивают ядра 1% водным раствором сафранина (Берстон М., 1965).

Результаты реакции

Щелочная фосфатаза выявляется в виде синего окрашивания, а ядра клеток окрашиваются в красный цвет.

Контроль специфичности реакции

Контроль специфичности реакции выполняется проведением методики без использования субстрата (нафтол AS-MX фосфата) (Лойда З., Госспрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. М., 1982).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КАТИОННЫХ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ ЛИЗОСОМАЛЬНО-КАТИОННОГО ТЕСТА ПО МЕТОДУ ПИГАРЕВСКОГО В.Е. (1978)

Для приготовления раствора красителя, чтобы выявить катионные белки, можно пользоваться разными марками прочного зеленого, но наилучшие результаты получаются с прочным зеленым FCF.

Реактивы

1. Прочный зеленый FCF (Fast green FCF) ($C_{37}H_{34}N_2O_{10}S_3Na_2$) (ЧДА).
2. Метанол абсолютный (Methanol absolute) (CH_3OH) (ХЧ).
3. 0,1 н. раствор калия или натрия гидроксида (Potassium hydroxide или Sodium hydroxide) (KOH или NaOH) (ХЧ).
4. 0,1 н. соляная кислота (HCl) (ХЧ).
5. 1% водный раствор сафранина (Safranin O) ($C_{20}H_{19}N_4Cl$) (ЧДА).

Ход реакции

Приготавливают спиртовой раствор красителя по схеме: 100 мг сухого прочного зеленого FCF растворяют в 87,5 мл дистиллированной воды и к водному раствору добавляют 12,5 мл метанола абсолютного. Внесением в 100 мл спиртового раствора красителя 2–2,5 капель 0,1 н. раствора калия или натрия гидроксида pH раствора доводят до 8,1–8,2. При избытке щелочи pH выравнивают минимальными количествами 0,1 н. раствора соляной кислоты. Раствор может храниться при температуре 4 °С с притертой крышкой несколько лет.

Фиксированные 5 мин в метаноле мазки крови погружают на 10–15 мин в спиртовой раствор прочного зеленого FCF, затем быстро ополаскивают дистиллированной водой и погружают в 1% водный раствор сафранина. После этого краситель смывают водой и мазок высушивают. Окрашенные мазки хорошо хранятся (Пигаревский В.Е. Зернистые лейкоциты и их свойства. М., 1978).

Результаты реакции

Лизосомы гранулоцитов, подвергшиеся действию катионных белков, окрашиваются в ярко-зеленый цвет, а ядра — в красный.

Интерпретация результатов исследования

После окраски мазков крови их изучают с помощью светового микроскопа под иммерсионным объективом. Подсчитывают 100 лейкоцитов в мазке и в каждой клетке определяют степень интенсивности окраски:

0-я степень — отсутствие окраски цитоплазмы;

1-я степень — наличие в цитоплазме единичных гранул красителя или слабое диффузное окрашивание цитоплазмы;

2-я степень — умеренное количество гранул красителя или умеренное диффузное окрашивание, остаются неокрашенные участки цитоплазмы;

3-я степень — большое количество гранул красителя в цитоплазме, высокая интенсивность окраски;

4-я степень — гранулами красителя заполнена вся цитоплазма, неокрашенных участков нет, интенсивность окраски наибольшая, часто покрывается ядро.

Цитохимическую оценку изучаемых показателей в лейкоцитах производят в условных единицах полуколичественным методом Kaplow L. (1955) в модификации Astaldi G. и Verga L. (1957). Международной системой единиц измерения (СИ) в лабораторной диагностике допускается использование условных единиц (Гурленя А.М., Матеша А.М., 1972). Вычисляют средний цитохимический коэффициент (СЦК) по формуле: $СЦК = (0a + 1б + 2в + 3г + 4д) / 100$, где цифры обозначают интенсивность окраски, буквы — количество (в процентах) клеток с соответствующей положительной цитохимической реакцией.

Выявленные нами закономерности изменений цитохимических показателей лейкоцитов периферической крови при патологии ЩЖ схематично представлены в таблице. Из таблицы видно, что для АИТ характерно повышение содержания в лейкоцитах уровня гликогена и липидов, активности кислой и щелочной фосфатаз и снижение содержания катионных белков. Наряду с этим нами обнаружена отрицательная коррелятивная взаимосвязь между уровнем АТ к ТГ в крови и уровнем КБ в лейкоцитах у больных АИТ. Функциональное состояние ЩЖ при АИТ не оказывает существенного влияния на цитохимические показатели лейкоцитов периферической крови, за исключением уровня гликогена, который не изменен при эутиреозе; и содержания липидов, которое не меняется при гипертиреоидном состоянии. При ДНТЗ отмечается повышение содержания гликогена, активности щелочной фосфатазы и уровня катионных белков, а при раке ЩЖ — повышение гликогена, щелочной фосфатазы, катионных белков и снижение активности кислой фосфатазы.

**Закономерности изменений цитохимических показателей
лейкоцитов периферической крови больных АИТ,
диффузным нетоксическим зобом и раком ЩЖ**

	Г	Л	КФ	ЩФ	КБ
АИТ (вся группа в целом)	↑	↑	↑	↑	↓
АИТ (эутиреоз)	не изменен	↑	↑	↑	↓
АИТ (гипертиреоз)	↑	не изменены	↑	↑	↓
АИТ (гипотиреоз)	↑	↑	↑	↑	↓
ДНТЗ	↑	не изменены	не изменена	↑	↑
Рак ЩЖ	↑	не изменены	↓	↑	↑

Примечание: ↑ — повышение показателя, ↓ — снижение показателя.

Таким образом, обнаружены характерные особенности изменений цитохимических показателей при АИТ, ДНТЗ и раке ЩЖ, что позволяет рекомендовать цитохимический анализ лейкоцитов как дополнительный метод в комплексной дифференциальной диагностике АИТ. При проведении дифференциальной диагностики АИТ с эутиреоидным состоянием и ДНТЗ дополнительно к УЗИ ЩЖ и определению титров антител к тиреоглобулину можно рекомендовать цитохимический анализ лейкоцитов, который указывает на повышенный уровень липидов, активности кислой и щелочной фосфатаз и низкое содержание катионных белков, в то время как при ДНТЗ наряду с повышением гликогена и щелочной фосфатазы не изменяются показатели липидов и кислой фосфатазы, а уровень катионных белков повышается.

При проведении комплексной дифференциальной диагностики рака ЩЖ и ДНТЗ следует учесть низкий уровень КФ при раке ЩЖ и отсутствие ее изменений при ДНТЗ. Кроме того, при ДНТЗ и при раке ЩЖ в целом содержание катионных белков повышено, но в эозинофилах при ДНТЗ преобладает умеренная (2+) интенсивность окраски, а при раке ЩЖ — высокая (3+) и очень высокая (4+).

Проводя дифференциальную диагностику рака ЩЖ и АИТ целесообразно учесть, что при АИТ в отличие от рака ЩЖ КФ в лейкоцитах повышена, в то время как при раке снижена; а катионные белки, напротив, повышены при раке ЩЖ и снижены при АИТ. Кроме того, при АИТ повышается уровень липидов, а при раке ЩЖ он существенно не меняется.

Полученные результаты исследований показывают целесообразность одновременного определения по меньшей мере двух цитохимических показателей лейкоцитов (активность кислой фосфатазы и содержание катионных белков) при дифференциальной диагностике АИТ и рака ЩЖ, АИТ и ДНТЗ, ДНТЗ и рака ЩЖ.

ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И ОШИБКИ

Осложнений при применении данного метода не зарегистрировано.

Ошибки при проведении цитохимического анализа лейкоцитов периферической крови возможны при нарушении этапов методик.

Во время набора и хранения материала для исследований, приготовления реактивов, проведения цитохимических реакций требуется строгое следование методикам. Необходимо четко откалибровать признаки, по которым производится оценка степени выраженности реакции. Мазки крови, подвергшиеся фиксации, требуется хранить в холодильнике не более 3–4 сут (это касается методик определения катионных белков, кислой и щелочной фосфатаз, липидов, в то время как при определении содержания гликогена материал может храниться гораздо более длительный срок). Для проведения реакций следует использовать обозначенные выше реактивы, так как именно они дают наиболее четко воспроизводимые результаты.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Противопоказаний к применению не имеется.

Цитохимический анализ лейкоцитов периферической крови в сочетании с ультразвуковым исследованием может быть использован в качестве дополнительного метода диагностического обследования больных с наличием патологии ЩЖ. Данный метод рекомендуется для использования в клинических лабораториях областных и республиканских больниц.