



ЗНАЧЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВИЗНАЧЕННЯ ПАРАМЕТРІВ РЕТИКУЛОЦИТІВ У КЛІНІЧНІЙ ПРАКТИЦІ

Л.І. СЕРГІЄНКО

к. мед. н., доцент кафедри клінічної лабораторної діагностики Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика

Контакти:

Сергієнко Людмила Іванівна
НМАПО ім. П.Л. Шупика,
кафедра клінічної лабораторної
діагностики
04112, Київ, Дорогожицька, 9
тел.: +38 (050) 035 89 47
e-mail: l_i_sergienko@ukr.net

ВСТУП

Загальноклінічні методи дослідження периферичної крові посідають важливе місце в діагностиці та моніторингу лікування гематологічних захворювань. До важливих показників периферичної крові належить визначення кількісних і якісних характеристик ретикулоцитів. Нами проведений аналіз літературних джерел з метою систематизації та узагальнення даних літератури про діагностичне значення змін параметрів ретикулоцитів.

АНАЛІЗ ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ

Ретикулоцити – це молоді еритроцити, в яких при суправітальному фарбуванні виявляється ретикулофіламентозна субстанція [1]. Субстанція ретикулоцитів являє собою агрегати з мітохондрій, рибосом, залишків ендоплазматичного ретикулуму та інших органел, які наявні в ретикулоциті. У міру дозрівання ретикулоцитів ця субстанція визначається у вигляді клубків, зернистості, сіточки або окремих пилинок. Дозріваючи, кількість сітчастої субстанції в ретикулоцитах зменшується [2].

Час дозрівання ретикулоцитів становить 4,5 доби, з них протягом 3 діб вони дозрівають у периферичній крові [1]. Більшість ретикулоцитів проводять у кістковому мозку 1–2 доби перед виходом у системну циркуляцію. Вийшовши в циркуляцію, де вони становлять 1–2% серед еритроцитів, ретикулоцити дозрівають протягом 1–2 діб, в подальшому перетворюючись на нормоцити [3].

Незважаючи на відсутність ядра, метаболізм в цих клітинах залишається активним. У них ви-

являють внутрішньоклітинні структури, пов'язані із синтезом білків (мітохондрії, рибосоми, апарат Гольджі). Багато ферментів (піруваткіназа, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, каталаза та ін.) присутні в ретикулоцитах у більшій концентрації, ніж у зрілих еритроцитах. Перебуваючи в кістковому мозку, ретикулоцити здатні синтезувати гемоглобін. Одночасно в ретикулоцитах існує анаеробний гліколіз. Вони містять ті ж поверхневі антигенні структури, що й еритроцити (глікофорин А, групові антигени). Ретикулоцити здатні адсорбувати молекули заліза за допомогою рецепторів до трансферину, щільність яких знижується в міру дозрівання клітини [1]. У процесі подальшого дозрівання клітин відбувається зникнення полірибосом та екзоцитоз мітохондрій, що проявляється у зменшенні кількості ретикулофіламентного матеріалу. На кінцевій стадії ретикулоцит втрачає здатність до синтезу гемоглобіну та утилізації кисню для синтезу аденозинтрифосфornoї кислоти [4].

Середній обсяг ретикулоцитів на 24–35% більший за обсяг еритроцитів (101–128 фл), а концентрація гемоглобіну в них нижча, ніж у зрілому еритроциті, що пояснює появу гіпохромних макроцитів в периферичній крові при станах, що супроводжуються ретикулоцитозом [4].

Залежно від ступеня зрілості виділяють 5 груп ретикулоцитів [4, 5, 6]:

0 група – еритрокаріоцити з густою ретикулофіламентною сіткою в центрі (оксифільний нормоцит);

- ❖ I група – ретикулоцити з грубою кулястою сіткою в центрі;
- ❖ II група – ретикулоцити з менш густою сіткою, поширеною по всій цитоплазмі;
- ❖ III група – клітини з обривками ретикулофіламентної сітки в різних ділянках цитоплазми;
- ❖ IV група – ретикулоцити з одиничними нитками або гранулами ретикулофіламентної сітки в окремих ділянках цитоплазми.

У нормі в периферичній крові виявляються ретикулоцити III–IV груп (близько 61% ретикулоцитів належать до IV групи, 32% – до III, 7% – до II і лише приблизно 0,1% – до I групи). Ліве зрушення ретикулоцитів в бік незрілих клітин (0–I–II групи) на фоні ретикулоцитозу спостерігається при активації еритропоезу [4].

Регуляція еритропоезу, в тому числі і швидкість дозрівання ретикулоцитів, здійснюється за допомогою еритропоетина [1]. При високій швидкості еритропоезу кістковий мозок вивільняє в кров ядровмісні попередники еритроцитів. У відповідь на гіпоксію підвищується продукція еритропоетина, що призводить до посилення еритропоезу з гіперплазією еритроїдного паростка (переважання попередників еритроцитів над попередниками лейкоцитів). Знижена швидкість утворення ретикулоцитів може свідчити про неефективний еритропоез, при якому руйнування попередників еритроцитів у кістковому мозку відбувається швидше, ніж вивільнення в кров, або про інфільтрацію кісткового мозку пухлинними чи аномальними клітинами. Зменшення числа ретикулоцитів відзначається також при апластичних станах, для яких характерне зниження продукції лейкоцитів і еритроцитів. У будь-якому випадку, продукція ретикулоцитів є найважливішим показником функціонального стану кісткового мозку [7]. Збільшення вмісту ретикулоцитів в крові свідчить про прискорення еритропоезу, що найбільш характерно для гемолітичних анемії [3].

Кров дорослої людини містить від 2 до 10 ретикулоцитів на 1000 еритроцитів ($30\text{--}70 \times 10^9/\text{л}$) [1, 8]. Кількість ретикулоцитів значною мірою залежить від віку і статі пацієнта. У жінок вміст ретикулоцитів вищий, ніж у чоловіків, а у новонароджених в пуповинній крові їх кількість коливається в межах 20–60% [9, 10]. Число ретикулоцитів у крові відображає регенеративні властивості кісткового мозку. Збільшення їх кількості спостерігається при посиленій регенерації кровотворення, а зменшення – при пригніченні регенеративної функції кісткового мозку.

Підвищення кількості ретикулоцитів можливе при гемолітичних анеміях, особливо в період кризи (кількість ретикулоцитів може підвищуватися до 20–30% і більше); на фоні лікування ціанкобаламіном B_{12} -дефіцитної анемії (ретикулоцитарний криз на 5–9-й день лікування); на 3–5-й день лікування залізодефіцитної анемії за допомогою парентерального введення препаратів заліза; на 3–5-й день після крововтрати (ретикулоцитарний криз); при гострій нестачі кисню, таласемії, малярії [5, 8, 9].

Зниження кількості ретикулоцитів можливо при апластичних та гіпопластичних анеміях, нелікованій B_{12} -дефіцитній анемії, метастазах новоутворень в кістки, аутоімунних захворюваннях системи кровотворення, алкоголізмі, мікседемі, захворюваннях нирок [5, 8, 9].

Ретикулоцити неможливо розрізнити після звичайного фарбування для підрахунку лейкоцитарної формули, проте вони можуть бути виявлені після прижиттєвого фарбування клітин брильянтовым крезильовим синім або новим метиленовим синім [11] з подальшою мікроскопією мазків за методом Фоніо: при цьому проводиться підрахунок клітин зеленувато-блакитного кольору з фіолетово-синьою внутрішньоклітинною зернистою субстанцією в 1000 еритроцитів [12]. Суправітальне фарбування можна здійснювати декількома способами. Перший – це фарбування на склі, коли мазок крові наносять на тонкий мазок фарби і витримують у вологій камері 3–5 хв. Другий – фарбування в пробірці, при цьому кілька крапель крові змішують з рівним об'ємом 1% розчину брильянтового крезильового синього у фізіологічному розчині, витримують 20–30 хв, потім готують мазки [12].

Нині все більше уваги приділяється автоматизованому аналізу ретикулоцитів, який відрізняється більшою точністю (досліджуються 30 000 і більше еритроцитів) та відтворюваністю (коефіцієнт варіації становить близько 6%), ніж ручний метод, забезпечує можливість отримання нових показників, що оцінюють ступінь зрілості ретикулоцитів шляхом вимірювання в них вмісту РНК. Дані низки авторів, які проводили співставлення коефіцієнта варіації при порівнянні автоматизованого і ручного методів, засвідчили, що у пацієнтів із рівнем ретикулоцитів близько 9% коефіцієнт варіації для автоматизованого методу становив 5,8%, для ручного методу – 27,2% [4].

У зв'язку з появою високотехнологічних гематологічних аналізаторів стало можливим отримувати не тільки класичні, але й додаткові інформативні ретикулоцитарні параметри [2, 4, 5, 12, 13].

Класичні параметри ретикулоцитів:

- ❖ RET% – відносна кількість ретикулоцитів (%);
- ❖ RET# – абсолютна кількість ретикулоцитів ($\times 10^9/\text{л}$).

Ретикулоцитопенія – індикатор пригнічення еритропоезу. А нормалізація абсолютної кількості ретикулоцитів є показником відновлення проліферативної активності еритрокаріоцитів.

Ретикулоцитоз із різким збільшенням фракції незрілих ретикулоцитів на тлі активного еритропоезу відображає підвищену регенеративну здатність кісткового мозку. Ретикулоцитоз, що триває, може свідчити про наявність кровотечі.

Хибне підвищення даних параметрів спостерігається при наявності включень в еритроцитах (тільця Жоллі, малярійні паразити), високому лейкоцитозі, аномальних формах гемоглобіну, гіпертромбоцитозі, наявності гігантських форм тромбоцитів.

Об'ємні параметри ретикулоцитів:

- ❖ MCVR (Mean Cell Volume Reticulocytes) – середній об'єм ретикулоцитів (фл);
- ❖ MSRV (Mean Sphered Reticulocyte Volume) – середній об'єм сферичних ретикулоцитів (фл).

Об'ємні показники ретикулоцитів можуть використовуватися при діагностиці залізодефіцитної анемії, моніторингу відповіді на терапію залізовмісними препаратами, фолієвою кислотою, вітаміном B_{12} .

Низький об'єм ретикулоцитів пояснює появу мікроцитів у периферичній крові.

Зміна MSRV у спортсменів свідчить про зловживання препаратами, що стимулюють еритропоез.

Показники, що характеризують ступінь зрілості ретикулоцитів:

- LFR% – популяція малих зрілих ретикулоцитів (87–99%);
- MFR% – популяція середніх ретикулоцитів (2–12%);
- HFR% – популяція великих незрілих ретикулоцитів (1–2%);
- MFR+HFR визначається як фракція незрілих ретикулоцитів – IRF (Immature Reticulocyte Fraction) (2–14%).

Параметр IRF може слугувати індикатором активності еритропоезу. Збільшення IRF свідчить про прискорений викид незрілих клітин із кісткового мозку. Цей показник підвищується значно раніше (зазвичай, на 2 дні) за RET% і може слугувати найчутливішим маркером у моніторингу за станом еритропоетичної активності кісткового мозку та ефективності лікування вітаміном B₁₂, фолієвою кислотою, препаратами заліза та еритропоетином [10].

Зрілі ретикулоцити втрачають РНК в процесі дозрівання в еритроцити в середньому протягом 24 год. При посиленні еритропоезу та продукції еритропоетина нирками з кісткового мозку надходять в циркуляцію незрілі ретикулоцити, при цьому період їх дозрівання у крові подовжується і становить від 1,5 до 2,5 діб. Поява незрілих ретикулоцитів у крові відповідає явищу поліхромазії еритроцитів у пофарбованому мазку крові [4]. Ці фізіологічні особливості ретикулоцитів беруться до уваги під час розрахунку приладами ретикулоцитарних індексів.

Ретикулоцитарні індекси:

- CRC (Corrected Reticulocyte Count) – скоригований підрахунок ретикулоцитів;
- RPI (Reticulocyte Production Index) – індекс продукції ретикулоцитів.

У разі зміни тільки гематокриту розраховується CRC за формулою:

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

Ht – гематокрит пацієнта;

RET% – кількість ретикулоцитів (%) у крові при даному гематокриті;

0,45 – ідеальний гематокрит.

Якщо у пацієнта одночасно з низьким гематокритом (Ht) у периферичній крові присутні незрілі ретикулоцити (MFR і HFR), то розраховується RPI за формулою:

$$RPI = RET (\%) \times \frac{Ht}{0,45 \times \text{дні циркуляції RET в крові}}$$

Параметр RPI широко варіює залежно від ступеня тяжкості анемії, продукції еритропоетина та інших факторів. Зниження даного індексу менше 2,0 вказує на низьку проліферативну активність еритрокаріоцитів.

RPI розраховується при вираженій анемії та/або високому ретикулоцитозі, при яких секреція еритропоетина, як правило, підвищена. У пацієнтів із помірно вираженою анемією або низьким вмістом ретикулоцитів важливо відзначити наявність або відсутність поліхромазії в пофарбованому мазку. Так, поліхромазія не спостерігається в біль-

шості хворих із анемією хронічних захворювань, при яких рівень продукції еритропоетина знижений. І, навпаки, при недостатності кісткового мозку та низькому вмісті ретикулоцитів наявність поліхромазії відображає активну секрецію еритропоетина [4].

Розрахунок означених індексів дозволяє правильно оцінити характер еритропоезу, а отже – вибрати адекватну програму лікування пацієнтів.

Найпоширенішим методом автоматизованого аналізу ретикулоцитів є метод проточної цитометрії. В різних аналізаторах використовуються різні реагенти і принцип вимірювання ретикулоцитів. На підставі принципу проточної цитофлуориметрії в ретикулоцитарному каналі гематологічного аналізатора стає можливим диференціювати ретикулоцити, які флуоресціюють від нефлуоресціюючих (негативних) еритроцитів [4].

За інтенсивністю включення поліметина, що залежить від вмісту РНК в клітині, ретикулоцити поділяють за ступенем зрілості на три популяції: ретикулоцити з низькою, середньою і високою флуоресценцією. Результати відображаються у вигляді скатерограми ретикулоцитарного (RET) каналу. Синій кластер відповідає еритроцитам (RBC), фіолетовий – зрілим ретикулоцитам (LFR), червоний – фракції незрілих ретикулоцитів (MFR + HFR) із середньою (MFR) і високою (HFR) флуоресценцією. Нижній блакитний кластер складають тромбоцити (PLT) (рис.) [4].

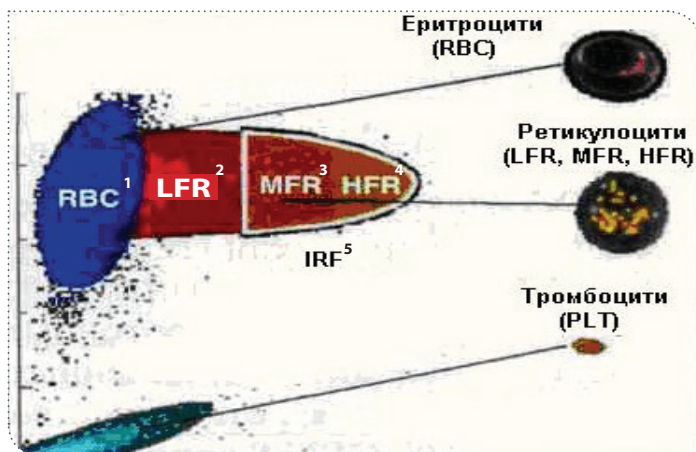


РИСУНОК. СХЕМА РОЗПОДІЛУ КЛІТИН В РЕТИКУЛОЦИТАРНОМУ КАНАЛІ

¹ Еритроцити (RBC)

² Зрілі ретикулоцити (LFR)

³ Незрілі ретикулоцити з середньою флуоресценцією (MFR)

⁴ Незрілі ретикулоцити з високою флуоресценцією (HFR)

⁵ Фракція незрілих ретикулоцитів (IRF)

Для отримання достовірних результатів автоматизованого дослідження ретикулоцитів оптимальні терміни зберігання проб крові при кімнатній температурі не повинні перевищувати 6 год. після взяття. При зберіганні проб крові в холодильнику цей термін збільшується до 48 год., оскільки за таких умов всі показники ретикулоцитів практично не змінюються. В умовах зберігання крові при кімнатній температурі протягом 2 діб спостерігається тенденція до зниження відносної і абсолютної кількості ретикулоцитів. Показники об'єму клітин зменшуються з 24-ї до 48-ї години зберігання, а фракція та кількість незрілих ретикулоцитів знижуються в проміжку від 6-ї до 24-ї години зберігання [4].

ВИСНОВКИ

Дослідження параметрів ретикулоцитів в клінічній практиці дуже важливо і необхідно для:

- ❖ оцінки активності еритропоезу при станах, що супроводжуються гемолізом або крововтратою;
- ❖ виявлення порушення регенераторної здатності кісткового мозку при дефіциті заліза, вітамінів B₁₂, B₆, фолатів, міді та моніторингу відповідної терапії;

- ❖ оцінки стану еритропоезу на фоні лікування еритропоетином;
- ❖ оцінки здатності кісткового мозку до регенерації після цитотоксичної терапії та трансплантації кісткового мозку;
- ❖ оцінки відновлення синтезу еритропоетина після трансплантації нирки;
- ❖ допінгового контролю у спортсменів (прийом еритропоетина).

ЛІТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Исследование системы крови в клинической практике / Под ред. Г.И. Козинца и В.А. Макарова. — М.: Триада-Х. — 1997. — 480 с.
 A study of the blood system in clinical practice / Ed. by G.I. Kozinets, V.A. Makarov. Moscow. Triada-X (1997): 480 p.

2. Гусева, С.А., Гончаров, Я.П. Анемии. — К.: Логос. — 2004. — 408 с.
 Guseva, S.A. Goncharov, Y.P. Anemias. Kiev. Logos (2004): 408 p.

3. Герiatricкая гематология. Заболевания системы крови в старших возрастных группах / Сост. и науч. ред. Л.Д. Гриншпун, А.В. Пивник. — Т. 1. — М.: Медиум. — 2011. — 312 с.
 Geriatric Hematology. Diseases of the blood system in older age groups. Vol. 1 / Ed. by L.D. Grinshpun, A.V. Pivnik. Moscow. Medium (2011): 312 p.

4. Луговская, С.А., Морозов, В.Т., Почтарь, М.Е., Долгов, В.В. Лабораторная гематология. — М.: КЛД. — 2006. — 222 с.
 Lugovskaya, S.A., Morozov, V.T., Pochtjar, M.E., Dolgov, V.V. Laboratory Hematology. Moscow. KLD (2006): 222 p.

5. Дементьева, И.И., Чарная, М.А., Морозов, Ю.А. Анемии: руководство. — М.: ГЭОТАР-Медиа. — 2013. — 304 с.
 Dementjeva, I.I., Charnaya, M.A., Morozov, Y.A. Anemias: Guideline. Moscow. GEOTAR-Media (2013): 304 p.

6. Методы клинических лабораторных исследований / под ред. проф. В.С. Камышникова. — 6-е изд., перераб. — М.: МЕДпресс-информ. — 2013. — 736 с.
 Methods of clinical laboratory tests. Ed. by prof. V.S. Kamyshnikov, 6th edition. Moscow. MEDpress-Inform (2013): 736 p.

7. Сисла, Б. Руководство по лабораторной гематологии / Б. Сисла; пер. с англ. под ред. А.И. Воробьева. — М.: Практическая медицина. — 2011. — 352 с.
 Ciesla, B. Hematology in Practice / transl. from Eng., ed. by A.I. Vorobyov. Moscow. Practical medicine (2011): 352 p.

8. Назаренко, Г.И., Кишкун, А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований, 20-е изд., стереотипное. — М.: Медицина. — 2006. — 544 с.
 Nazarenko, G.I., Kishkun, A.A. Clinical evaluation of laboratory results, 20th edition. Moscow. Medicine (2006): 544 p.

9. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С. Камышников. — 3-е изд. — М.: МЕДпресс-информ. — 2009. — 896 с.
 Kamyshnikov, V.S. Handbook of clinical and biochemical studies and laboratory diagnostics, 3rd edition. Moscow. MEDpress-Inform (2009): 896 p.

10. Алексеев, Н.А. Анемии. — СПб.: Гиппократ. — 2004. — 512 с.
 Alekseev, N.A. Anemias. St. Petersburg. Hippocrates (2004): 512 p.

11. Тэмл, Х., Диам, Х., Хаферлах, Т. Атлас по гематологии / пер. с англ.; под общ. ред. проф. В.С. Камышникова. — М.: МЕДпресс-информ. — 2010. — 208 с.
 Theml, H., Diem, H., Haferlach, T. Color atlas of hematology / transl. from Eng., ed. by prof. V.S. Kamyshnikov. Moscow. MEDpress-Inform (2010): 208 p.

12. Блиндарь, В.Н., Зубрихина, Г.Н., Матвеева, И.И., Кушлинский, Н.Е. Гематологические методы исследования. Клиническое значение показателей крови: Руководство для врачей. — М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство». — 2013. — 96 с.
 Blindar, V.N., Zubrikhina, G.N., Matveeva, I.I., Kushlinskiy, N.E. Hematologic methods of investigation. Clinical significance of blood counts: A Guide for Physicians. Moscow. Publishing House "Medical News Agency" Ltd. (2013): 96 p.

13. Стуков, Н.И., Альпидовский, В.К., Огурцов, П.П. Анемии. Клиника, диагностика и лечение. Учебное пособие для врачей. — М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство». — 2013. — 264 с.
 Stuklov, N.I., Alpidovskiy, V.K., Ogurtsov, P.P. Anemias. The clinic, diagnosis and treatment. A manual for physicians. Moscow. Publishing House "Medical News Agency" Ltd. (2013): 264 p.

ЗНАЧЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВИЗНАЧЕННЯ ПАРАМЕТРІВ РЕТИКУЛОЦИТІВ У КЛІНІЧНІЙ ПРАКТИЦІ

Л.І. Сергієнко, к. мед. н., доцент кафедри клінічної лабораторної діагностики НМАПО ім. П.Л. Шупика

У статті представлено дані про морфологію та фізіологію ретикулоцитів. Описано методи визначення кількісних і якісних параметрів ретикулоцитів, зокрема, за допомогою гематологічних аналізаторів, а також їхнє клінічне значення.

Дослідження параметрів ретикулоцитів у клінічній практиці необхідно для оцінки активності еритропоезу при станах, що супроводжуються гемолізом або крововтратою; для виявлення порушення регенераторної здатності кісткового мозку при дефіциті заліза, вітамінів B₁₂, B₆, фолатів, міді та моніторингу відповідної терапії; для оцінки стану еритропоезу на фоні лікування еритропоетином тощо.

Ключові слова: ретикулоцити, ретикулоцитарні параметри, проточна цитометрія.

ЗНАЧЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ РЕТИКУЛОЦИТОВ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Л.И. Сергиенко, к.мед.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики НМАПО им. П.Л. Шупика

В статье представлены данные о морфологии и физиологии ретикулоцитов. Описаны методы определения количественных и качественных параметров ретикулоцитов, в частности, при помощи гематологических анализаторов, а также их клиническое значение.

Исследование параметров ретикулоцитов в клинической практике необходимо для оценки активности эритропоеза при состояниях, сопровождающихся гемолизом или кровопотерей; для выявления нарушения регенераторной способности костного мозга при дефиците железа, витаминов B₁₂, B₆, фолатов, меди и мониторинга соответствующей терапии; для оценки состояния эритропоеза на фоне лечения эритропоэтином и пр.

Ключевые слова: ретикулоциты, ретикулоцитарные параметры, проточная цитометрия.

THE IMPORTANCE OF RESULTS OF DETERMINING THE RETICULOCYTES PARAMETERS IN CLINICAL PRACTICE

L.I. Sergienko, PhD, associate professor, Clinical Laboratory Diagnostics Department, National Medical Academy of Postgraduate Education named after P.L. Shupik

The article presents data on the morphology and physiology of reticulocytes and described methods for determining the parameters of quantity and quality, in particular by means of hematology analyzers. Clinical significance of reticulocytes parameters described.

Study parameters of reticulocytes in clinical practice are necessary to evaluate the activity of erythropoiesis at conditions involving blood loss or hemolysis; to identify disorders of regenerative capacity of the bone marrow in deficiency of iron, vitamin B₁₂, B₆, folate, copper, and monitoring of appropriate therapy; to assess the state of erythropoiesis during treatment with erythropoietin, etc.

Keywords: reticulocytes, the reticulocyte parameters, clinical significance, flow cytometry.