**Курсовая работа по теме «Лабораторные методы исследования ретикулоцитов»**

2016 год

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ…………………………………………………………………………..3

ГЛАВА 1. МОРФОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РЕТИКУЛОЦИТОВ………………………………………………………..………..4

1.1 Характеристика ретикулоцитов……………………………………...…..4

1.2 Уровень ретикулоцитов в периферической крови…………………..….5

ГЛАВА 2. ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ....………………..11

2.1. Разнообразие методов подсчета количества ретикулоцитов………...11

2.2. Унифицированный метод подсчета количества ретикулоцитов после окраски их бриллиантовым крезиловым синим, азуром I или азуром II непосредственно на стекле или в пробирке………………………………..……..14

ЗАКЛЮЧЕНИЕ……………………………………………………………...……...18

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ…………………………………………………...……..19

**ВВЕДЕНИЕ**

Ретикулоциты - молодые эритроциты, образующиеся после потери нормобластами ядер. Характерной особенностью ретикулоцитов является наличие в их цитоплазме зернисто-нитчатой субстанции (ретикулума), представляющей агрегированные рибосомы и митохондрии.

Актуальность темы заключается в том, что ретикулоциты обитают как в периферической крови - так и костном мозге. Их доля повышается при ускорении эритропоэза, а при замедлении - снижается.

У новорожденных ретикулоцитов больше, чем у взрослого человека. Количество их прямо пропорционально скорости производства эритроцитов в костном мозге. Подсчет производится для оценки активности эритропоэза.

Объект исследования *–*методы исследования и подсчета ретикулоцитов.

Предмет исследования – разнообразие лабораторных методов исследования и подсчета ретикулоцитов.

Цель исследования: изучить разнообразные лабораторные методы исследования ретикулоцитов.

Задачи исследования:

1. Обозначить методы исследования и подсчета ретикулоцитов;

2. Изучить особенности окраски и подсчета ретикулоцитов;

3. Приобрести практические навыки проведения общего клинического анализа крови.

В качестве методов исследования в курсовой работе были использованы: обзорный, статистический, аналитический и систематический методы.

**ГЛАВА 1. МОРФОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РЕТИКУЛОЦИТОВ**

**1.1 Характеристика ретикулоцитов**

**Ретикулоциты** - это молодые формы эритроцитов, образовавшиеся из нормобластов после потери ими ядра (безъядерные, незрелые эритроциты), созревание которых происходит в течение 24-48 ч после выхода в периферическую кровь из костного мозга, и отражающие регенеративную способность костного мозга (т.е. эритропоэтическую активность костного мозга).

В нормальных условиях часть полихроматофильных нормоцитов теряют ядро, превращаясь в ретикулоцит. Он является незрелым эритроцитом. В нем определяется сетчатая субстанция, которая является артефактом и состоит из агрегированных митохондрий, комплекса Гольджи, рибосом и других органелл, которая при прижизненной окраске (бриллиантовым крезиловым синим, акридиновым оранжевым) выявляется в виде сетчатой субстанции. В мазках, окрашенных обычным способом, сетчатая субстанция не видна, и эритроциты имеют полихроматофильную окраску.

Образовавшийся в КМ ретикулоцит пребывает в нем 36-44 часа, а затем попадает в кровь, где дозревает в течение 24-30 часов. В период пребывания ретикулоцитов в КМ в них происходит синтез большого количества белковых фракций, входящих в состав мембран, синтез липидов и гема. Костномозговые ретикулоциты, каково бы ни было их абсолютное количество, образуют небольшой резерв красной крови. По ретикулоцитозу судят об эффективности эритропоэза. Содержание ретикулоцитов в норме 0,8-1,3, до 0,2-2 %.

Весь цикл развития от эритробласта до ретикулоцита составляет от 3-4 до 5-7 дне​й.

Ретикулоциты обычно крупнее, чем зрелые эритроциты. Цитоплазма ретикулоцитов содержит базофильную сеточку (ретикулум) в виде мелких зерен, отдельных нитей, клубочков и т.п., которая представляет собой агрегированные рибосомы и митохондрии [2].

**По степени зрелости различают 5 видов ретикулоцитов**:

1) ретикулоциты, имеющие ядро (эритронормобласты), причем зернистость у них располагается в виде плотного венчика вокруг ядра;

2) ретикулоциты, имеющие зернисто-сетчатую субстанцию в виде клубка или глыбки;

3) ретикулоциты, имеющие зернистость в виде густой сети;

4) ретикулоцитов, имеющие зернисто-сетчатую субстанцию в виде отдельных нитей;

5) ретикулоциты, содержащие отдельные зернышки.

**Следует запомнить**: в норме, по Г. А. Алексееву, почти 80% ретикулоцитов относится к IV – V группам.



Рисунок 1. Распределение ретикулоцитов по степени зрелости в соответствии с содержанием ретикулофиламентозной субстанции

В норме в периферической крови содержится 0,2 – 1% ретикулоцитов («%» - содержание ретикулоцитов от общего числа эритроцитов). Данный показатель отражает возможность выхода ретикулоцитов в периферическую кровь и их дальне​йшее превращение в зрелые эритроциты (созревание), как вариант нормы, уже в периферической крови (в течение нескольких часов).

При нормальном эритропоэзе большинство эритроцитов проходит стадию ретикулоцитов в костном мозге [3].

Некоторые авторы отмечают, что у женщин количество ретикулоцитов несколько большее, чем у мужчин. У детей в первые дни жизни количество ретикулоцитов по разным данным может достигать 5 - 10%, а затем уменьшается.

**1.2 ретикулоцитов периферической крови**

Ретикулоциты важным показателем способности костного Увеличение их периферической крови –**ретикулоцитоз,** отмечается при гемолитических когда число их доходить до 60% и  более сильно увеличиваясь при кризах), при острых (на 3 – сутки после кровопотери ретикулоцитарный криз), полицитемии, при лечении железодефицитных анемий, через дне​й (3 - после начала антианемического пернициозной анемии, при недостатке кислорода. Наличие количества ретикулоцитов позволяет заподозрить кровотечение (например, больных брюшным язвенной болезнью) [5].

что увеличение ретикулоцитов в периферической крови выражением хорошей регенерации в том случае, одновременно имеется  ретикулоцитоз  и в костном что называют **истинным  ретикулоцитозом** Отсутствие же повышенного ретикулоцитов в мозге при повышении количества в периферической говорит об усилении ретикулоцитов костного мозга периферическую кровь (**ложный  ретикулоцитоз**).

 Ретикулоцитоз без соответствующей эритронормобластической реакции мозга, наблюдается раздражении отдельных его раковыми или воспалительными очагами.

*ретикулоцитов в периферической (ретикулоцитоз) отмечается:*

• гемолитических анемиях ретикулоцитов может доходить 60% и более сильно увеличиваясь при кризах);

• острых кровопотерях 3 – сутки после возникает ретикулоцитарный криз), в числе, увеличение ретикулоцитов позволяет скрытое кровотечение у больных болезнью желудочно-кишечного брюшным тифом);

• малярии;

при полицитемии;

• при железом железодефицитных анемий несколько дне​й (3 10) после начала лечения пернициозной анемии);

• остром недостатке кислорода;

при метастазах в костный мозг.

**помнить**, что случае усиленного эритроцитов доля ретикулоцитов может 50% вследствие завышения числа ретикулоцитов (как было отмечено ранее, ретикулоцитов рассчитывается в % от эритроцитов). В случаях ля тяжести анемий «ретикулярный индекс», рассчитывают по (% ретикулоцитов х / 45 х где 45 – гематокрит, 1,85- количество необходимых для поступления ретикулоцитов кровь. Если < 2 говорит о гипопролиферативном компоненте анемии, > 2-3, то увеличение образования эритроцитов [1].

приводящим к значения %- содержания ретикулоцитов могут быть следующих препаратов: противомалярийные средства, жаропонижающие фуразолидона маленьких детей), леводопы.

**Запомните**: ретикулоцитоз, без эритронормобластической костного мозга, при раздражении участков его метастазами или очагами.

**Возможной ошибкой подсчете ретикулоцитов может быть ложное завышение наличия:**

• включений эритроцитах (тельца Жолли, малярийные

• лейкоцитоза;

• аномальной гемоглобина;

• гипертромбоцитоза;

гигантских тромбоцитов.

**Ретикулоцитопения** снижение или отсутствие ретикулоцитов (**ретикулоцитопения**)

*Снижение количества отсутствие ретикулоцитов (ретикулоцитопения) наблюдается:*

• арегенераторных апластических и анемиях;

при анемиях, недостаточностью содержания витамина B12, кислоты (микроцитарно-гипохромные мегалобластные анемии);

• талассемии;

при сидеробластной анемии;

при метастазах в кость;

• при болезни и терапии;

• при цитостатиками;

• аутоиммунных заболеваниях системы кроветворения;

• при почек;

при алкоголизме;

• при анемии Аддисона-Бирмера;

при микседеме.

**Анизоцитозом**  процесс, при котором изменение размера клетки **Анизоцитоз** это лабораторный обозначающий значительное умеренное изменение параметров кровяных которое является  отображением развития состояний или как физиологический механизм.

Изменение каких-либо критериев при человека всегда  является  отображением состояния функционирования в целом, наблюдается как заболеваниях, так может  являться  физиологическими компенсаторными При исследовании крови в оценки состава клеток следует внимание не на изменение численности, сколько патологические нарушения размеров и цвета [4].

В когда у определяется  анизоцитоз  в анализе есть необходимость применении дополнительных лабораторной диагностики, как обнаружение изменений  является  отображением наличия заболевания.

Средние показатели кровяных клеток в пределах – 7,5 в связи с чем отклонение в параметрах  является патологическим анизоцитозом (микроцитоз, макроцитоз и мегалоцитоз).

форменные элементы обладают различным что и в их названиях:

* Нормоцитами называются клетки, которых не 7,1 — мкм.
* Микроциты величиной 6,9 мкм.
* Макроциты 8 мкм.
* Мегалоциты от мкм.

*Важно! В здорового человека нормоцитов должно более 70% всего объема. касается микроцитов и макроцитов,*

*на их приходится до 15%.*

образом, если анализе крови что уровень и малых превышает максимально показатели, это о повышении RDW. Проще в мазках будут эритроциты размера.

*Факторы, результат лабораторного исследования %-ого содержания ретикулоцитов:*

неправильный выбор антикоагулянта недостаточное перемешивание крови антикоагулянтом;

• длительное руки жгутом;

• сульфаниламидов (возможны заниженные, так завышенные результаты);

• переливание незадолго до исследования;

гемолиз пробы

**Показания назначению анализа ретикулоциты**

• активности эритропоэза при состояниях, гемолизом или кровопотерей;

оценка способности мозга к после цитотоксической и трансплантации мозга;

• о восстановления синтеза эритропоэтина после почки;

• контроль у спортсменов эритропоэтина);

• неэффективного гемопоэза или снижения эритроцитов;

• дифференциальная анемий;

• детекция нарушения регенераторной костного мозга дефиците железа, B12, B6, фолатов, меди мониторинга соответствующей терапии;

• оценка реакции терапию эритропоэтином эритросупрессорами.

**2. ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**1. Разнообразие методов количества ретикулоцитов**

***Подсчет ретикулоцитов в мазке окраски их специальными красителями.***

метод является на наиболее используемым методом связи с тем, он простой, достаточно и не требует дорогостоящего оборудования, соответственно применяться в любой лаборатории.

Принцип основан на зернисто-сетчатой субстанции ретикулоцитов при суправитальной окраске красками (насыщенный бриллиантового крезилового синего в абсолютном / раствор азура /раствор азура II) дальне​йшим подсчетом их мазке крови. Окраску ретикулоцитов проводят либо стекле, либо пробирке [18]

Подсчет с помощью приготовленные одним указанных выше мазки микроскопируют с иммерсионным в мазке ретикулоциты и окрашены в цвет, зернисто-нитчатая в ретикулоцитах – в (при окраске II и крезиловым или синевато-фиолетовый (при окраске I).

***2. Подсчет ретикулоцитов помощи люминесцентной микроскопии.***

метод отличается и требует времени, более по сравнению обычным методом, как при микроскопии обнаруживаются зерна сетчато-нитчатого однако он только при люминесцентного микроскопа специальных красителей, связи с чем доступен немногим лабораториям.

Принцип количества ретикулоцитов при помощи микроскопии основан использовании способности ретикулоцитов флюоресцировать после крови акридиновым оранжевым. Кровь с акридиновым оранжевым пробирке или смесителе соотношении 1 часть и 10 частей (смесь можно хранить более 5 часов). перемешивают в течение минут, каплю смеси на предметное стекло накрывают покровным стеклом. этом жидкость не выходить за пределы стекла [19].

Микроскопируют с помощью ЖС-17. В эритроциты имеют очертания и флюоресцируют, а ретикулоцитах зернисто-сетчатая светится ярко-красным цветом, чему ретикулоциты подсчитать. В стабилизированной гепарином цитратом натрия, ретикулоцитов наблюдается.

***3. Автоматический количества ретикулоцитов с гематологического анализатора.***

В гематологических анализаторах подсчета форменных крови основана кондуктометрическом методе, H. Wallace и Joseph R. Culter в 1947 Принцип метода в подсчете и определении импульсов, возникающих прохождении клетки отверстие малого (апертуру), по стороны которого два изолированных от друга Каждое прохождение через апертуру появлением электрического который регистрируется датчиком. Разделение по категориям лейкоциты, тромбоциты, осуществляется прибором основании анализа полученных импульсов. Чтобы определить клеток, достаточно определенный объем через канал подсчитать количество которые при генерируются [20] .

Следует обратить на то, помимо классического ретикулоцитов относительное (%) ретикулоцитов (RET%, percent of reticulocytes определяемого с помощью и 2 методов диагностики, в с появлением гематологических анализаторов метод) стало получать (например, помощью запатентованного флюоресцентного красителя анализатора Sysmex -XT- 2000i) информативные ретикулоцитарные параметры:

• ретикулоциты с низким РНК, наиболее зрелые (LFR%, low fluorescence reticulocyte fractions, фракция ретикулоцитов с флуоресценцией);

• ретикулоциты со средним РНК (MFR%, medium fluorescence reticulocyte fractions) - ретикулоцитов средне​й флуоресценцией);

• ретикулоциты с содержанием РНК high fluorescence reticulocyte fractions) - фракция ретикулоцитов с высокой флуоресценцией); незрелая фракция ретикулоцитов (IRF%, Immature Reticulocyte Fraction) [7,8].

ретикулоцитов, на степени и, соответственно, нуклеиновых кислот, отражением гемопоэтической костного мозга.

Методика Sysmex 2000i). В кювете клетки луч полупроводникового при этом рассеивание луча большим и углами и флюоресцентного Это позволяет различные стадии ретикулоцитов по содержанию в клетках и их свечения. Автоматизированный ретикулоцитов отличается высокой (подсчитывается более 000 эритроцитов) воспроизводимостью вариации составляет 6%). Данная обеспечивает точный ретикулоцитов при их низких концентрациях [6].

количества ретикулоцитов производится при специально окрашенных

**2. 2 Унифицированный подсчета количества ретикулоцитов окраски их бриллиантовым крезиловым синим, I или II непосредственно стекле или пробирке (1972).**

**Принцип**

Суправитальная окраска выявляющими зернисто-нитчатую ретикулоцитов

**Реактивы**

Можно один из красителей.

Насыщенный раствор крезилового в абсолютном (для приготовления спирта надо этанол 96 в нескольких прокаленного порошка купороса). На мл абсолютного берут 1,2 краски.

Раствор азура предложенный П. Кориковым:

азур — 1 аммония оксалат 0,4 г, хлорид — г, этиловый 96 % 10 мл, вода — мл. Раствор в закрытом помещают на дня в при 37 °С и периодически взбалтывают. Затем до комнатной и фильтруют бумажный фильтр.

Раствор сохраняют посуде из стекла. При осадка краску снова профильтровать.

 3. азура II следующего

азур — 1 натрия цитрат 5 г, хлорид — г, дистиллированная — 45

Раствор в термостате 37 °С 2 сут периодически помешивая. ускорения растворения можно прогреть слабом огне течение 15—20 не доводя кипения. Охлаждают комнатной температуры фильтруют.

в посуде из стекла.

**Специальное оборудование**

Микроскоп.

**Ход определения**

**Окраска стекле**

Хорошо вымытое и предметное стекло подогревают пламенем горелки. Стеклянной наносят на стекло одного из красителей готовят мазок из шлифованным стеклом. Маркируют стекла, на которую мазок краски, стеклографом. таком виде стекла заготовить впрок и в сухом темном Наносят каплю крови мазок краски, готовят нее тонкий мазок тотчас помещают во камеру на 3—4 (можно пользоваться чашкой с уложенными по валиками смоченной ваты фильтровальной бумаги). Затем мазки на воздухе.

В таким образом эритроциты окрашены желтовато-зеленоватый цвет, субстанция — синий цвет.

**Окраска в пробирке**

**Метод 1:**  употреблением готовят в рабочий раствор бриллиантового крезилового синего расчета на 1 % оксалата калия капли раствора 1. В добавляют 0,04 крови (две до метки Смесь тщательно, осторожно перемешивают оставляют на мин. Перемешивают готовят тонкие

**Метод 2:** в помещают 0,05 раствора краски и 0,2 крови. Смесь перемешивают и на 20—30 Перемешивают и тонкие мазки.

**Метод 3:** в пробирку 0,3—0,5 мл краски 2 5—6 капель пипеткой от Панченкова. закрывают резиновой смесь тщательно, осторожно перемешивают оставляют на ч (лучше ретикулоциты при 11/2—3 ч). Перемешивают готовят тонкие мазки.

**Подсчет ретикулоцитов**

мазках эритроциты в желтовато-зеленоватый зернисто-нитчатая субстанция в синий синевато-фиолетовый цвет.

Приготовленные одним указанных выше мазки микроскопируют с иммерсионным Необходимо подсчитать менее 1000 и отметить них количество содержащих зернисто-нитчатую Практически для точности пользуются окуляром, в можно уменьшить зрения до размеров. При тонких мазках, которых эритроциты в один подбирают такое зрения, в имеется, например, эритроцитов, и просчитывают 20 полей зрения [9,10].

отсутствии готового его можно приготовить, для отвинчивают окуляр вкладывают в кусок бумаги вырезанным небольшим и завинчивают. подсчитанных ретикулоцитов выражают на или на эритроцитов.

**Подсчет количества ретикулоцитов при помощи микроскопии.**

**Принцип**

Использование способности ретикулоцитов после обработки акридиновым

**Реактивы**

1. Раствор оранжевого на растворе хлорида и концентрации 1 : 5000. приготовления изотонического рекомендуют использовать воду рН Раствор акридинового должен быть хранят его более 3—5 в темном с притертой
2. Нефлюоресцирующее масло. Можно афлуоль обычное иммерсионное с флюоресценцией, нитробензолом (0,3 нитробензола на мл масла). Н. Зубжицкий в нефлюоресцирующего предлагает использовать анизол.

**оборудование**

Микроскоп ультрафиолетовый или люминесцентный.

**Ход определения**

смешивают с акридиновым оранжевым пробирке или в соотношении часть крови 10 частей (смесь можно не более ч). Смесь в течение мин, каплю наносят на стекло и покровным стеклом. Микроскопируют с помощью светофильтра В препарате эритроциты флюоресцируют, а в ретикулоцитах субстанция светится цветом. Замечено, в крови, гепарином или натрия, флюоресценции ретикулоцитов не Метод отличается и требует времени; благодаря свечению ретикулоциты легко подсчитать [12].

**величины**

У здоровых число ретикулоцитов составляет 2—1,2 о/оо, или %.

**Клиническое значение**

Число ретикулоцитов в крови регенеративные свойства мозга, и его широко при различных анемиях. Повышение количества ретикулоцитов наблюдается кровопотери, при анемиях, особенно период криза ретикулоцитов быть 20— %), а на фоне анемии Аддисона—Бирмера витамином B12 (ретикулоцитарный криз — числа ретикулоцитов на день лечения). Снижение ретикулоцитов для гипопластической редицива анемии Аддисона— Бирмера [13,14]

Определение ретикулоцитов быть использовано определения продукции эритропоэза и срока жизни

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Ретикулоциты молодые эритроциты, после потери ядер. Характерной ретикулоцитов наличие в зернисто-нитчатой субстанции, агрегированные рибосомы митохондрии. Эта выявляется при методе окраски суправитальном, е. без фиксации клеток. Зернисто-нитчатая субстанция различных ретикулоцитах отличается полиморфизмом; клетка моложе, тем более обильная. У самых ретикулоцитов имеет форму клубка, у зрелых клеток в виде отдельных нитей затем отдельных В окрашенных обычными методами, ретикулоциты серовато-розового цвета полихроматофильны, е. окрашены красителями.

количества ретикулоцитов производится при специально окрашенных

Основным исследования ретикулоцитов являются:

1. количества ретикулоцитов в мазке окраски их красителями;

2. Подсчет количества ретикулоцитов при помощи микроскопии;

3. подсчет количества ретикулоцитов с гематологического анализатора.

Задачи курсовой выполнены в полном объеме.

Цель работы достигнута.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. по гематологии / Под ред. Воробьева. М.: Ньюдиамед, 2003.
2. Энциклопедия лабораторных тестов / П ред. Н. Тица М.: Лабинформ, 1997.
3. Балуда В.П. Физиология гемостаза / Балуда др.]. - 1995.
4. Владимирская Е.Б. кроветворения и лейкемогенеза. М.: 2007.
5. Васина, Н.И. ресурсы Internet Н.И. Васина; М., 1999.
6. Гематология: справочник / ред. К.М. Абдулкодырова. - 2004. - 250-337.
7. Гомзякова Н. В. Лаб. дело, № 5, 38—39;
8. Зубжицкий Ю. Н. дело, 1967, 2, с. Кориков Н. Лаб. 1961. № с. 10.
9. Луговская С. Ретикулоциты С. А. Луговская, М. Почтарь. М., 2006.
10. NCCLS. for Reticulocyte Counting Blood Cell Counters, Cytometry, and Supravital Dyes); Guideline. - е NCCLS document H44-A2. Wayne, Pennsylvania, 2004.
11. Methods Reticulocyte Counting (Automated Cell Counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes); Guideline. - еd. Vol. 24, 8. Алексеев Н. Анемии / А. Алексеев. СПб. : Гиппократ, 2004. 512 с.
12. Камышников С. Карманный врача по диагностике - «МЕДпресс-информ», 2007 год.
13. Козинец Г. И. и инфекция Г. И. Козинец, В. Высоцкий, В. Погорелов [и - М. : Триада-Фарм, 2001. С. 98-101. Приказ МЗ СССР № от 21.11.7.
14. Любина Я., Ильичева П. и - "Клинические исследования" - "Медицина", 1984 г.
15. по гематологии Под ред. Воробьева. М.: Ньюдиамед, 2003.
16. Справочник клиническим лабораторным исследования. Под Е. А. Кост. Москва 1975 г.
17. Справочник методы исследования клинике" под Меньшикова В. - Москва, 1987 г
18. Тареев М. Анемия брайтиков / М. Тареев - М., 1929.
19. Шиффман Ф. Дж. Патофизиология крови. Бином, 2001.
20. Энциклопедия лабораторных тестов ред. Н. Тиц: пер. англ. - Лабинформ, - 960 с.