

SEED Hematologia



Hemoliza

Czym jest hemoliza?

Hemoliza jest przedwczesnym rozpadem krwinek czerwonych (RBC), który może nastąpić albo z udziałem makrofagów w układzie siateczkowo-śródbłonkowym (układ fagocytarny, RES) albo w obrębie naczyń krwionośnych.

Czym jest normalny proces starzenia się krwinek czerwonych?

Średnia długość życia erytrocytów wynosi 120 dni. Ponieważ nie posiadają jądra, nie mogą syntetyzować nowych komponentów komórkowych, aby nadążyć za ogólnym zapotrzebowaniem codziennego metabolizmu. W związku z tym zaczynają degenerację i stają się niezdolne do życia. Stare i uszkodzone erytrocyty (zwane także „starzejącymi się”) są usuwane głównie w śledzionie przez makrofagi układu siateczkowo-śródbłonkowego. Niewielki odsetek komórek ulega rozpadowi w krążeniu, a fragmenty komórek są pochłaniane przez makrofagi.

Rycina 1 przedstawia proces fizjologicznego rozkładu RBC. Krwinki czerwone są lizowane wewnątrz makrofagów, a hemoglobina rozkłada się na podstawowe elementy, czyli hem i globinę. Rozpad hemu uwalnia żelazo, które jest przechowywane w makrofagach

albo uwalniane do krwi, gdzie wiąże się z białkiem-transferyną i dociera do szpiku kostnego. Tam włączane jest do erytroblastów i wykorzystane ponownie do syntezy hemoglobiny.

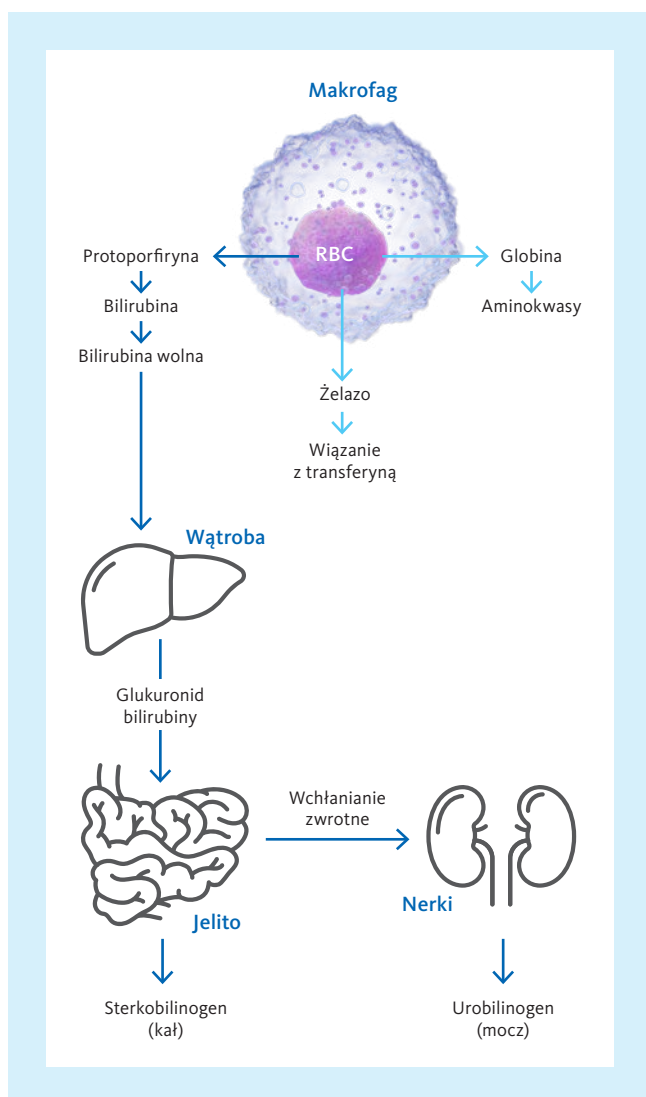
Białko hemu, znane jako protoporfiryna, jest degradowane do bilirubiny. Bilirubina wraz z krążeniem trafia do wątroby, gdzie jest sprzęgana, po czym wydzielana do jelit wraz z żółcią. W jelitach następuje konwersja do sterkobilinogenu i sterkobiliny, które są częściowo wchłaniane i wydalane z moczem jako urobilinogen i urobilina, a reszta jest wydalana z kałem.

Łańcuchy globinowe są degradowane do aminokwasów, a następnie wykorzystywane do ogólnej syntezy białka w organizmie.

Co powoduje hemolizę?

Niektóre choroby i procesy chorobowe mogą powodować przedwczesny rozpad krwinek czerwonych. Naturalną odpowiedzią szpiku kostnego jest zwiększenie produkcji krwinek. Prawidłowo funkcjonujący szpik kostny jest w stanie zwiększyć produkcję krwinek czerwonych nawet ośmiokrotnie.

Przyczyny hemolizy mogą być klasyfikowane na wewnątrzpochodne lub zewnątrzpochodne.



Ryc. 1 Prawidłowy rozpad krwinek czerwonych, zachodzący z udziałem makrofagów w układzie siateczkowo-śródbłonkowym

a) Wewnątrzpochodne przyczyny hemolizy

Hemoliza wewnątrzpochodna występuje na skutek defektów RBC. Większość z nich jest dziedziczna (tab. 1). Wyjątkiem jest nocna napadowa hemoglobinuria (PNH), która jest chorobą nabytą, mimo że krwinki czerwone posiadają wadę błony komórkowej. PNH może występować jako choroba pierwotna lub wtórna, w kontekście innych chorób szpiku kostnego takich jak anemia aplastyczna.

b) Zewnątrzpochodne przyczyny hemolizy

Hemoliza występuje z przyczyn „zewnątrzkomórkowych” lub pod wpływem czynników „środowiskowych”. W konsekwencji zarówno RBC pacjenta, jak również wszelkie krwinki czerwone pochodzące z transfuzji ulegają hemolizie, jeśli czynnik sprawczy nie zostanie wyeliminowany. Z rzadkimi wyjątkami, przyczyny hemolizy zewnątrzpochodnej są zazwyczaj nabyte i można je podzielić na immunologiczne i nieimmunologiczne (tab. 2).

Tab. 1 Przykłady wewnątrzpochodnych przyczyn hemolizy

Defekty RBC	Choroby dziedziczne
a) Defekt błony RBC	1. Dziedziczna sferocytoza (HS) 2. Dziedziczna eliptycytoza 3. Dziedziczna stomatocytoza
b) Defekty enzymatyczne	1. Dziedziczna sferocytoza (HS) 2. Dziedziczna eliptycytoza 3. Dziedziczna stomatocytoza
c) Defekty hemoglobiny	1. Anemia sierpowatokrwinkowa 2. Hemoglobina C 3. Talasemia

Tab. 2 Przykłady zewnątrzpochodnych przyczyn hemolizy

Immunologiczne	Nieimmunologiczne
Autoimmunologiczne <ul style="list-style-type: none"> ■ Idiopatyczne ■ Wtórne <ul style="list-style-type: none"> ■ Choroby autoimmunologiczne ■ Białaczka ■ Chłoniak ■ Leki ■ Zakażenia 	Zespoły fragmentacji RBC <ul style="list-style-type: none"> ■ Makroangiopatie <ul style="list-style-type: none"> ■ Sztuczne zastawki serca ■ Mikroangiopatie <ul style="list-style-type: none"> ■ Zakrzepowa plamica małopłytkowa (TTP) ■ Zespół hemolityczno-mocznicy (HUS) ■ Zespół rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC) ■ Stan przedrzucawkowy / zespół HELLP
Alloimmunologiczne <ul style="list-style-type: none"> ■ Reakcja po transfuzji ■ Choroba hemolityczna noworodków 	Infekcje <ul style="list-style-type: none"> ■ Malaria ■ Clostridia
	Czynniki chemiczne i fizyczne <ul style="list-style-type: none"> ■ Niektóre leki, środki domowe/przemysłowe ■ Oparzenia
	Wtórnie do innych chorób układowych <ul style="list-style-type: none"> ■ Choroby nerek i wątroby
	Uraz mechaniczny <ul style="list-style-type: none"> ■ Hemoliza marszowa

Gdzie zachodzi hemoliza?

Istnieją dwa główne mechanizmy, w których krwinki czerwone są niszczone w procesach hemolitycznych. Może to być nadmierne usuwanie RBC przez komórki RES, dalej zwane „hemolizą pozanaczyniową” (ryc. 1) lub może to być bezpośrednie niszczenie w krwioobiegu, określane jako „hemoliza wewnątrznaczyniowa”. O tym czy dominuje hemoliza poza- czy wewnątrznaczyniowa decyduje podłoże patologii. Poważniejszy przebieg cechuje hemolizę wewnątrznaczyniową, jest zatem bardziej dotkliwy dla pacjenta.

a) Hemoliza wewnątrznaczyniowa

W hemolizie wewnątrznaczyniowej, wolna hemoglobina i enzymy erytrocytów (zwłaszcza LDH) są uwalniane do krwioobiegu. Hemoglobina, występująca jako tetramer, gwałtownie dysocjuje na dimery hemoglobiny, które są bezpośrednio wiązane przez osoczną haptoglobinę. Wysyciona haptoglobina zostaje wyłapana przez wątrobę prawie natychmiast. Tempo usuwania

kompleksu HGB-haptoglobina zawsze przekracza tempo syntezy haptoglobiny, wskutek czego zmniejsza się poziom haptoglobiny. Niski poziom haptoglobiny jest cechą hemolizy. Po wysyceniu haptoglobiny we krwi występuje nadmiar wolnej hemoglobiny, która jest filtrowana w nerkach i wchłaniana w kanalikach proksymalnych. Żelazo jest odzyskiwane i przekształcane do ferrytyny lub hemosyderyny. Jednakże jeśli szybkość hemolizy jest większa niż pojemność resorpcyjna kanalików nerkowych, wolna hemoglobina jest wydalana z moczem. Określane jest to jako „hemoglobinuria” i może być wykryte za pomocą testów paskowych do analizy moczu.

Żelazo z resorbowanej hemoglobiny jest usuwane i przechowywane jako ferrytyna lub hemosyderyna w komórkach kanalików nerkowych. W ramach normalnego obiegu komórek, złuszczone komórki kanalików nerkowych są usuwane do moczu uwalniając hemosyderynę.

Hemoglobinuria jest wskaźnikiem ciężkiego przebiegu wewnątrznaczyniowej hemolizy, jednak ma krótki okres półtrwania, podczas gdy hemosyderyna może zostać wykryta w moczu nawet kilka tygodni po epizodzie hemolitycznym.

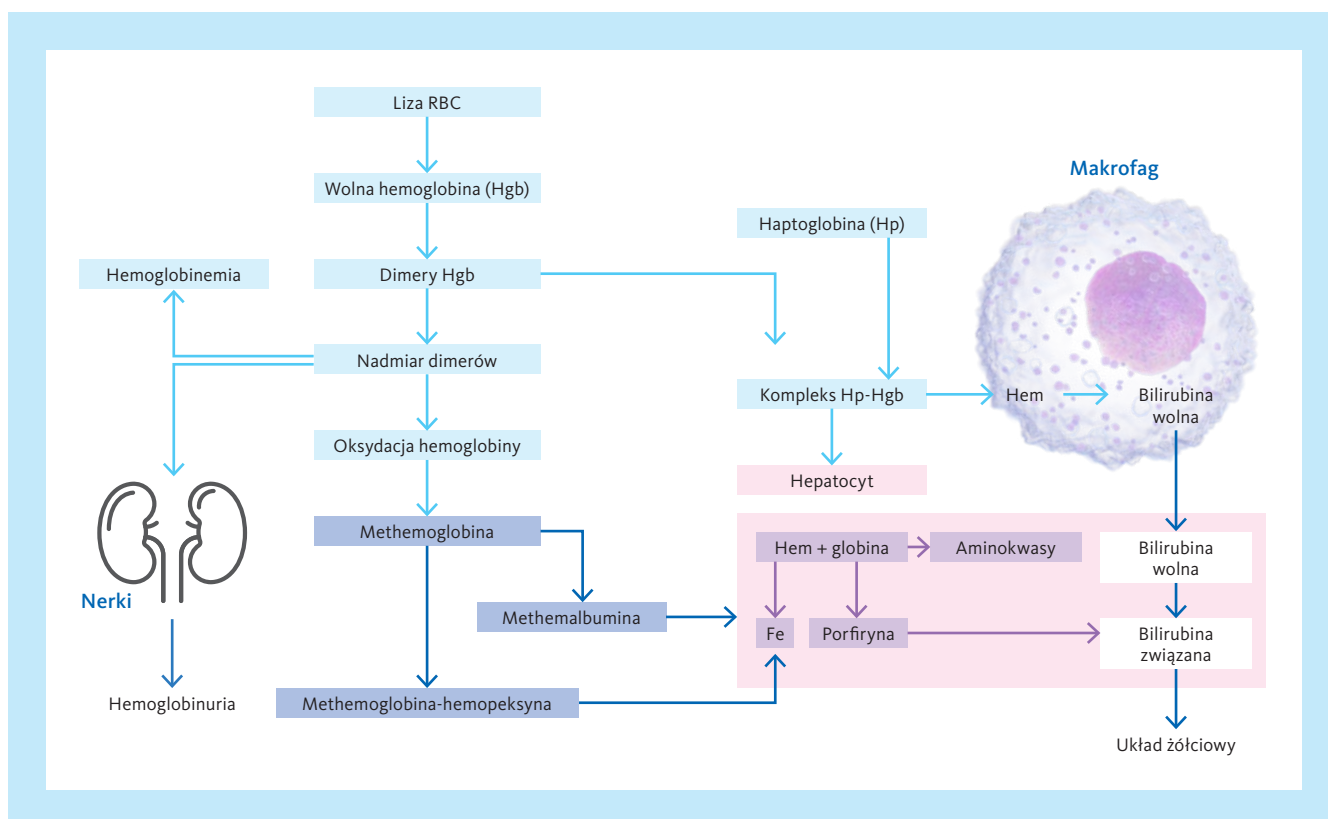
Dimery hemoglobiny, które pozostały w krwioobiegu, są utleniane do methemoglobiny. Następnie dysocjują na wolną cząsteczkę hemu i łańcuchy globiny. Wolna utleniona hemoglo-

bina łączy się z hemopeksyną i albuminą tworząc kompleksy methemoglobina-hemopeksyna i methemoglobina-albumina. Kompleksy te są następnie wyłapywane przez receptory wątrobowe i makrofagi wewnątrz śledziony, wątroby i w szpiku kostnym. Podobnie kompleksy hemoglobina-haptoglobina są wychwytywane przez hepatocyty i makrofagi. Dalsze procesy związane z hemoglobiną wewnątrz makrofagów zostały przedstawione na ryc. 1 jako prawidłowy rozpad krwinek czerwonych. Proces wewnątrznaczyniowej hemolizy, wraz z wynikającym wzrostem poziomu LDH, hemoglobinemią, hemoglobinurią i bilirubinemią został przedstawiony na ryc. 2.

b) Hemoliza pozanaczyniowa

Pozanaczyniowa hemoliza występuje, gdy erythrocyty są fagocytowane przez makrofagi w śledzionie, wątrobie i szpiku kostnym. Gdy krwinki czerwone ulegają degradacji w makrofagach, hemoglobina nie jest uwalniana do krwioobiegu. W rezultacie nie ma hemoglobinemii lub hemoglobinurii, jeżeli pozanaczyniowej hemolizie nie towarzyszy hemoliza wewnątrznaczyniowa.

Rozpad hemoglobiny wewnątrz makrofagów na jej elementy składowe, hem i globinę, a także kolejne etapy degradacji opisane są w akapicie „Czym jest normalny proces starzenia się RBC?” (ryc. 1).



Ryc. 2 Diagram przedstawiający proces hemolizy wewnątrznaczyniowej

W jaki sposób organizm reaguje na hemolizę?

Erytropoetyna to hormon, który reguluje erytropoezę i w znacznej mierze jest produkowany przez nerki. W nerkach obecny jest niezidentyfikowany sensor wrażliwy na zmiany w utlenowaniu hemoglobiny. Każde zmniejszenie masy erytrocytów (np. w przypadku hemolizy lub utraty krwi) lub choroba płuc powoduje zwiększenie wydzielania erytropoetyny i przyspieszenie procesu erytropoezy. Transport erytropoetyny do szpiku kostnego odbywa się drogą krwionośną. W szpiku kostnym erytropoetyna reguluje erytropoezę, a jej działanie przypomina termostat, odpowiednio przyspieszając lub spowalniając proces według potrzeb organizmu.

W przypadku obecności hemolizy, w szpiku kostnym nastąpi zwiększenie wytwarzania krwinek czerwonych, proporcjonalnie do ilości produkowanej erytropoetyny. Z tego powodu w niektórych przypadkach szpik kostny jest w stanie w pełni zrekompensować wzmożone niszczenie krwinek czerwonych. Jednakże gdy szybkość niszczenia RBC przekracza tempo, w którym szpik kostny może zrekompensować stratę, pacjent będzie wykazywał znamiona anemii hemolitycznej.

Jak można wykryć hemolizę?

Diagnostyka stanu hemolitycznego polega na stwierdzeniu, że niszczenie krwinek czerwonych jest przyspieszone, a erytropoeza jest nasiloną oraz określeniu przyczyny hemolizy. Jeśli istnieje podejrzenie niedokrwistości hemolitycznej, zawsze powinna być wykonana kompletna morfologia krwi, badanie liczby retikulocytów oraz ocena rozmazu mikroskopowego.

a) Badania wykazujące zwiększoną produkcję krwinek czerwonych

Liczba retikulocytów

Retikulocyty są beźródzastymi krwinkami czerwonymi, które zawierają RNA. Termin "retikulocyt" pochodzi od ciemnoniebieskich precypitatów widocznych w barwieniu przyżyciowym, kiedy barwnik wiąże RNA i agregaty innych organelli. Retikulocyty mogą być różnicowane z dojrzałymi RBC dzięki wysokiej zawartości RNA, którego ilość w procesie dojrzewania stopniowo się zmniejsza.

Retikulocyty pozostają w szpiku kostnym około dwóch dni, zanim zostaną uwolnione do krwi obwodowej, gdzie ostatecznie dojrzeją i staną się dojrzałymi RBC.

Retikulocyty są charakterystycznymi komórkami, które niedawno pojawiły się we krwi obwodowej. Liczba retikulocytów we krwi obwodowej dostarcza informacji o aktywności szpiku kostnego i skuteczności erytropoezy. W przypadku hemolizy, niezależnie czy jest to proces wewnątrznaczyniowy czy pozanaczyniowy, szpik kostny próbuje kompensować niszczenie krwinek czerwonych przez zwiększenie aktywności erytropoezy, którą potwierdza podwyższona liczba retikulocytów. Zliczanie retikulocytów

może być wykonane metodą manualną, za pomocą barwienia przyżyciowego lub w sposób zautomatyzowany na analizatorze hematologicznym. Produkcja retikulocytów powinna być wyrażona jako wskaźnik produkcji retikulocytów (RPI).

RPI, jest wartością obliczaną, która uwzględnia wartość hematokrytu pacjenta, a także to, że retikulocyty przedwcześnie uwalniane do krwioobiegu w odpowiedzi na utratę RBC mają dłuższą żywotność. Bez wykonywania korekty do tak zwanego „przesunięcia” retikulocytów, liczba retikulocytów może wydawać się podwyższona, dając fałszywe wrażenie dobrej odpowiedzi szpiku kostnego. Podwyższony RPI oznacza realny wzrost produkcji krwinek czerwonych, podczas gdy sam wzrost liczby retikulocytów już nie.

Zalety automatycznego zliczania retikulocytów

Barwienie przyżyciowe i zliczanie manualne retikulocytów opracowano w 1940 r. i do chwili obecnej pozostało metodą standardową. Jednakże metoda ta ma ograniczenie kliniczne z powodu niskiej precyzji i dokładności. Przyczyną tego są subiektywność oceny, względnie niewielka liczba komórek ocenianych, jakość rozmazu i barwienia oraz niespójne stosowanie odpowiednich okularów mikroskopowych, standaryzujących obszar liczenia. Dla porównania analiza automatyczna jest obiektywna, zliczana jest duża liczba komórek i zmniejszony jest błąd związany z dozowaniem próbki, ponieważ komórki są jednorodnie zawieszane w cieczy. Dodatkowo dla tej metody dostępny jest materiał kontrolny. Z powodu tych czynników zliczanie automatyczne posiada wyższą dokładność i precyzję niż zliczanie manualne.

b) Badanie wykazujące zwiększone niszczenie krwinek czerwonych

Badania laboratoryjne, pomocne w potwierdzeniu hemolizy są przedstawione w tab. 3.

Tab. 3 Badania odzwierciedlające zwiększone niszczenie RBC

Badanie	Hemoliza wewnątrznaczyniowa	Hemoliza zewnątrznaczyniowa
1. Haptoglobina	Obniżona	W normie
2. Bilirubina w surowicy	Zwiększona bilirubina niezwiązana	Zwiększona bilirubina niezwiązana
3. Test paskowy HGB w moczu	Dodatni	Ujemny
4. Hemosyderyna w moczu	Dodatni	Ujemny
5. LDH	Podwyższone	W normie
6. Hemopeksyna	Obniżona	W normie
7. Test paskowy urobilinogenu w moczu	Dodatni	Dodatni
8. Test Schumma na methemoglobinę	Dodatni	Ujemny

c) Ustalenie przyczyny hemolizy

Pełny opis postępowania laboratoryjnego przeprowadzanego w celu ustalenia przyczyny hemolizy jest dużo szerszy niż zakres tego artykułu. Opisane jest natomiast znaczenie jakie odgrywa ocena rozmazu krwi obwodowej w tym procesie.

Morfologia krwinek czerwonych daje istotne wskazówki (tab. 4), jednak zanim zostaną wyciągnięte jakiegokolwiek wnioski należy upewnić się, że jakość rozmazu jest dobra. Jeżeli personel laboratoryjny nie przestrzega wytycznych odnośnie wykonywania rozmazu manualnego i procesu barwienia istnieje prawdopodobieństwo, że rozmaz będzie złej jakości. To może się przełożyć na błędną ocenę mikroskopową i potencjalnie poważne skutki w opiece nad pacjentem.

Zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej, wystandaryzowany proces wykonywania i barwienia rozmazów zagwarantuje wykonanie dobrej jakości preparatów krwi obwodowej. Najlepszym sposobem standaryzacji jest automatyzacja, możliwa przy wykorzystaniu RAL Stainer i gotowych do użycia odczynników niezawierających metanolu (RAL Kit MCDh), przedstawione na ryc. 3.



Ryc. 3 RAL Stainer, RAL Kit MCDh*

Tab. 4 Morfologia RBC związana ze stanami hemolitycznymi

Cecha RBC	Opis	Mechanizm powstawania	Stan chorobowy
Nakrapianie zasadochłonne	Punktowe wtręty zasadochłonne	Precypitaty rybosomów	Talasemia i inne anemie
Dangocyty (ang. bite cells)	Gładki półokrąg usunięty z brzegu komórki	Ciałka Heinz	G6PD i wywołana lekami hemoliza oksydacyjna
Ciałka Howella-Jollego	Niewielkie, gęste wtręty zasadochłonne, zazwyczaj pojedyncze	Pozostałość jądra	Anemie hemolityczne
Mikrocyty	Komórki mniejsze niż prawidłowe (< 7 µm)	Nieprawidłowa produkcja hemoglobiny	Talasemia
Polichromatofilia	Szare lub niebieskie odcienie często widoczne w retikulocytach	Materiał rybosomalny	Retikulocytoza, wypuszczanie niedojrzałych form RBC ze szpiku
Schistocyty	Zniszczone fragmenty komórek z dwoma lub trzema zaostrzonymi końcami	Uszkodzenie mechaniczne: w mikrokrążeniu za pomocą nici fibryny; uszkodzenia mechaniczne przez protezy zastawkowe	Mikroangiopatyczna anemia hemolityczna (DIC, TTP), zastawki serca, ciężkie oparzenia
Stomatocyty	Deformacja przypominająca usta lub kubek	Defekt błony z nieprawidłową przepuszczalnością kationów	Dziedziczna stomatocytoza, anemia immuno-hemolityczna
Krwinki tarczowate	Wygląd przypominający tarczę, hipochromia z centralną hemoglobina	Względne zwiększenie błony, zmniejszenie hemoglobiny wewnątrz komórki	Talasemia, hemoglobina C
Krwinki sierpowate	Komórki o kształcie sierpa, ostre na obu końcach	Cząsteczkowa agregacja hemoglobiny S	Zaburzenia sierpowatokrwinkowe
Sferocyty	Komórki sferyczne z gęstą hemoglobina i brakiem centralnego przejaśnienia, zazwyczaj ze zmniejszoną średnicą	Utrata powierzchni błony	dziedziczna sferocytoza, anemia immuno-hemolityczna, niezgodna transfuzja krwi

*RAL Stainer i RAL Kit MCDh są produktami RAL Diagnostics – www.ral-diagnostics.fr

Jakie znaczenie ma hemoliza wywołana złym pobraniem lub nieprawidłowym obchodzeniem się z próbką?

Nieprawidłowe pobranie, ekspozycja na ciepło lub zimno (zamrażanie) i przedłużony czas przechowywania przed analizą może powodować lizę RBC wewnątrz próbki (hemoliza in vitro). Jest to istotne, ponieważ hemoliza in vitro może być ciężka do odróżnienia od hemolizy wewnątrznaczyniowej. W obydwu przypadkach osocze będzie miało czerwono-brązowe zabarwienie.

Poniższe cechy sugerują hemolizę in vitro:

- Niska wartość RBC i HCT przy prawidłowym poziomie HGB – wskutek czego nieprawidłowo podwyższone jest MCH i MCHC.
- Brak retikulocytozy, nawet w przypadku obecności fragmentów krwinek czerwonych.
- Inne badania dla hemolizy wewnątrznaczyniowej przedstawione w tab. 3 będą negatywne.

Do zapamiętania

- Testy biochemiczne potwierdzają rozpad krwinek czerwonych i są użyteczne w różnicowaniu hemolizy wewnątrz- i zewnątrznaczyniowej.
- Podwyższony poziom retikulocytów jest niezbędny w diagnozie hemolizy, ponieważ jest sygnałem zwiększonej produkcji RBC.
- Morfologia RBC jest pomocna w określeniu przyczyny hemolizy.
- Hemoliza in vitro może być podobna do hemolizy wewnątrznaczyniowej. Laboratorium powinno podjąć wszelkie działania w celu ustalenia jej obecności.

Źródła

- [1] **Bain B J, Bates I, Laffan M A, Lewis S M. (2011):** *Dacie and Lewis, Practical Haematology: Laboratory methods used in the investigation of the haemolytic anaemias. 11th edition. Chapter 11.*
- [2] **Hoffbrand A V, Moss D A H and Petit J E. (2005):** *Essential Haematology. 5th edition. Haemolytic anaemias. Chapter 5.*

Opracowane przez Lebogang Bodibe