طرق دراسة خلايا الدم، نقي العظم والعقد اللمفاوية

ا.د.تهاني علي

تعداد الدم
HEMOGRAMME

- **فحص كمي** او تعداد دموي
- **فحص كيفي**:

دراسة شكلية لمختلف مكونات الدم تشمل صيغة البيض والبحث عن شذوذات شكلية.

مبدا تعداد الدم

- يقدر التعداد مستوى الخلايا الدموية المختلفة في حجم محدد من الدم
- حسب النظام العالمي للواحدة(SI) : اتعبير عن الحجم بليتر من الدم
- في الممارسة مازال يستعمل التعداد في ملم^3 دم
- تعداد الدم يعطي اذا قيم نسبية متعلقة بحجم معين
- تبدلات عدد الخلايا الدموية يمكن ان يعود:
  - اما الى تبدلات حقيقة للعدد الكلي للخلايا
  - واما الى تبدلات في كمية البلازما: وهكذا فان نقص كمية البلازما يمكن ان يحاكي ارتفاع عدد الكريات الحمر
- هذه الملاحظة الهامة يجب ان تبقى حاضرة دائما في الذهن قبل تفسير تعداد الدم.

طرائق تعداد الدم

- <u>في السابق:</u>
  - بتقنية المجهر واستعمال خلايا مسطرة ومدرجة: خلايا Malassez او خلايا Thoma .
- <u>حاليا:</u>
  - يجرى التعداد بمساعدة اجهزة آلية تستخدم مبادئ مختلفة
  - لكنها ذات دقة عالية لانها تعد جميعها حوالي 10000 خلية
  - الاجهزة الآلية الرئيسية هي الاجهزة المسوقة بواسطة شركات ABX، Abott، Coulter- Beckman، Sysmex و Bayer-Technicon.
  - تجرى الفحوص على عينة دم، غالبا مسحوبة على EDTA والذي يقوم بخلب الكالسيوم. وهذا يجنب تشكل خثرة في الانبوب. وجود خثرة يؤدي الى نتائج خاطئة.
  - الاجهزة تعمل على حجم صغير جدا(50 ميكروليتر µl او اقل)
  - من الممكن اذا اجراء التعداد على عينات شعرية دقيقة. وهذا مفيد جدا عند الطفل او عند المرضى الذين لديهم صعوبة في الوصول للوريد.

نتائج تعداد الدم

	الرجل	المراة	الطفل
الكريات البيض	4-10 000/mm³	4-10 000/mm³	**5-15 000/ mm³**
الكريات الحمر	4.5-6 000 0000/mm³	**4-5 500 000/ mm³**	4.5-6 000 0000/mm³
الخضاب	13-17 g/dl	**11.5-15 g/dl**	12-14 g/dl
الهيماتوكريت	0.40-0.54	**0.37-0.47**	0.36-0.44
MCV	80-100 fl	80-100 fl	80-100 fl
MCH	27-32 pg	27-32 pg	27-32 pg
MCHC	30-36 g/dl	30-36 g/dl	30-36 g/dl
الشبكيات	20-120 000/ mm³	20-120 000/ mm³	20-120 000/ mm³
الصفيحات	140-400 000/ mm³	140-400 000/ mm³	140-400 000/ mm³
PN	2-7500/ mm³	2-7500/ mm³	2-7500/ mm³
PE	40-500/ mm³	40-500/ mm³	40-500/ mm³
PB	10-100/ mm³	10-100/ mm³	10-100/ mm³
Lymphocyts	1500-4 000/ mm³	1500-4 000/ mm³	**3 000-6 000/ mm³**
Monocyts	200-1 000/ mm³	200-1 000/ mm³	200-1 000/ mm³

القيم الطبيعية لعداد الدم عند الرجل، المراة والطفل

نتائج تعداد الدم

- **الكريات البيض:**
  - الجهاز يعطي عدد الكريات البيض في وحدة حجم الدم.
  - الصيغة ستسمح لاحقا بتحديد كمية كل واحدة من السلالات.
- **الكريات الحمر:**
  - الجهاز يعطي عدد الكريات الحمر في وحدة حجم الدم
  - لكن أيضا مناسب(ثوابت) الكريات الحمر:
    - مستوى الخضاب
    - الهيماتوكريت
    - متوسط حجم الكرية
    - متوسط تركيز الخضاب في الكرية
    - و متوسط حمل الكرية من الخضاب
  - الاجهزة تقدم ايضا منحنيات توزع حجم الخلايا و مؤشرات التوزع والتي فعليا قليلة الاستعمال في الممارسة.
- **الصفيحات:**
  - تشير الاجهزة الى عدد الصفيحات في وحدة حجم الدم
  - ومؤشرات توزع الحجم والابعاد.

صيغة الكريات البيض

هي التوزع بالنسبة المئوية في 5 مجموعات كبيرة للكريات البيض الموجودة عند البالغ الطبيعي:

- عديدات نوى معتدلة
- عديدات نوى حامضية
- عديدات نوى أسسة
- خلايا وحيدة
- خلايا لمفاوية

- الكثير من الاجهزة تجري صيغة الكريات البيض بشكل آلي
- تفسير الصيغة يجب الا ياخذ بالحسبان الا للرقم الكلي لكل مجموعة من الكريات البيض بوحدة الحجم (يعبر عنها/ مثلا، بعدد الخلايا في ملم^3)

مثال: ان التبدل من 40% عديدات نوى معتدلة الى 10% يمكن ان يعود اما الى نقص في عديدات النوى المعتدلة، او الى زيادة مجموعة خلوية اخرى كالخلايا اللمفاوية.

اذا يجب ان نعتمد دائما على القيم المطلقة المعطاة من الجهاز او المحسوبة اعتبارا من الكريات البيض والنسب المئوية.

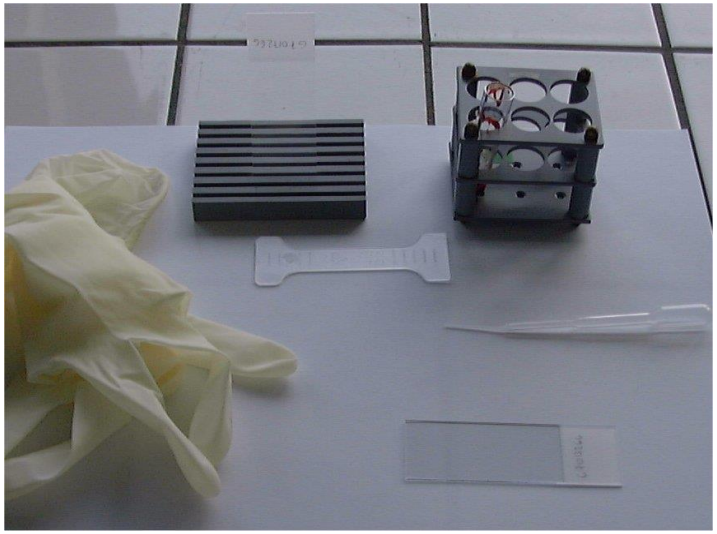
اللطاخة الدموية

تحضر اللطاخة من قطرة دم ممدودة على شريحة

افضل تقنية هي سحب نقطة دم من الاصبع واجراء مد للخلايا الطازجة

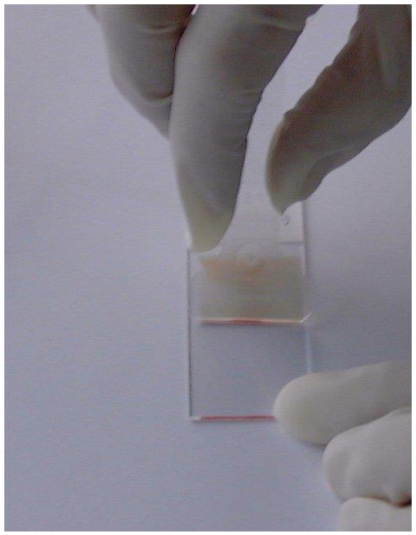
غالبا، ولاسباب عملية، تجرى اللطاخة من نقطة من دم مسحوب في انبوب لاجراء تعداد الدم.

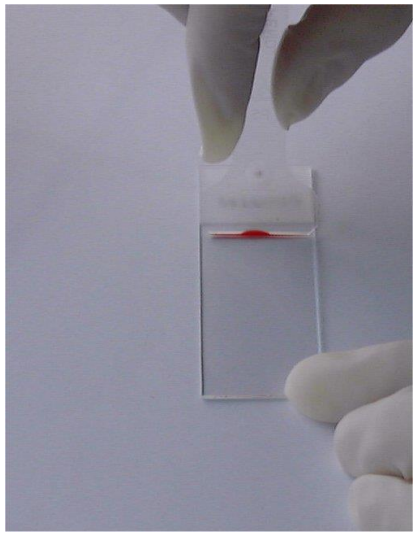
اللطاخة يجب ان تمد بشكل صحيح، لتفصل الخلايا جيدا. ثم تجفف دون ان تثبت ثم تلون. الملون الاكثر استعمالا هو ملون May-Grünwald-Giemsa .



قم باجراء حركة نقل افقي سريعة محافظا على زاوية 45 ° تقريبا دون الضغط، على طول الصفيحة

جفف بالتحريك لتثبيت موؤقت للخلايا





ضع الصفيحة بحيث تاخذ كامل القطرة

تترك لتتوزع بشكل متجانس على طول الشطبة او تماس الميلان

اللطاخة الدموية

معلومات مقدمة بواسطة اللطاخة الدموية

- **الكريات البيض**
  - صيغة الكريات البيض من 100 او 200 خلية(نسب مئوية)
  - شذوذات شكلية للكريات البيض: يمكن ان تكون تغيرات شكلية للخلايا الموجودة عادة:
    - عديدات نوى ذات نواة غير مفصصة
    - خلايا لمفاوية ذات سيتوبلازما مفرطة الاسسة
    - وجود اورمات بيض ابيضاضية.
- **الكريات الحمر:** الفحص المجهري يسمح بالتعرف على شذوذات:
  - الحجم: كبر كريات، صغر كريات، تفاوت الكريات
  - الشكل: فصيمات كروية، تمنجل الدم...الخ
  - التلون: تبكل الكريات او شذوذات مرافقة لتغيرات حجم الكريات الحمر
  - اندخالات من منشا طفيلي او بقايا نووية.
- **الصفيحات:** فحص لطاخة الدم لا يقدم مساعدة كبيرة في اضطراب صفيحات الدم
  - الشذوذات المصادفة احيانا هي صفيحات عملاقة: خلايا تخثرية كبيرة.

تفسير تعداد الدم

- دراسة تحليلية للتبدلات الكمية والكيفية للسلاسل المختلفة
- الوصول الى تشخيص اعتبارا من تجميع هذه التبدلات

تفسير تعداد الدم-الكريات البيض

زيادة الكريات البيض: ارتفاع مستويات الكريات البيض فوق 10×10 ^{9}/ل

- **نقص الكريات البيض:** انخفاض عدد الكريات البيض تحت 4 ×10 ^{9}/ل
- **زيادة عديدات النوى المعتدلة:** ارتفاع مستوى عديدات النوى المعتدلة فوق 7.5 ×10 ^{9}/ل
- **نقص المعتدلات:** انخفاض مستوى عديدات النوى المعتدلة تحت 2 ×10 ^{9}/ل
- **زيادة الحامضات:** ارتفاع مستوى عديدات النوى الحامضية فوق 0.5 ×10 ^{9}/ل
- **نقص الحامضات:** غياب او انخفاض شديد لعدد عديدات النوى المعتدلة(تحت 0.04 ×10 ^{9}/ل)
- **زيادة عديدات النوى الاسسة:**لايوجد راي متفق ليه حول الرقم الاعظمي. نقص عدد عديدات النوى الأسسة؟
- **زيادة الخلايا اللمفاوية في الدم:** ارتفاع مستوى الخلايا اللمفاوية فوق 4 ×10 ^{9}/ل
- **نقص اللمفاويات:** انخفاض مستوى الخلايا اللمفاوية تحت 1.5 ×10 ^{9}/ل
- **زيادة الوحيدات في الدم:** ارتفاع عدد الخلايا الوحيدة الدموية فوق 1 ×10 ^{9}/ل
- **نقص الوحيدات:** انخفاض مستوى الخلايا الوحيدة تحت 0.2 ×10 ^{9}/ل

- **وجود غير الطبيعي في الدم لبعض الخلايا النقوية:** خليفة النقوية، النقوية وحتى سليفة النقوية. وجود هذه الخلايا يدعى نقوية الدم. وهي ليست ذات قيمة الا اذا كانت اكثر من 5% من الكريات البيض.
- **وجود خلايا مرضية في الدم:** اورمات البيض الابيضاضية، خلايا لمفاوية سرطانية.

تفسير تعداد الدم- الكريات الحمر

يشمل تعداد الدم 6 متغيرات هامة:

- عدد الكريات الحمر
- مستوى الخضاب
  - يقاس بواسطة الجهاز بقنية لونية
  - تحدد كمية خضاب الكريات الحمر الموجودة في حجم من الدم
  - يعبر عنها عادة عكس التوصيات العالمية، ب غ/دل
- الهيماتوكريت
  - يمثل الهيماتوكريت الحجم الذي تشغله الكريات الحمر في حجم معين من الدم.
  - يعبر عنه الهيماتوكريت بنسبة مئوية او ب l/l
  - يمكن ان يقاس مباشرة دون جهاز بعد تنبيذ بسيط للدم(التخدير والانعاش: هيماتوكريت دقيق وريدي)
  - الاجهزة الآلية الحالية لاتقيس الهيماتوكريت: في معظم الوقت هي تحسبه.

الهيماتوكريت ومستوى الخضاب هما العنصران الاكثر اهمية لوضع تشخيص فقر دم

تفسير تعداد الدم- الكريات الحمر

- **متوسط حجم الكرية الحمراء** MCV
  - هذه القيمة تمثل الحجم الوسطي لكرية حمراء
  - كانت في السابق تحسب الصيغة التالية:

متوسط حجم الكرية الحمراء= الهيماتوكريت/ عدد الكريات الحمر

  - الاجهزة الحالية تقيس مباشرة الحجم الوسطي للكريات الحمر ثم تحسب الهيماتوكريت بضرب الحجم الوسطي للكرية الحمراء بعدد الكريات الحمر
  - زيادة حجم الكرية الوسطي يدعى كبر الكريات
  - نقص هذا الحجم الكريوي الوسطي يسمى صغر كريات.
- **حمل الكرية الوسطي من الخضاب(يسمى ايضا محتوى وسطي من الخضاب في الكرية)** MCH
  - وزن الخضاب في كل كرية حمراء، تحسب بالصيغة التالية:

متوسط حمل الخضاب في الكرية الحمراء= الخضاب /عدد الكريات الحمر

- **وسطي تركيز الخضاب في الكرية(MCHC)**

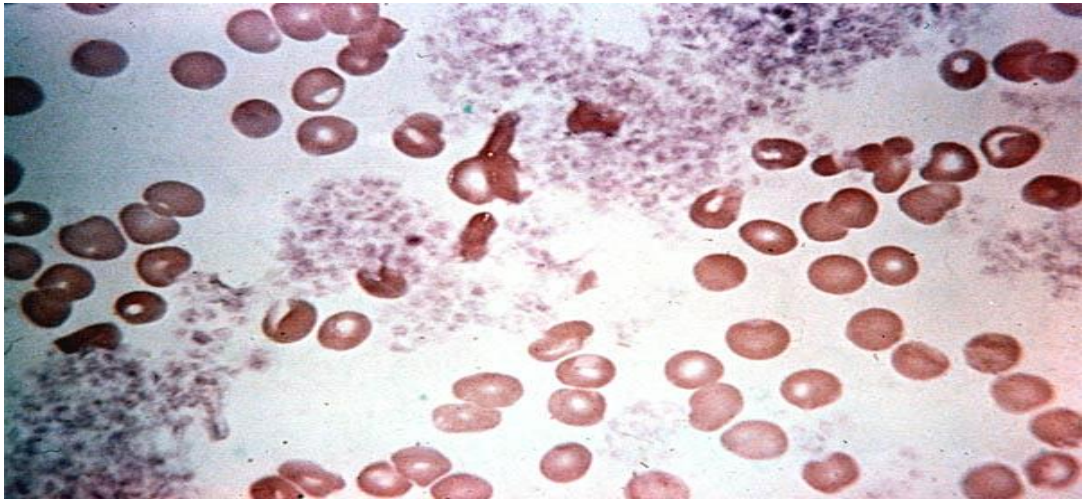
هو الحجم الذي بشغله الخضاب في كرية حمراء. وهو يعبر عنه اذا بنسبة مئوية او بليتر بالليتر.

متوسط تركيز الخضاب في الكرية الحمراء= الخضاب /الهيماتوكريت

  - MCHC لا يمكن ان يزداد
  - كل زيادة اعلى من 36% تتعلق عادة بخطا تقني: سوء ضبط الجهاز، اوتداخلات.

تفسير تعداد الدم- صفيحات

- الرقم الطبيعي للصفيحات هو من 150-400 ×10 ^{9} /ل (000 150- 000 400 /ملم^{3})
- انخفاض عدد الصفيحات يدعى قلة الخلايا التخثرية thrombocytopénie او قلة الصفيحات thrombopénie.
- ارتفاع عدد الصفيحات يسمى كثرة الخلايا التخثرية thrombocytose.
- يوجد سبب للخطا بالنسبة لنقص الخلايا التخثرية:
  - وجود خثرة في الانبوب
  - لدى بعض الافراد، مضاد التخثر المستعمل في تعداد الدم (EDTA) يحدث تجمع للصفيحات والذي يجعلها تترسب اذا في الانبوب. هذا يعطي نقص صفيحات كاذب.
  - من الضروري اذا امام نقص صفيحات اجراء تحقق من عدد الصفيحات على مضاد تخثر آخر:سيترات ، هيبارين.



MYELOGRAMME مخطط النقي

- دراسة خلوية لنقي العظم
- فحص السائل النقوي المسحوب بالبزل
- يقدم معلومات كيفية لكن ايضا عن تغيرات في عدد الخلايا بعضها لبعض
- اقل دقة لتقدير كمي للتبدلات الخلوية.

أ-اجراء مخطط النقي:

- على مستوى القص: مخطط قصي هو المستعمل غالبا
- او على مستوى عظم الحرقفة: مخطط حرقفي :
  - عند الطفل
  - عند .استحالة بزل القص او عدم القدرة على تفسيره

- المبزل المستخدم لمخطط النقي يدعى مبزل Malarme
- تقنية مثالية لاخذ اقل مايمكن من عصارة النقي
- الكميات الكبيرة تحمل بالفعل كمية اكبر بكثير من الخلايا الدموية ومن هنا عامل تمديد مزعج للتفسير
- السائل المسحوب بالبزل يمد فورا على صفيحة زجاجية ثم يجفف بالهواء الحر. ثم يلون فيما بعد.
- التلوين الذي يفضل استخدامه هو May Grunwald Giemsa.
- في بعض الحالات: تقنيات كيميائية خلوية تعلم بشكل نوعي بعض انواع الخلايا
  - تفاعل كيميائي مستخدم كثيرا هو تفاعل بيرل الذي يسمح بتسليط الضوء على وجود الحديد في الخلايا.

تفسير مخطط النقي

- النتائج بشكل نسبة مئوية
- غنى نقي العظم:
  - كثافة خلوية تتدرج من 0 الى 5
  - او تقيم بصفات(ضعيف، متوسط، قوي)

خلايا جذعية غير متمايزة	%2 >
سلالة المحببات	%70-50
معتدلات	
-ارومات نقوية	%3 >
-خلايا سليفة نقوية	%5 >
-خلايا نقوية	%20-5
-خلايا خليفة نقوية	%20-5
-عيدات نوى	%25-10
حامضيات واسسات	%4 >
السلالة المولدة للكريات الحمر	%30-10
سليفة ارومات الحمر	%2-0
ارومات حمر اسسة	%4-2
ارومات حمر متعددة التلون	%8-4
ارومات حمر حامضية	%6-3
سلالة خلايا النواءات	موجودة
خلايا النواءات	

تفسير مخطط النقي

- **السلالة المولدة للكريات الحمر**
  - تمثل عادة اقل من ثلث الخلايا المنواة لنقي العظم
  - المراحل المختلفة للنضج يمكن ان تميز:
    - اورمات حمر أسسة، متعددة التلون، حامضية.
    - تبدلات شكلية : أورمات ضخمة ، وجود تبدلات نووية او اندخالات سيتوبلازمية من نوع اجسام جولي Jolly.
- **سلالة الخلايا المحببة**
- النسبة المئوية للحلايا المحببة: غالبا50-70% من نقي العظم
- عد حسب مرحلة النضج: اورمة نقوية، خلية سليفة نقوية، خلية نقوية، خلية خليفة نقوية
  - يكشف تبدلات كيفية عديدة:
    - لاتزامن في النضج
    - زيادة الخلايا الشابة.
- الخلايا البيض الاخرى اقل اهمية كميا:
  - الخلايا اللمفاوية: 5- 20% من الخلايا النقوية
  - الخلايا البلازمية : اقل من 4%
  - الخلايا الوحيدة نادرا ماتعد وهي ضعيفة التمثيل لدى الشخص البالغ الطبيعي.

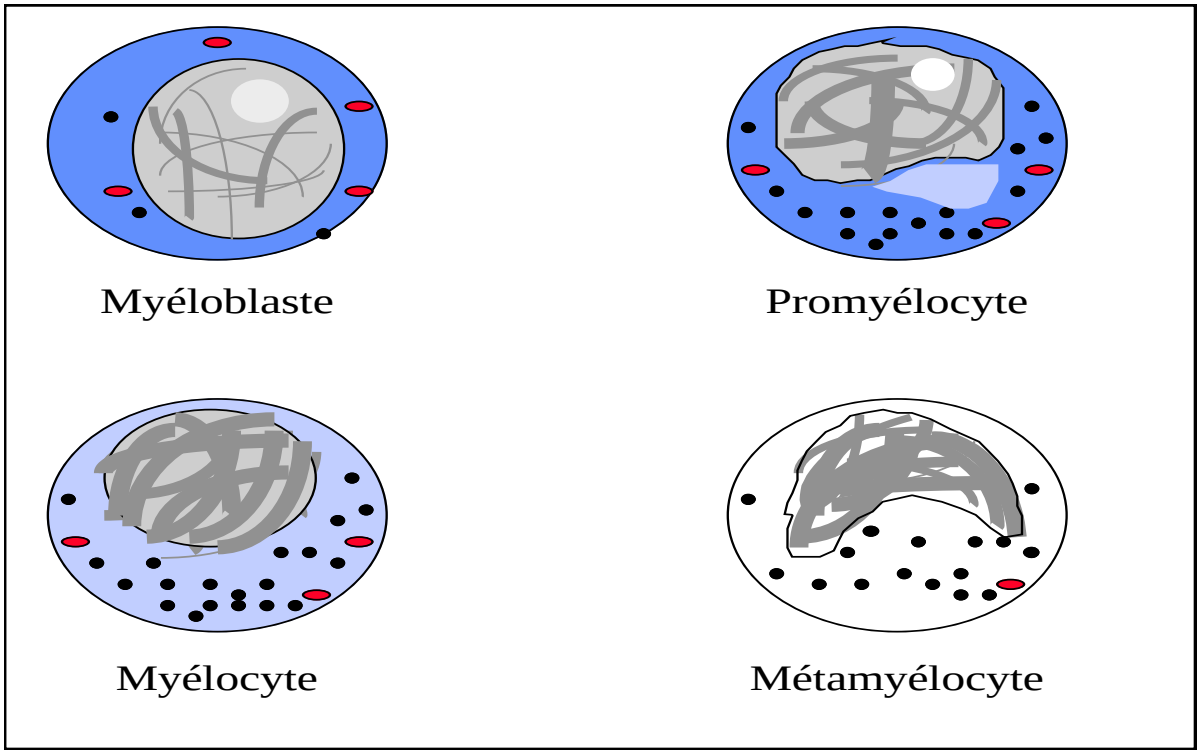
البحث عن وجود خلايا بيضاء غير طبيعية:

- اورمات بيض لابيضاض الدم الحاد
- خلايا لمفاوية للمفوما

تفسير مخطط النقي

- سلالة الصفيحات:
  - قليلة الاهمية كميا
  - التعرف عليها سهل جدا على مخطط النقي
  - غنى تانقي بخلايا النواءات
  - تبدلات شكلية لسلالة النواءات: عسر تكون الصفيحات، وجود نواءات دقيقة.
- ان دراسة النقي يجب ان تبحث بانتباه عن وجود خلايا مرضية.

من المهم ان يجرى مخطط النقي بشكل متقن: تقنية سيئة تجعل اللطاخة غير قابلة للتفسير او حتى يمكن ان تؤدي لاخطاء تشخيصية خطيرة.



خزعة النقي

- فحص تشريحي-مرضي
- دراسة الهندسة المعمارية لنقي العظم
- هي اقل دقة من مخطط النقي في التعرف على المجموعات النقوية المختلفة
- تجرى بمبزل Jamshidi او Tanzer، او بمبازل مشتقة
- تحت تخدير موضعي
- على مستوى عظم الحرقفة
- تتطلب مهارة تقنية جيدة من القائم بها وعقامة صارمة
- العينة تثبت فورا(فورمول) ثم ترسل الى مخبر التشريح المرضي:
  - يزال منها الكلس قبل ان تعامل ككل عينات التشريح المرضي
  - مع اجراء مقاطع رقيقة ثم تلوينات مختلفة.

مظهر العينة:

- حواجز عظمية تفصل المناطق المكونة للدم
- عدد كبير من المساحات الفارغة التي تتعلق بالخلايا الشحمية(كون الشحم قد انحل بالتثبيت والتلوين)
- بين هذه المساكن الشحمية يمكن ان نميز الخلايا المكونة للدم:
  - في بعض الامراض، المساكن الشحمية تتسع او تمتد: نتحدث عن تطور شحمي لنقي العظم كما في **عدم تنسج نقوي**
  - في امراض اخرى على العكس، هذه المساكن العظمية تختفي: فرط تصنع نقوي يمكن ن يتعلق بتناذر نقوي تكاثري.
- في بعض الحالات نلجا الى تلوينات نوعية: الاكثر استعمالا تلوين الياف الريتيكولين fibres de réticuline : **تليف النقي**.
- تسمح خزعة نقي العظم بالتعرف على وجود ارتشاحات بخلايا مرضية، لمفوما او سرطانية.

دراسة العقدة اللمفاوية

- **دراسة خلوية**
  - بزل خلوي بسيط للعقدة اللمفاوية
    - يجب ان يستخدم ويفسر بحذر كبير
    - لايقدم معلومات باي حال عن نسيج العقدة اللمفاوية
    - استطباباته محدودة جدا
    - ليس اختبار تشخيص بل فحص موجه بل حتى في بعض الحالات لمراقبة مرض معروف.
    - البزل الخلوي FNA هو فحص صعب.
    - لايجب باي حال محاولة سحب العصارة العقدية لانه يوجد فورا تمدد بالدم
    - الخلايا يجب ان تصعد بالخاصية الشعرية في ابرة مزروعة داخل العقدة
    - الكمية القليلة جدا من العصارة العقدية المسحوبة ستوضع لاحقا على صفيحة وتمد وتلون ب .MGG.
- **البصمة العقدية**
  - اكثر اهمية بكثير لكنه يتطلب خزعة من العقدة
  - مساعد ممتاز لفحص التشريح المرضي المجرى على خزعة
  - تسمح احيانا بتمييز افضل للمجموعات الخلوية اللمفاوية المرضية
- **خزعة العقدة**
  - هو فحص تشريح مرضي تقليدي.
  - من المهم الطلب من الجراح الذي يستخرج العقدة بقطع العقدة واجراء بدائل.(عدة عينات).

فحوصات أحرى

التدفق الخلوي FLOW CYTOMETRY

- وصم الخلايا الدموية بمساعدة اضداد وحيدة نسيلة متالقة، يتعرف الجهاز بعدها على الخلايا الموصومة بهذه الاضداد.
- يطبق التدفق الخلوي بشكل اساسي:
  - عد الخلايا الشبكية
  - دراسة المجموعات الفرعية للخلايا اللمفاوية: مثل عد الخلايا اللمفاوية CD4, CD8 في اطار مرض HIV
  - دراسة امراض الدم الخبيثة: من المهم اجراء تنميط مناعي جيد للخلايا الابيضاضية لحظة التشخيص لان هذا يمكن ان يكون عنصرا مهما للمتابعة.
  - تقنيات اخرى قيد التطوير: دراسة تفعيل الصفيحات، اثبات وجود اضداد مثبتة على الصفيحات.

الوراثة الخلوية Cytogenetics

- مكمل هام للدراسة الخلوية في بعض امراض الدم: ابيضاضات نقوية مزمنة، ابيضاضات حادة.
- التقنيات تستخدم الزرع الخلوي
- يمكن ان تجرى على خلايا دم ابيضاضية، على خلايا نقوية تم الحصول عليها عند اجراء مخطط النقي او على خلايا عقدية لامراض الدم الخبيثة
- من المهم اعلام اخصائي الوراثة الخلوية عن مصدر العينة، نمط الخلايا التي نرغب الحصول على دراسة صبغية لها
- في الدمويات تجرى على الخلايا الورمية (ابيضاضية، لمفوماوية).
- تؤكد تبدلات خلوية وراثية مكتسبة للسلالة المدروسة، المختلفة كثيرا عن التبدلات المصادفة في الامراض الخلقية والتي تحملها كل الخلايا البدنية.

فحوصات أحرى

البيولوجيا الجزيئية

- تطبق تقنيات البيولوجيا الجزيئية بشكل متزايد في الدمويات وبشكل خاص لامراض الدم الخبيثة
- التطبيقات الاساسية:
  - المساعدة على التشخيص في الامراض المكتسبة(ابيضاض نقوي مزمن، بعض الابيضاضات الحادة، بعض اللمفومات).
  - خارج الدمويات الخلوية: الهيموفيليا، امراض الخضاب، الاستعداد للتخثر.

تحاليل وظيفية للمجموعات الخلوية المختلفة

يتوفر اختبارات كثيرة جدا لدراسة وظائف عديدات النوى المعتدلة، الصفيحات والكريات الحمر.

الدراسة بالنظائر

- يتناقص استعمالها في الدمويات لانها طويلة ومكلفة
- يمكن ان نحدد بمساعدة نظائر:
  - متوسط عمر الكريات الحمر ومكان تخربها
  - او متوسط عمر الصفيحات والمكان الرئيسي لتخربها

هناك عدد كبير من الفحوص اكثر فاكثر دقة في الدمويات. المهم هو استخدام هذه الفحوصات بشكل صحيح وبالتالي ان نعرف جيدا حدود قيمة هذه الفحوصات واستطباباتها.