

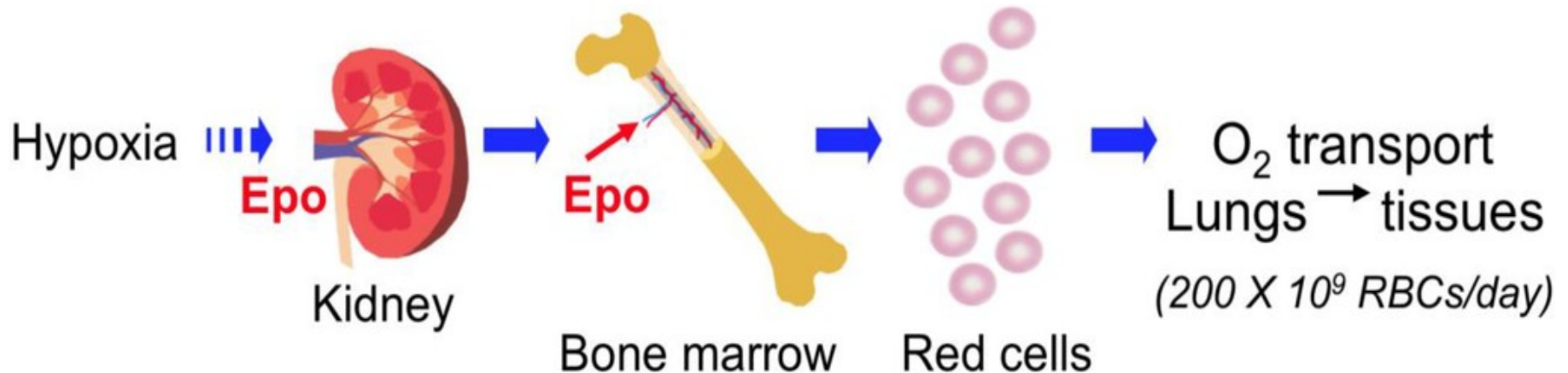
Speciální hematologická vyšetření

Bourková L., OKH FN Brno

Vyšetřování anémií

Vznik anemie

- **Anemie** je soubor příznaků, při kterém je v krvi:
 - snížený počet erytrocytů (*ERY*) a množství hemoglobinu (*HGB*),
 - je spojená s poruchou tvorby erytrocytů nebo zánikem či ztrátou erytrocytů
- Normálně na pokles hladiny kyslíku v organismu reagují ledviny zvýšenou produkcí hormonu erytropoetinu (*EPO*).
- EPO se přenáší krví do kostní dřeně, kde je vydán signál ke zvýšené produkci ERY a stav se kompenzuje.
- V určitých případech, zejména u nádorových onemocnění nebo u chronických zánětlivých procesů je ale tento proces nedostačující a vzniká *anemie*.



Sledování vyšetření

Hodnotit:

- hloubku anémie v KO
 - ✓ početní změny WBC i PLT
- morfologické změny erytrocytů v periferní krvi (barevné, tvarové, inkluze)
 - ✓ morfologické změny WBC i PLT v celém nátěru
- morfologické a množstevní změny erytrocytární populace v KD
 - ✓ morfologické změny i leukocytární populace a MGK
- komplexně výsledek celého KO a nález v KD: může se jednat o první příznaky nádorového onemocnění
- souvislost se speciálními vyšetřeními

Vyšetření retikulocytů

➤ retikulocyty

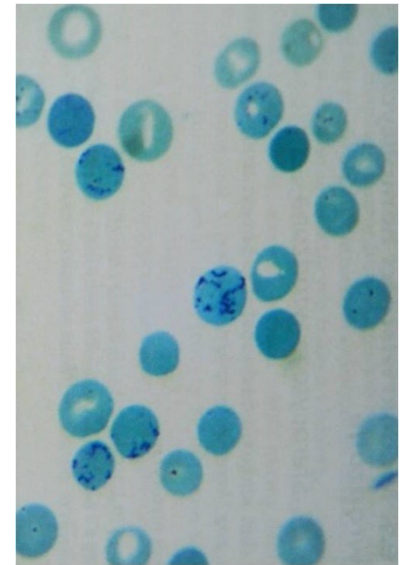
- ✓ přítomné RNA → schopnost tvorby HGB (*analýza HGB v Retic*)
- ✓ odráží schopnost KD produkovat RBC
- ✓ během 1 – 2 dnů dospívá Retic ve zralý erytrocyt
- ✓ ↑ počet Retic → aktivace KD (*zvyšování IRF*)
- ✓ ↓ počet Retic → útlum KD (*snižování IRF*)

➤ mikroskopicky

- ✓ supravitální barvení RNA v buněčných organelách (*ribozomy, endoplazmatické retikulum*)

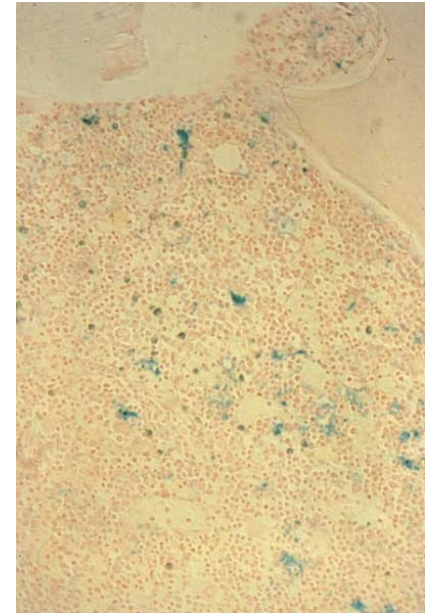
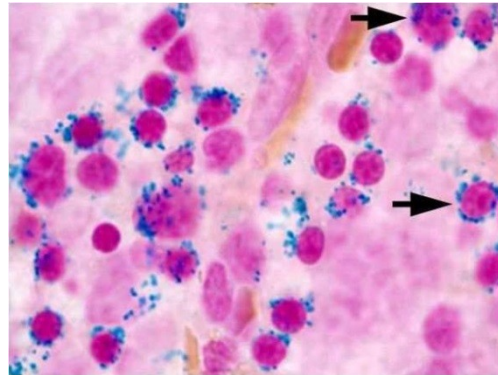
➤ analyzátozem

- ✓ analýza prošlého a odraženého světla:
probíhá na precipitovaných síťových strukturách RNA
- ✓ analýza fluorescence:
vlákna RNA jsou obarvena fluorescenčními barvami



Cytochemické vyšetření zásobního železa

- Zásobní železo Fe^{3+} : feritin, hemosiderin
- *Princip vyšetření:*
(Fe^{3+}) + ferrokyanid draselným - $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ + HCl
→ barevný komplex = berlínská (pruská) modř - $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$
- *Hodnocení:*
 - ✓ ve 100 NRBC
 - ✓ zelenomodrá granula v:
 - erythrocytech (siderocyty), NRBC (sideroblasty), NRBC okolo 2/3 jádra (prstenčité sideroblasty), makrofázích (siderofágy), extracelulárně
- *Normální hodnoty:*
20 – 60 % pozitivních NRBC
4 siderofágy
- *Klinický význam:*
 - ✓ snížení hodnoty:
 - sideropenické anémie
 - zvýšené hodnoty:
 - sideroblastické (přítomné prstenčité sideroblasty)
 - hemolytické anémie, megaloblastové anémie
 - MDS, leukémie



Základní vyšetření pro hemolytické anémie

- Obecné testy:
 - ✓ volný hemoglobin v plazmě (*základní metodika pro vyšetřování intravaskulární hemolýzy*)
 - ✓ osmotická rezistence
 - ✓ test autohemolýzy
 - ✓ hemosiderin v moči
- Testy na průkaz abnormálních hemoglobinů
 - ✓ hemoglobin F
 - ✓ hemoglobin A2
 - ✓ elektroforéza hemoglobinu
- Testy na průkaz nedostatku enzymů
 - ✓ Heinzova tělíska
 - ✓ glukózo-6-fosfátdehydrogenáza
 - ✓ pyruvátkináza

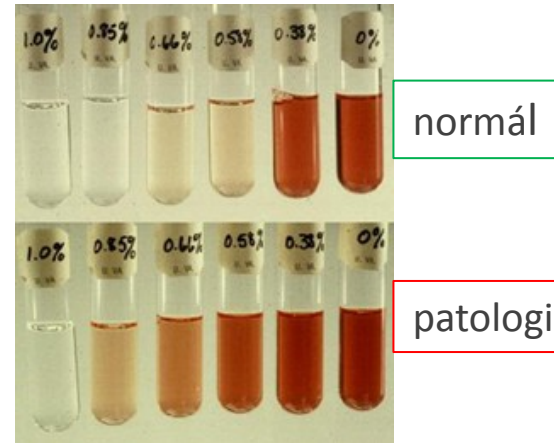
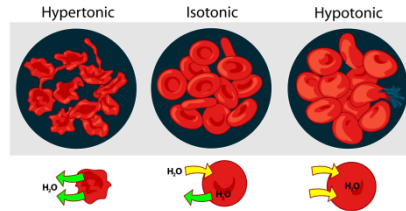
Obecné testy

➤ stanovení volného HGB v plazmě

- ✓ *Princip - spektrofotometricky:*
oxidace HGB (Fe^{2+}) \rightarrow methemoglobin (Fe^{3+}) + KCN \rightarrow barevný komplex - hemiglobinkyanid.

➤ vyšetření osmotické rezistence

- ✓ *Princip - makroskopicky:*
stanovení odolnosti RBC v různě koncentrovaných hypotonických roztocích NaCl (fyziologického r.).

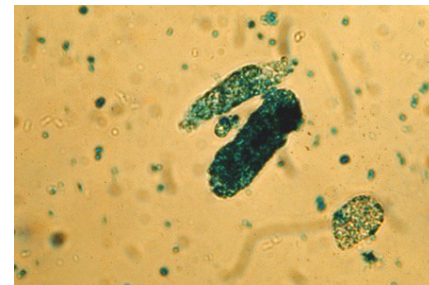


➤ test autohemolýzy

- ✓ *Princip - spektrofotometricky:*
sledování hemolýzy RBC v prostředí:
 - fyziologického roztoku
 - fyziologického roztoku s glukózou
 - fyziologického roztoku s ATP.

➤ vyšetření hemosiderinu v moči

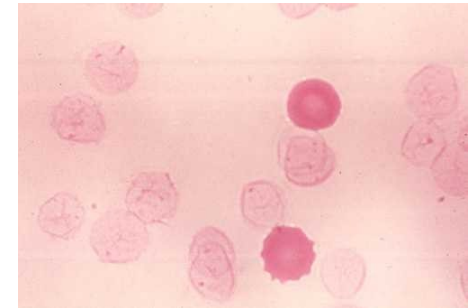
- ✓ *Princip - mikroskopicky:*
 Fe^{3+} v hemosiderinu + HCl + $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
 \rightarrow krystalky - berlínská (pruská) modř - $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$



Testy na průkaz abnormálních hemoglobinů

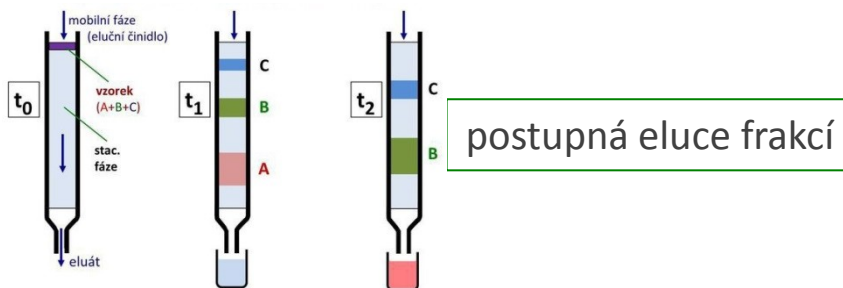
➤ hemoglobin F

- ✓ *Princip - mikroskopicky:*
Inkubace nafixovaných preparátů v kyselém prostředí (pH 3,3). HGB A je z erytrocytů vyplaven. HGB F je vůči prostředí rezistentní, v erytrocytech zůstává.
- ✓ *Hodnocení – [%] :*
novorozenci (50-90%), věk < 2 roky (0-4%), věk > 2 roky (0-4%)



➤ hemoglobin A2

- ✓ *Princip - chromatograficky:*
Na pozitivně nabitě částice pryskyřice se se naváží negativně nabitě části HGB, jednotlivé frakce HGB se vymývají pufrem, 1. frakce je s HGB A2, 2. frakce je s HGB S.
- ✓ *Hodnocení:*
Podíly jednotlivých frakcí HGB se stanovují spektrofotometricky.



➤ elektroforéza hemoglobinu

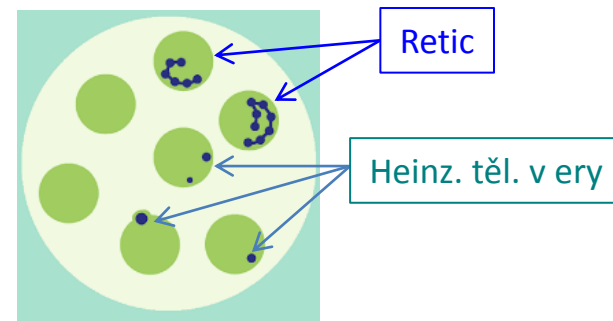
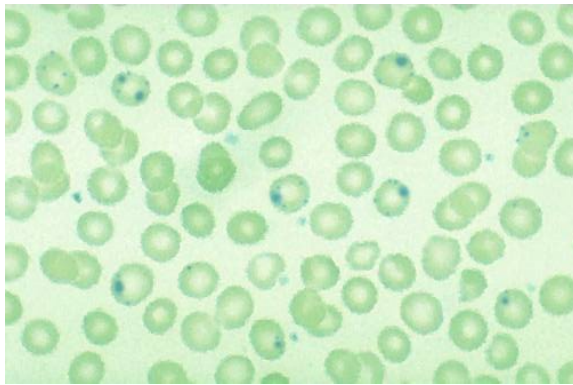
- ✓ *Princip:*
V elektrickém poli a zásaditém prostředí se hemoglobiny pohybují různě rychle, na základě velikosti negativního náboje globinového řetězce, v závislosti na přítomných aminokyselinách. Negativně nabitě molekuly HGB se pohybují k anodě (+).

Testy na průkaz nedostatku enzymů

➤ Heinzova tělíska

✓ Princip - mikroskopicky:

Heinzova tělíska znázorňují vysrážený hemoglobin v případě, že glykolytické enzymy erytrocytů nejsou schopny zabránit oxidaci hemoglobinové molekuly. Precipitáty se jeví jako oválná tělíska v erytrocytech. Objevují se těsně u buněčné membrány, ke které přiléhají, barví se supravitálně brilliantcresylovou modří přímo nebo po inkubaci s acetylphenylhydrazinem.



➤ glukózo-6-fosfát dehydrogenáza (G-6-PDH)

✓ Princip - spektrofotometricky:

Kinetické měření aktivity enzymu v UV oblasti. G-6PDH se podílí na redukci NADP^+ na NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfát), nárůst NADPH je přímo úměrná aktivitě G-6-PDH.

➤ pyruvátkináza

✓ Princip - spektrofotometricky:

Kinetické měření aktivity enzymu v UV oblasti. V přítomnosti pyruvátkinázy dochází při katalytické reakci ke spotřebě NADPH, jejíž pokles je nepřímo úměrné aktivitě pyruvátkinázy.

***Cytomorfologická vyšetření krevních
buněk v souvislosti s onkologickou
hematologií***

Sledování vyšetření

Hodnotit:

- celý krevní obraz
 - ✓ početní změny WBC, RBC, PLT, přístrojová hlášení
- morfologické změny v periferní krvi
 - ✓ WBC spolu s diferenciací, RBC, PLT
- morfologické a množstevní změny v kostní dřeni
 - ✓ u leukocytární, erytrocytární a trombocytární populace, včetně MGK
- cytochemická vyšetření

-
- ❖ počet blastů pro diagnostiku akutní leukémie:
 - dle WHO klasifikace > 20%

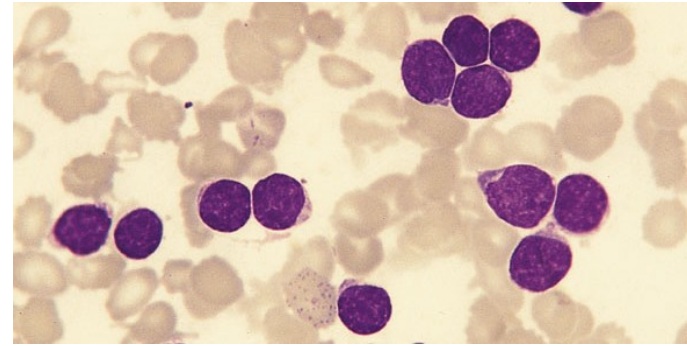
Příklady morfologických abnormalit u akutních lymfoblastických leukémií

Dělení dle FAB klasifikace

➤ ALL – L1

✓ morfologické nálezy:

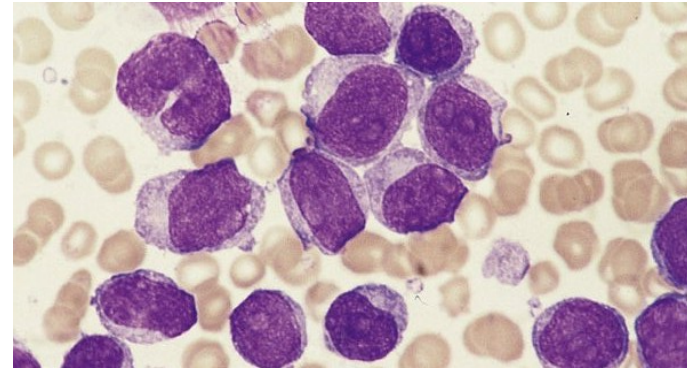
- menší blastické buňky
- vysoký N/C (nukleo-cytoplazmatický) poměr
- jemnější chromatin
- nejasná jadérka



➤ ALL – L2

✓ morfologické nálezy:

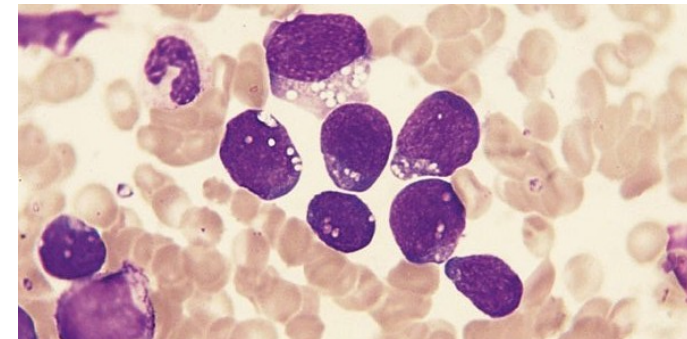
- větší, často polymorfní blastické buňky
- bohatší cytoplazma
- jasná jadérka



➤ ALL – L3

✓ morfologické nálezy:

- velké buňky
- bazofilní cytoplazma
- vakuolizace (Burkittův lymfom)

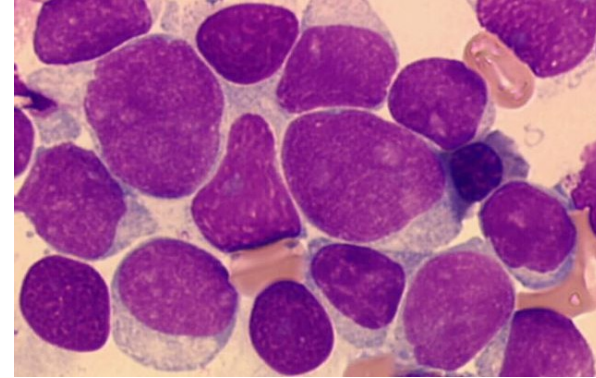


Příklady morfologických abnormalit u akutních myeloblastických leukémií

Dělení dle FAB klasifikace

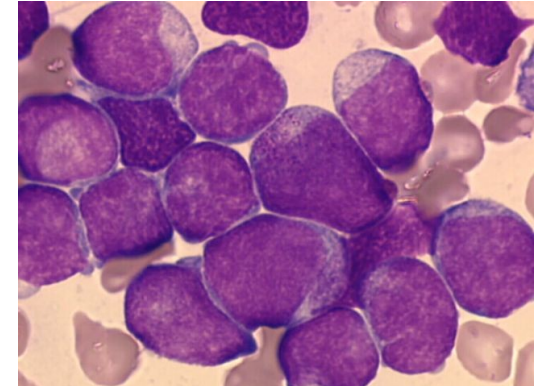
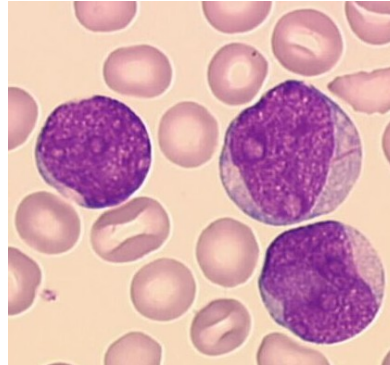
➤ AML – M0

- ✓ morfologické nálezy:
 - AML s minimálními znaky myeloidní diferenciace
 - agranulární blasty



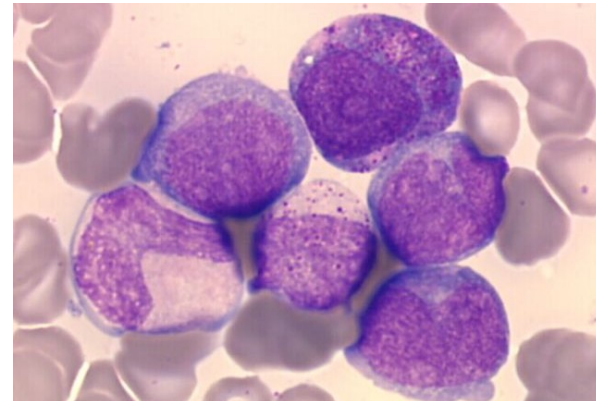
➤ AML – M1

- ✓ morfologické nálezy:
 - AML bez vyzrávání
 - blasty > 90% z nonerytroidní řady
 - Auerovy tyče



➤ AML – M2

- ✓ morfologické nálezy:
 - AML s vyzráváním
 - blasty 20 – 90 % z nonerytroidní řady
 - podíl monocitárních buňek <20%
 - Auerovy tyče



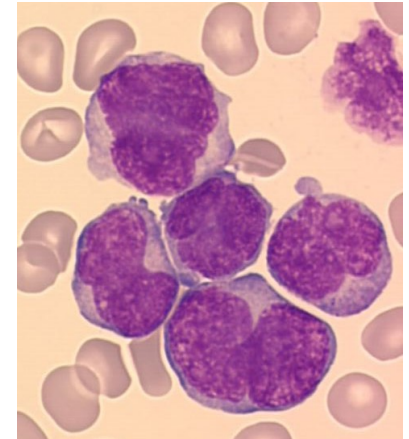
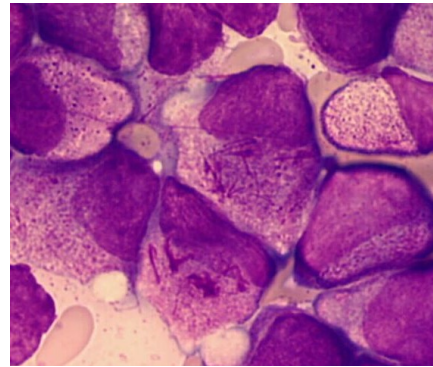
Příklady morfologických abnormalit u akutních myeloblastických leukémií

Dělení dle FAB klasifikace

➤ AML – M3

✓ morfologické nálezy:

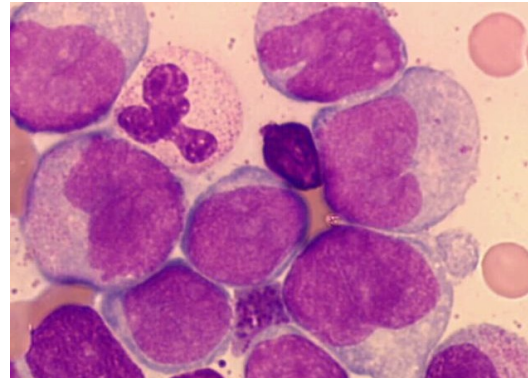
- AML - promyelocytární
- do nádorové populace buněk zahrnovány blasty i abnormální promyelocyty
- typ M3 – hypergranulární
Auerovy tyče, snopce Auerových tyčí
- typ M3 – variantní
dvoulaločnatá, mnoholaločnatá jádra
až agranulace cytoplazmy, oválné inkluze, Auerovy tyče



➤ AML – M4

✓ morfologické nálezy:

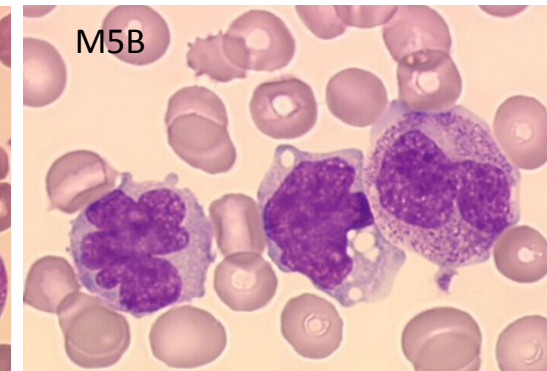
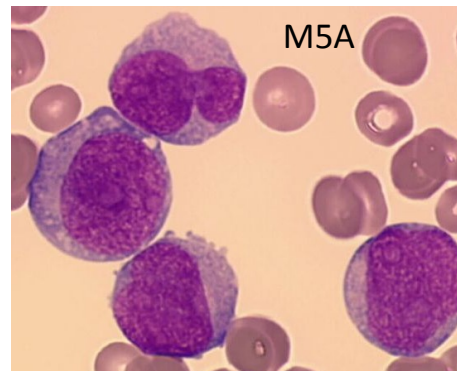
- AML - myelomonocytární
- většina blastů z nonerytroidní řady
- podíl monocytárních buněk > 20%
- v KO bývá monocytóza



➤ AML – M5

✓ morfologické nálezy:

- AML - monocytární
- typ M5A
monoblasty, méně granulace, vakuolizace
- typ M5B
více promonocytů, monocytů
- podíl monocytární populace > 80%



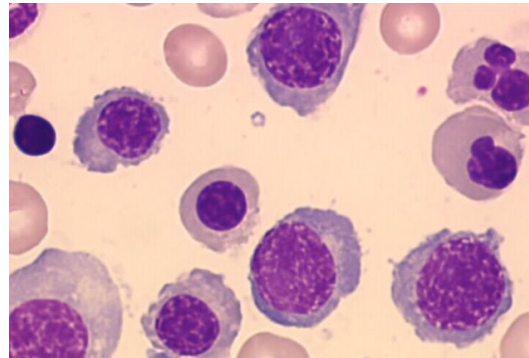
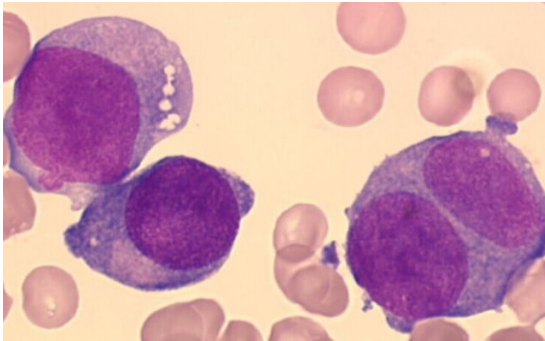
Příklady morfologických abnormalit u akutních myeloblastických leukémií

Dělení dle FAB klasifikace

➤ AML – M6

✓ morfologické nálezy:

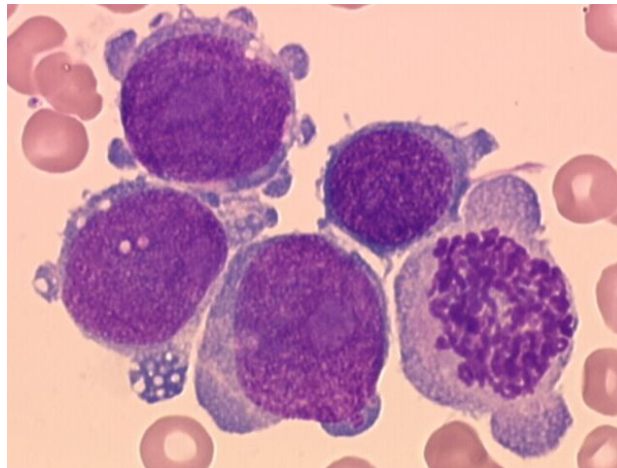
- erytroleukémie
- erytroblasty (proerytroblasty + NRBC) > 50% ze všech jaderných buněk
- ostatní blasty i z nonerytroidních buněk
- dysplázie v erytrocytární řadě (členitá jádra, karyorexe, vícejaderné NRBC, vakuolizace, megaloblasty)



➤ AML – M7

✓ morfologické nálezy:

- megakaryocytární leukémie
- blasty většinou megakaryoblasty
- dysplastické změny MGK

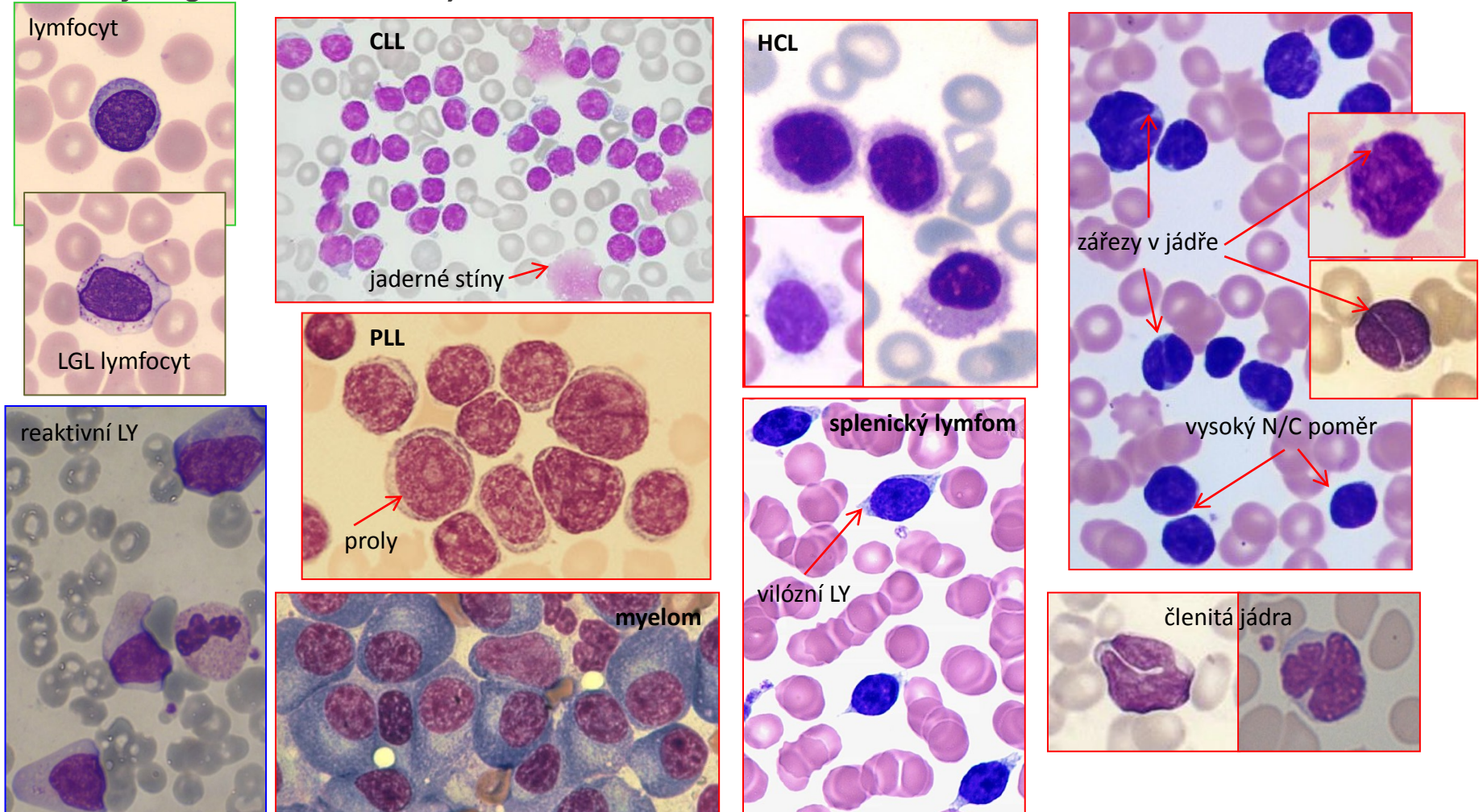


Příklady morfologických abnormalit u lymfoproliferativních onemocnění

➤ základní nálezy

- ✓ změny v počtu WBC (snížení, normální počet, zvýšení – dle typu onemocnění až nad $100 \times 10^9/l$ i přes $500 \times 10^9/l$)
- ✓ lymfocytóza
- ✓ reaktivní LY, atypické LY (atypie jádra a cytoplazmy), mladší lymfocyty, holá jádra (jaderné/Gumprechtovy stíny)

➤ morfologické abnormality

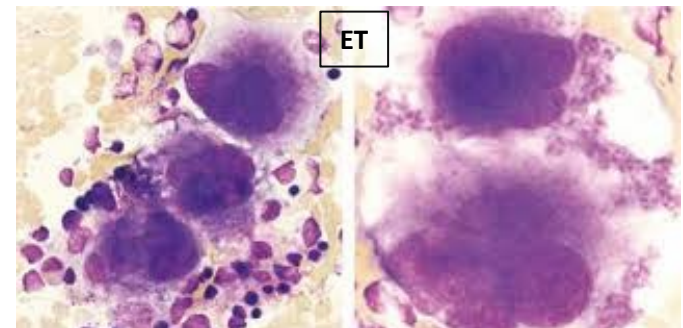
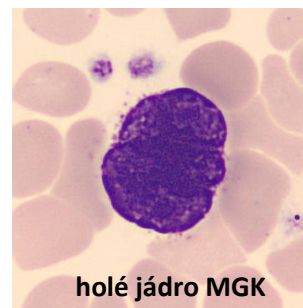
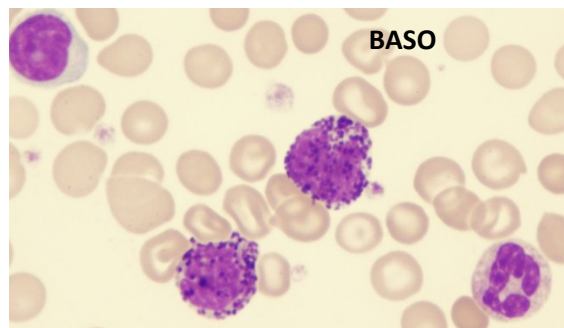
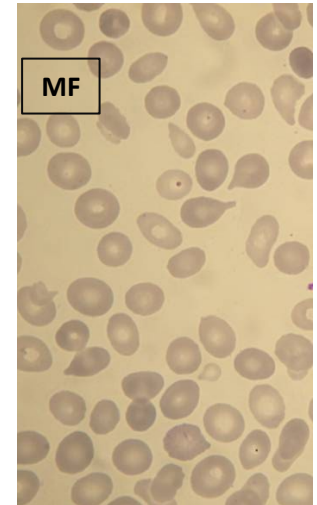
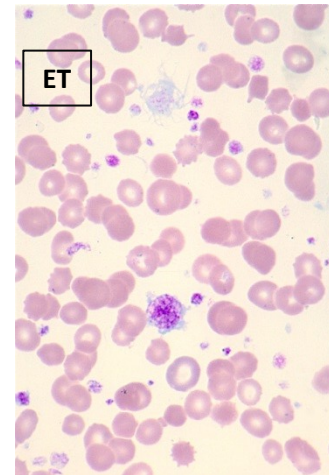
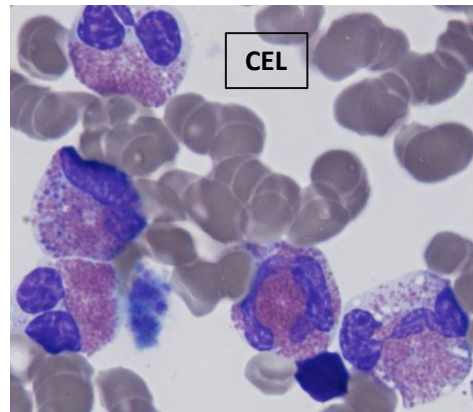
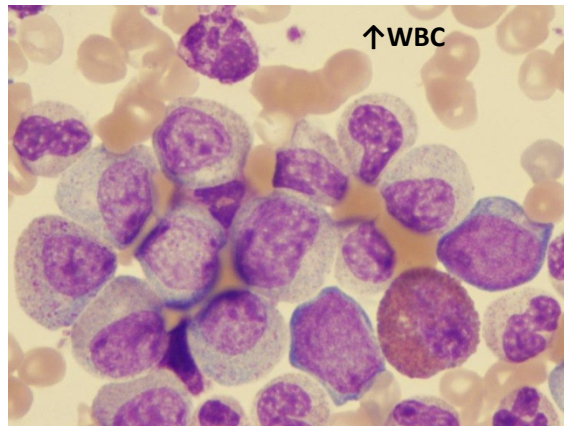


D - Příklady morfologických abnormalit u myeloproliferativních onemocnění

➤ základní nálezy

- ✓ zvýšený počet WBC (často až 100x i více), zvýšený počet PLT (možný extrémní počet až k $1000 \times 10^9/l$)
- ✓ možné morfologické nálezy v návaznosti na typ onemocnění:
 - neutrofilie a mladší vývojová stádia (myelocyty, metamyelocyty), bazofilie, může být eozinofilie, možná přítomnost různého podílu blastů, v KD hyperplazii granulocytárních řad
 - NRBC v periferní krvi, sledovat morfologické odchylky RBC (slzičkovité RBC)
 - patologická morfologie PLT, i gigantické PLT, v KD zmnožené dysplastické MGK, holá jádra MGK v periférii

➤ morfologické abnormality



Laboratorní nálezy u myelodysplastického syndromu

➤ základní nálezy v periferní krvi

✓ erytrocyty:

anémie, ↑RDW, polychromázie, poikilocytóza, inkluze v RBC, dysplázie NRBC, ↓RETIC

✓ leukocyty:

obvykle ↓NE, hypo/hyper(>5segmentů) - segmentace NE, pseudo-Pelgerova-Huětova anomálie, hypo/hyper/nerovnoměrná-granulace NE, vakuolizace NE, evt. přetrvávající bazofilie cytoplazmy NE, abnormální mono/promonocyty

✓ trombocyty:

většinou ↓PLT, ↑PDW, makro PLT, hypogranulární PLT, fragmenty cytoplazmy MGK, mikro MGK, jádra MGK

➤ základní nálezy v kostní dřeni

✓ dyserythropoéza:

podobné dysplatické změny jako v PK, dále:

- jádro: mezijaderné můstky, karyorexe, vícejadernost, megaloidní rysy, zneokrouhlení jádra
- cytoplazma: vakuolizace, nerovnoměrná barvitelnost

✓ dysgranulopoéza:

podobné dysplatické změny jako v PK, dále:

- asynchronie vyhrávání jádra a cytoplazmy, Auerovy tyče, pseudo-Chediakova-Higashiho granula

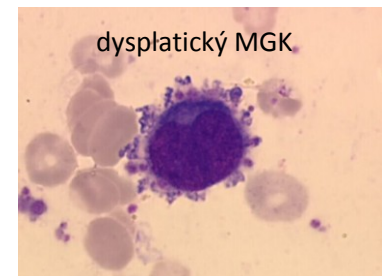
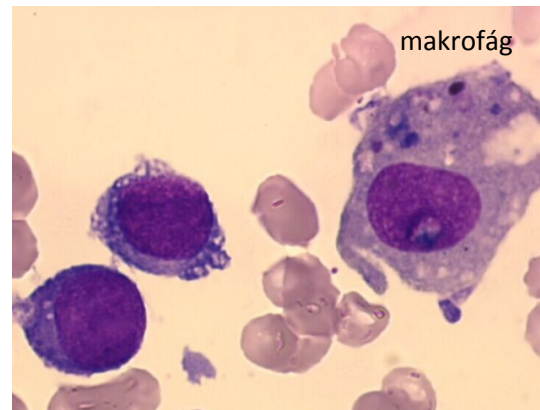
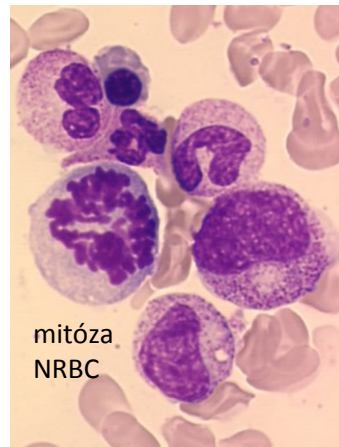
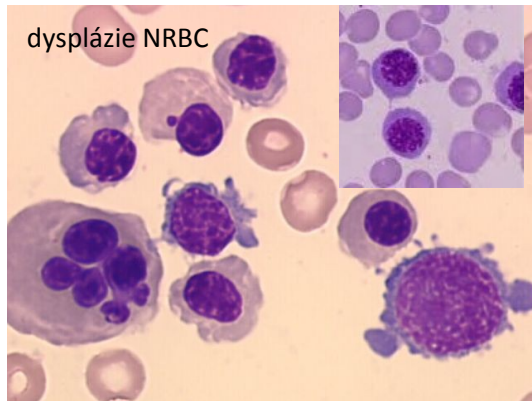
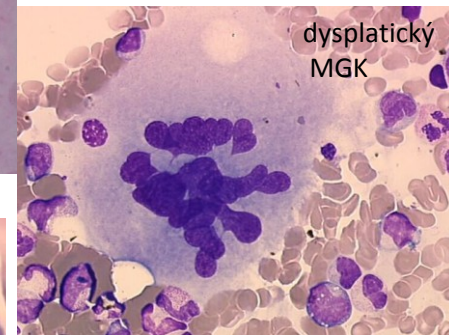
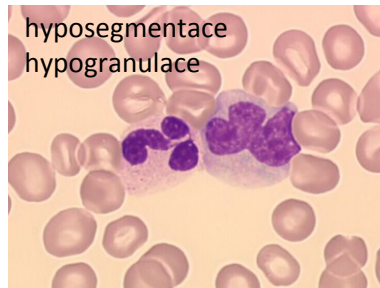
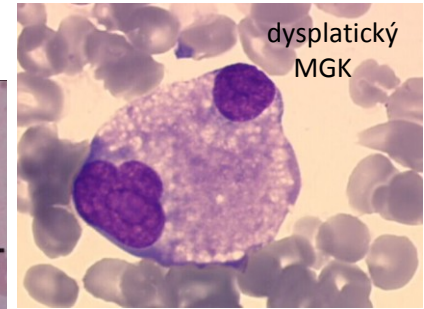
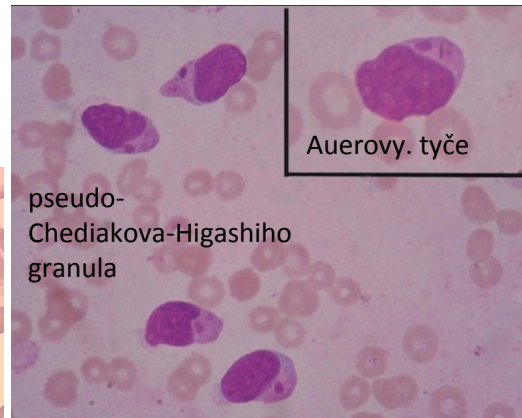
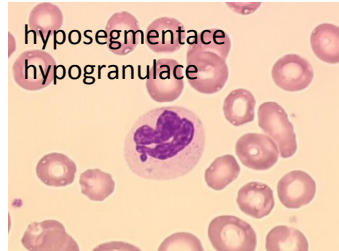
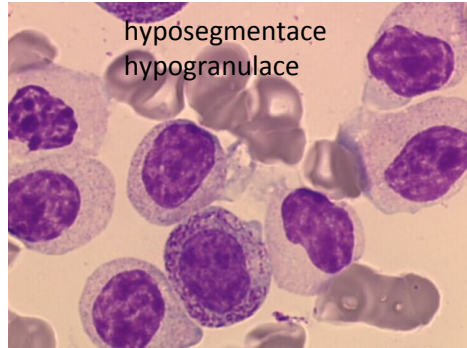
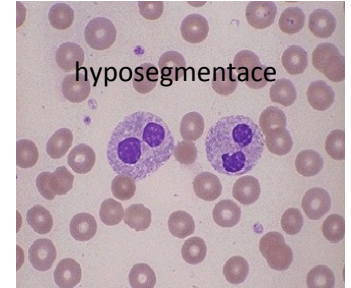
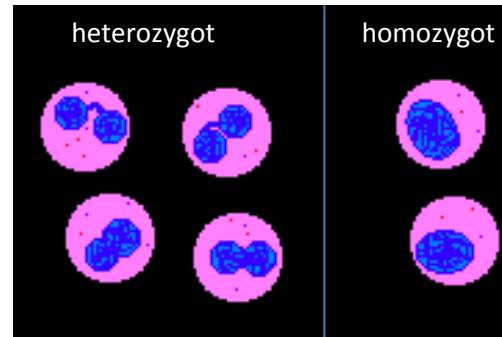
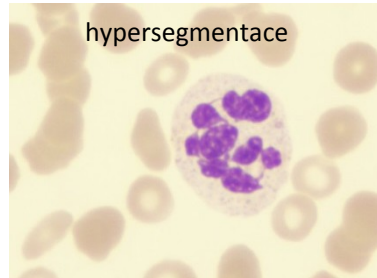
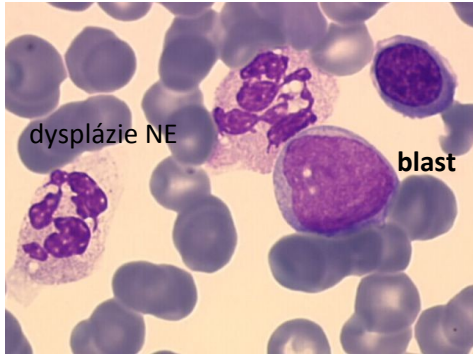
✓ dysmegakaryopoéza:

- mikro/obrovské MGK, hypo/hyper - lobularizace MGK, vícejaderné MGK, vakuolizace, hypogranulace MGK

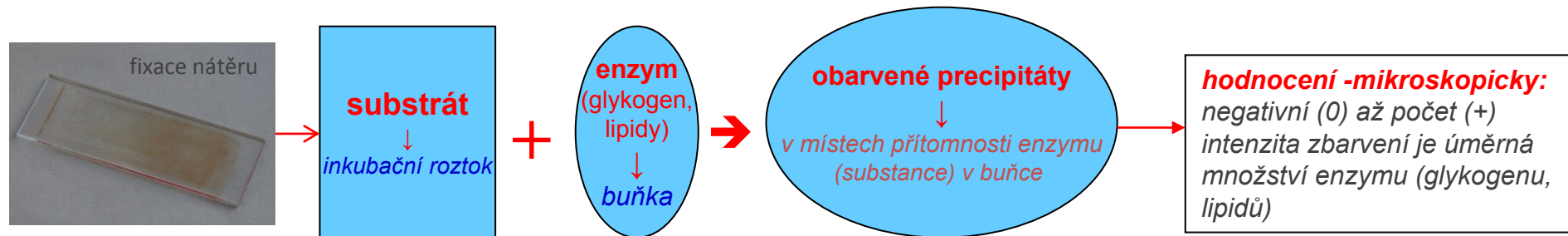
❖ Sledovat:

- charakter dysplazie pro rozlišení typu MDS
- počet blastů v PK a KD
- cytopenie v KO (bez dysplastických změn by neměla být návaznost na diagnostiku MDS)

Příklady morfoložických abnormalit u myelodysplastického syndromu



Cytochemická vyšetření



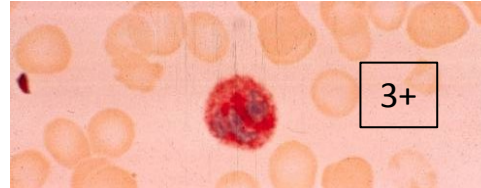
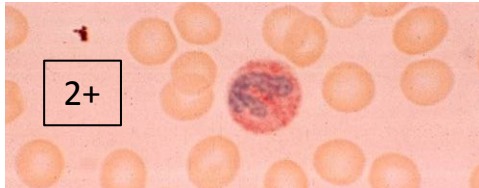
Cytochemická barvení:

- neutrofilní alkalická fosfatáza
- myeloeroxidáza
- chloracetátesteráza
- sudanovou černí
- PAS (Periodic Acid – Schiff)
- nespecifická esteráza (s blokádou fluoridem sodným)
- kyslá fosfatáza (s rezistencí na kyselinu L-vinnou)

Cytochemická vyšetření

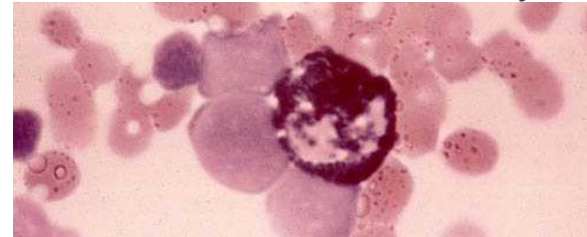
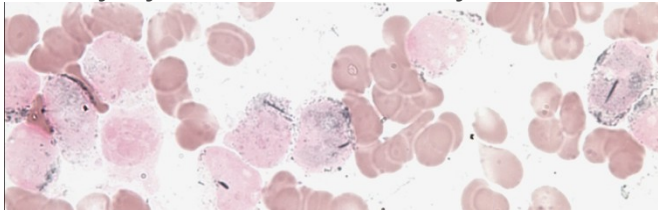
➤ neutrofilní alkalická fosfatáza

- ✓ hodnocení: v periferní krvi, neutrofilní tyče a segmenty
- ✓ klinický význam: ↓ALP u chronické myeloidní leukémie, ↑ALP u chronické neutrofilní leukémie



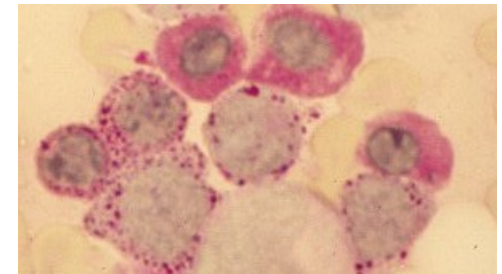
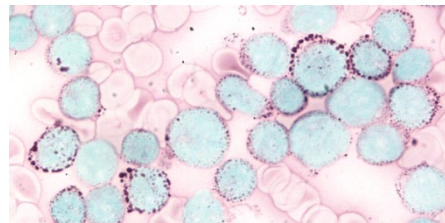
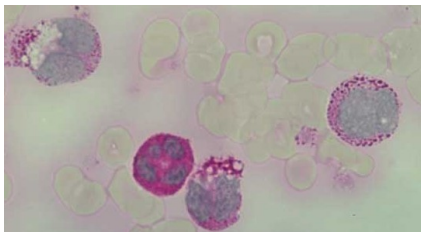
➤ myeloperoxidáza

- ✓ hodnocení: v primární granulaci NE, EO, MO (množství enzymu se zvyšuje s vyžíváním buněk), lymfocyty jsou vždy negativní, sledování přítomnosti Auerových tyčí
- ✓ klinický význam: rozlišení myeloblastické nebo monoblastické leukémie od lymfoblastické



➤ PAS

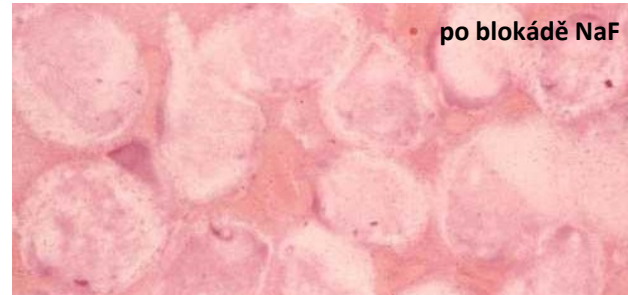
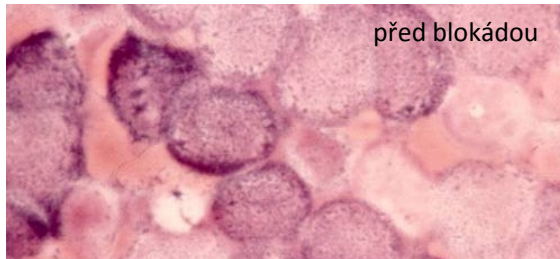
- ✓ hodnocení: typ pozitivita (difúzní, jemně nebo hrubě pozitivní granula)
 - fyziologická: myel.buňky (difúzní), monocytárníbuňky (jemná granula), lymfocyty (mohou být výraznější granula), NRBC (negativní)
 - patologická: LY u CLL (většinou výrazná granulární pozitivita), lymfoblasty u ALL (většinou pozitivní), NRBC hrubozrná pozitivita
- ✓ klinický význam: leukémie, MDS, anémie



Cytochemická vyšetření

➤ nescifická esteráza s blokádou fluoridem sodným

- ✓ princip: enzym reaguje se substrátem nebo je reakce blokována NaF (současné barvení dvou nátěrů)
- ✓ hodnocení:
 - po inkubaci bez blokády: myeloidní buňky a lymfocyty pozitivní (0/+), monocyty (+/+++)
 - po inkubaci s NaF: pozitivita u myeloidních buněk a lymfocytů stejná nebo jen lehce zeslabená, u monocytů zeslabení (0/+)
- ✓ klinický význam: k průkazu AML M4 a AML M5



➤ kyselá fosfatáza s rezistencí na kyselinu L-vinnou

- ✓ princip: enzym reaguje se substrátem nebo je reakce blokována kyselinou L-vinnou, pokud je v buňce přítomen isoenzym -5, potom je reakce na kyselinu L-vinnou rezistentní (současné barvení dvou nátěrů)
- ✓ hodnocení:
 - po inkubaci bez blokády: granulocyty, monocyty, lymfocyty pozitivní na (0/+)
 - po inkubaci s kyselinou L-vinnou: pozitivita zůstává pouze v lymfocytech s izoenzymem-5
- ✓ klinický význam: pozitivita v lymfocytech po inkubaci s kyselinou L-vinnou slouží k diagnostice klasické formy HCL

