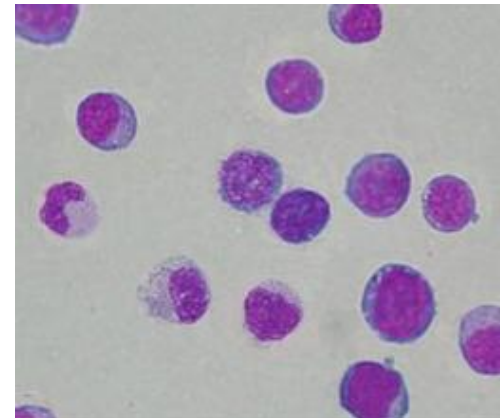
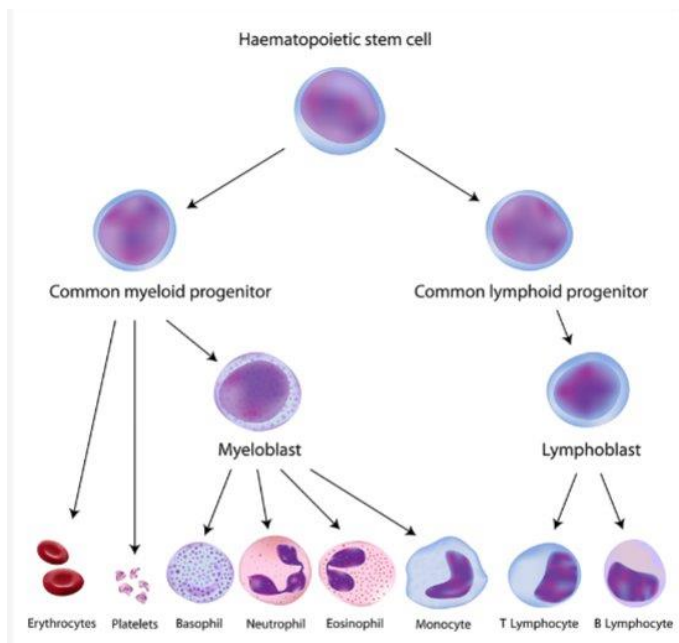


**Krevní buňky a principy jejich
vyšetřování
na hematologických
analyzátorech a mikroskopicky**

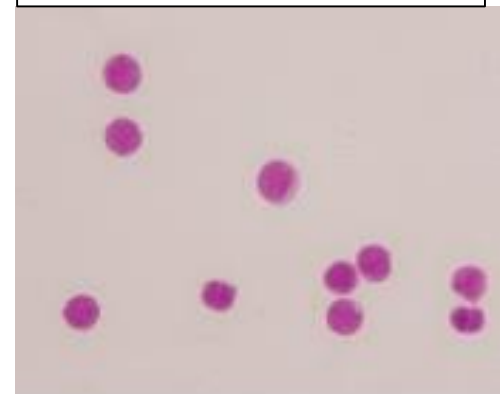
Bourková L., OKH FN Brno

Vyšetřování krevních buněk v periferní krvi

- nesrážlivá periferní krev
- antikoagulační činidlo: K3EDTA, K2EDTA nebo Na2EDTA
- vyšetření:
 - ✓ hematologické analyzátoři
 - ✓ mikroskop

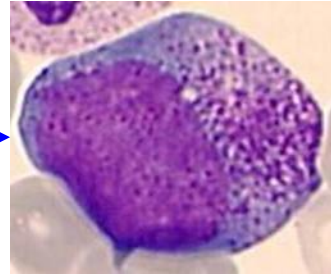
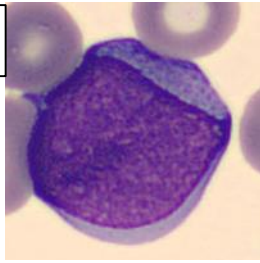


hematopoetické kmenové buňky



Leokocytární vývojová stádia - Granulocyty

BLAST

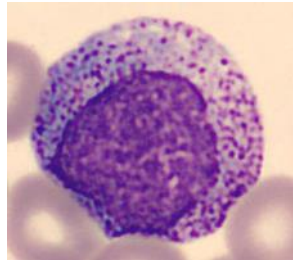


PROMYELOCYT

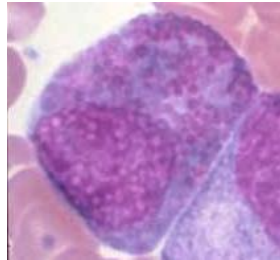
neu My

eoz My

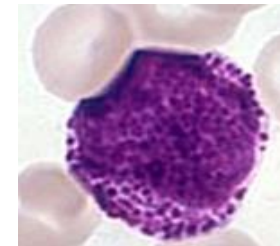
bazo My



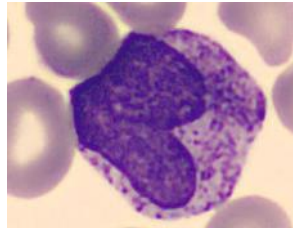
neutorfilní
myelocyt



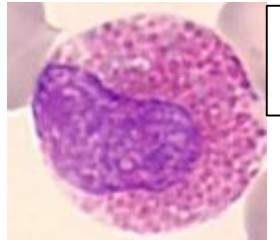
eozinofilní
myelocyt



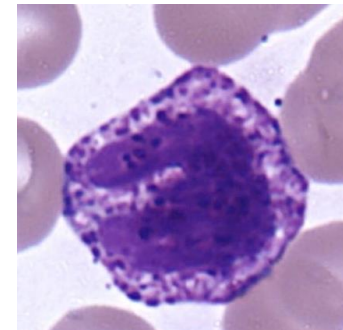
bazofilní
myelocyt



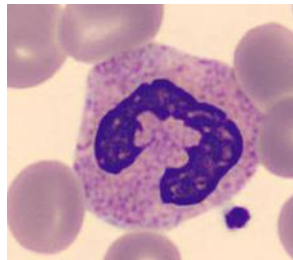
neutorfilní
metamyelocyt



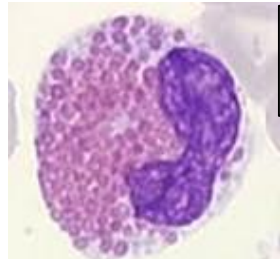
eozinofilní
metamyelocyt



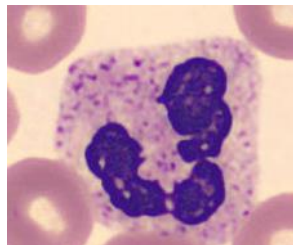
bazofilní
metamyelocyt/
tyč



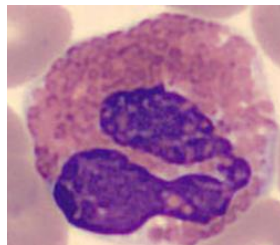
neutorfilní
tyč



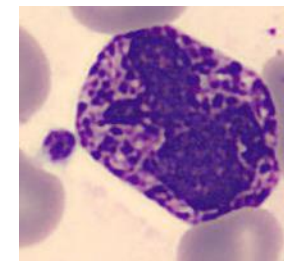
eozinofilní
tyč



neutorfilní
segment



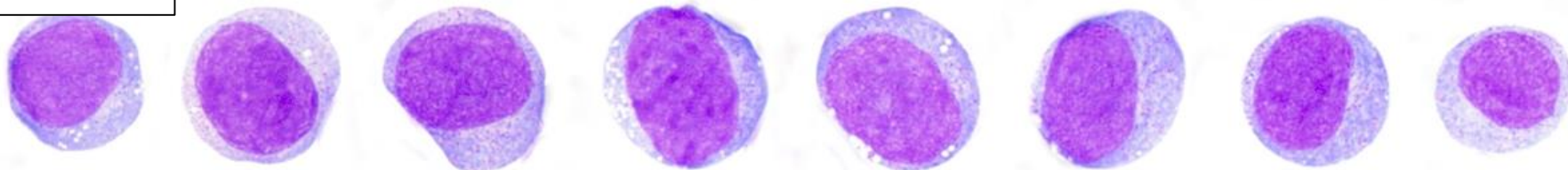
eozinofilní
segment



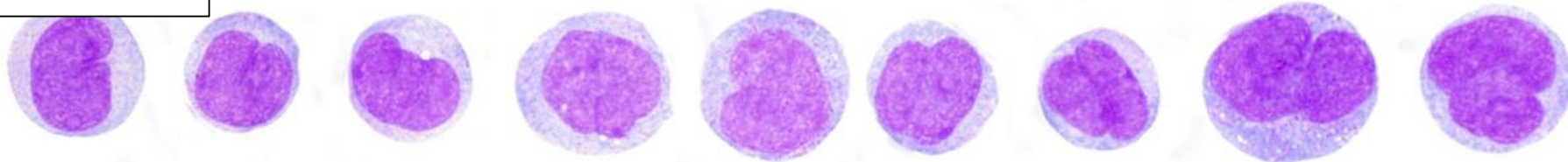
bazofilní
segment

Leukocytární vývojová stádia - *Monocyty*

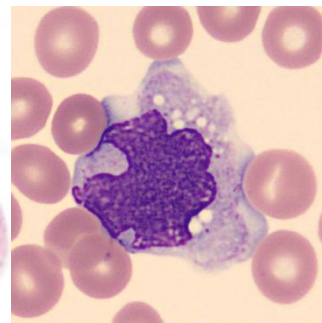
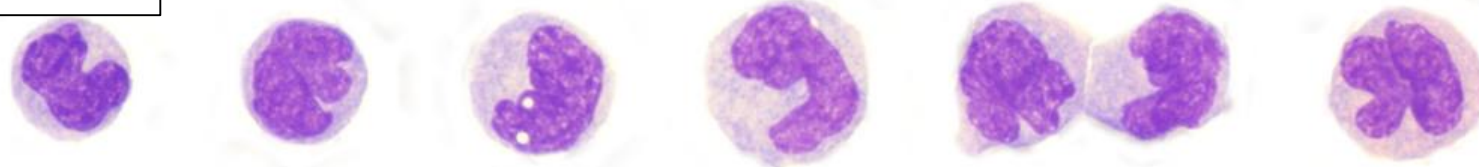
MONOBLASTY



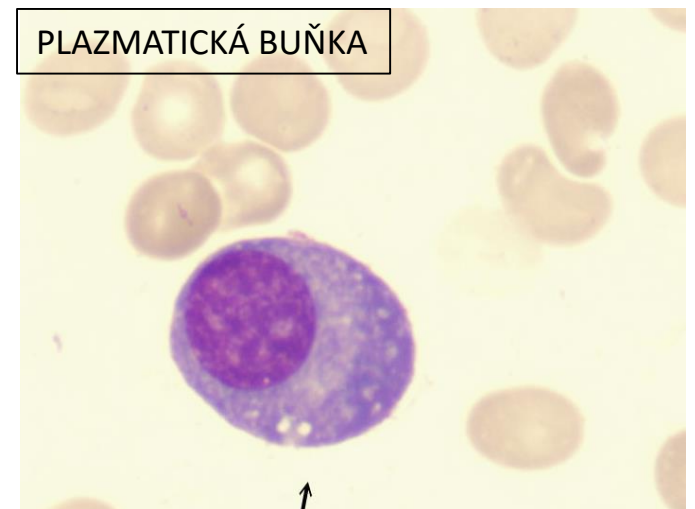
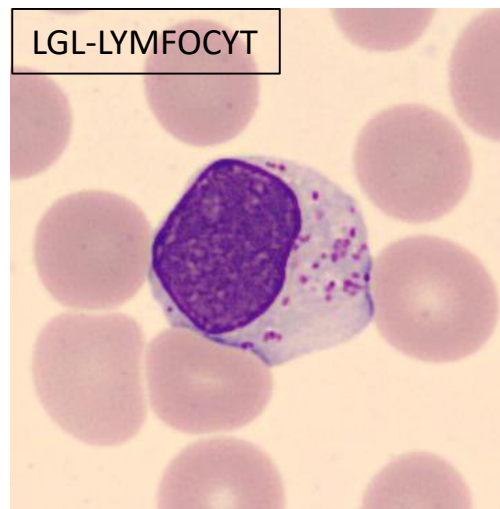
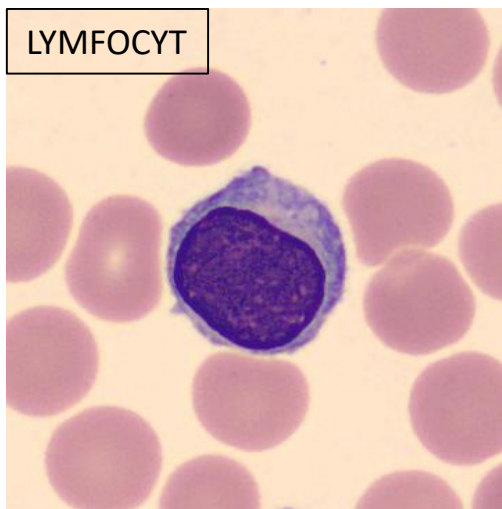
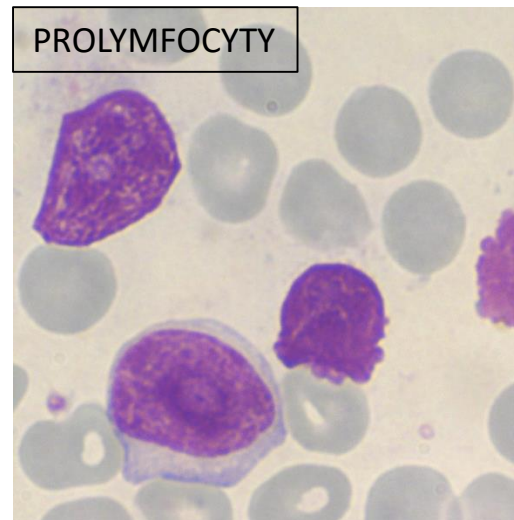
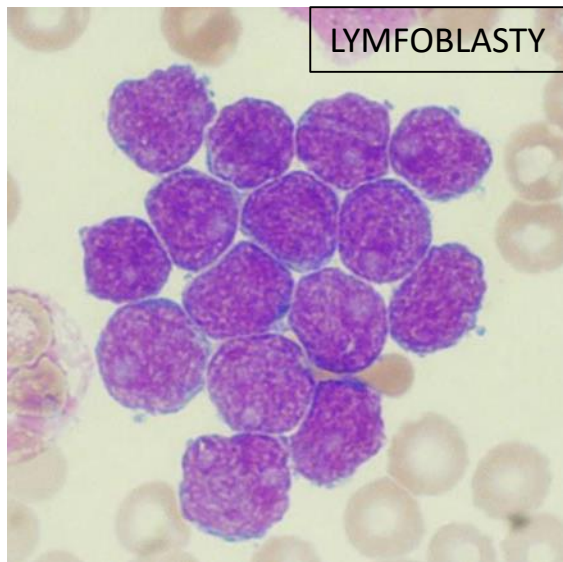
PROMONOCYTY



MONOCYTY

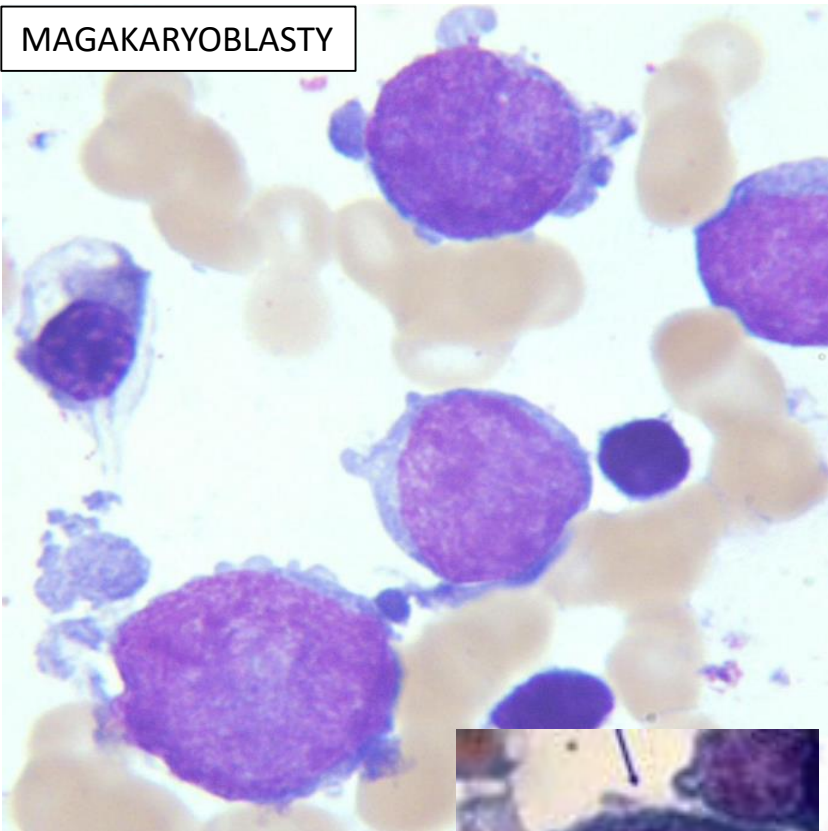


Leukocytární vývojová stádia - *Lymfocyty*

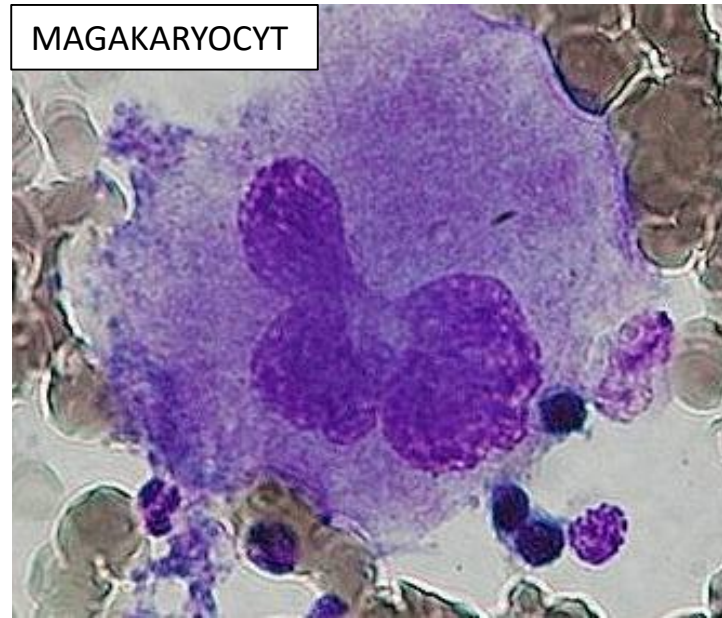


Megakaryotární vývojová řada

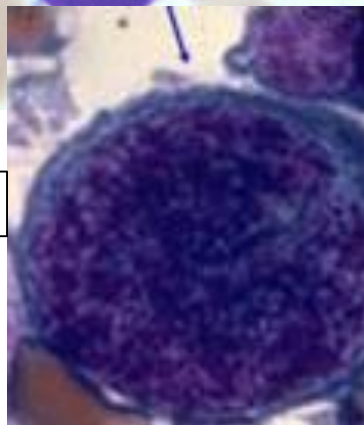
MAGAKARYOBLASTY



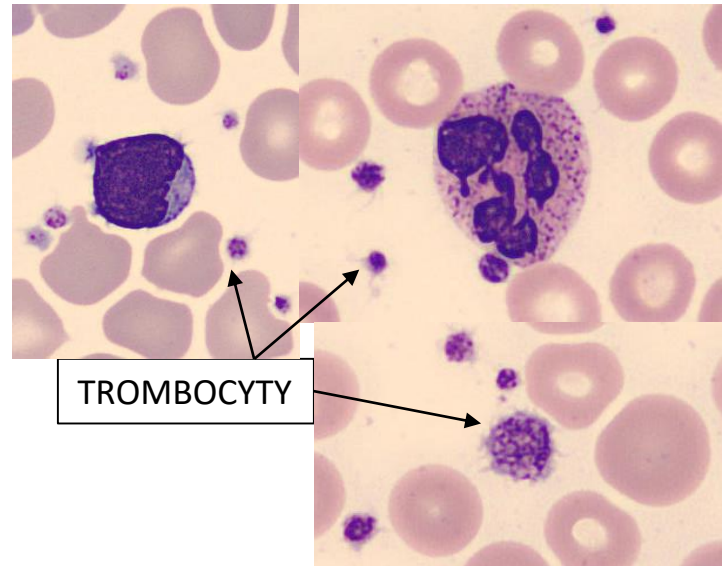
MAGAKARYOCYT



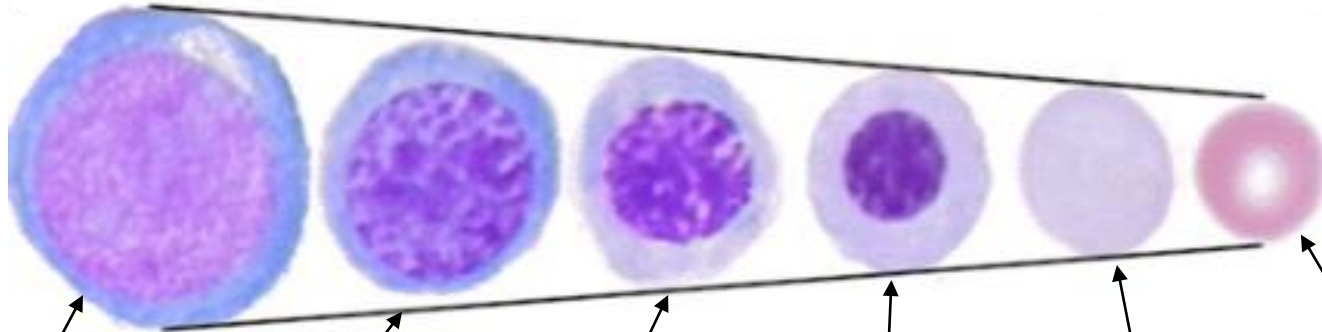
PROMEGAKARYOCYT



TROMBOCYTY



Erytrocytární vývojová řada



PROERYTROBLAST

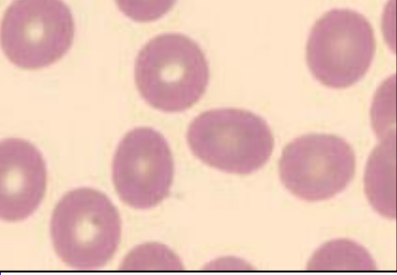
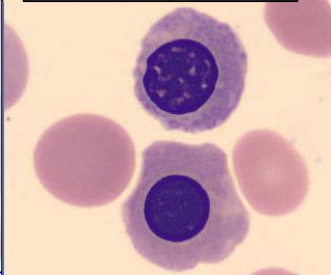
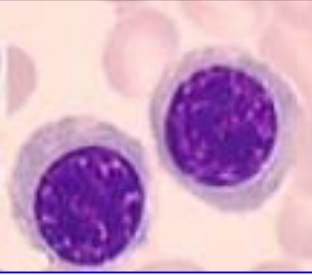
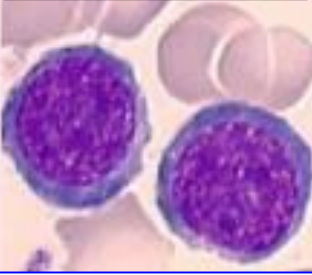
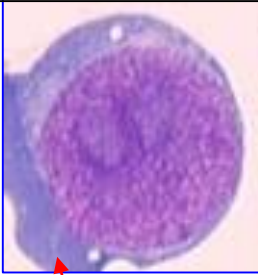
ČASNÝ ERYTROBLAST
(bazofilní normoblast)

STŘEDNĚ ZRALÝ
ERYTROBLAST
(polychromní normoblast)

POZDNÍ
ERYTROBLAST
(ortochromní/oxyfilní
normoblast)

RETIKULOCIT

ERYTROCYT



bývají laločnaté
výběžky cytoplazmy

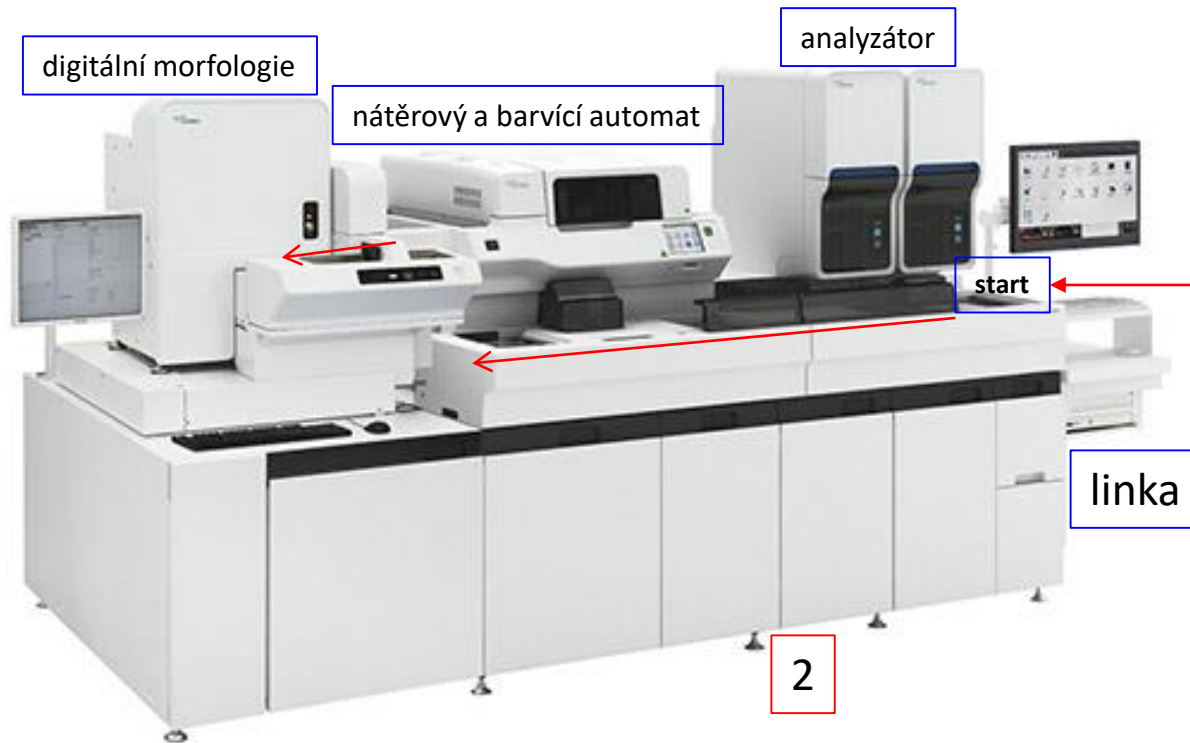
speciální
barvení

Hematologické analyzátořy



3

konec



2

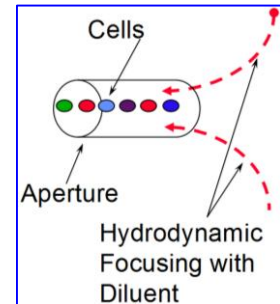
linka



1

Principy měření hematologických analyzátorů

- principy měření buněk:
 - ✓ impedanční analýza
 - ✓ optická analýza
 - kombinace různých principů analýzy
 - hydrodynamická fokusace:
usměrnění buněk proudem izotonické kapaliny (diluentem) při průchodu měřícím kanálem „po jedné“
- spektrofotometrická analýza hemoglobinu



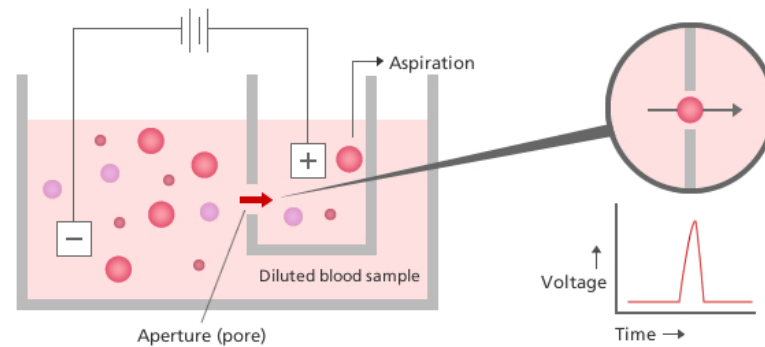
Principy měření umožňují vyšetření:

- kvantitativní – počet buněk
- kvalitativní – morfologie buněk
 - ✓ tvar buňky
 - ✓ tvar a velikost jádra
 - ✓ obsah cytoplazmy

Impedanční analýza

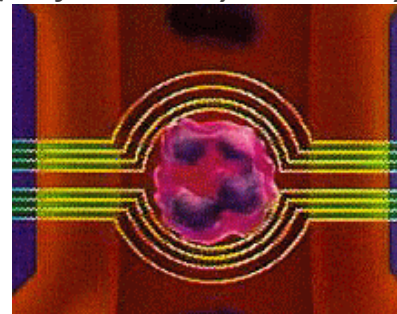
➤ ředění buněčné suspenze

- ✓ diluent - vodivý
- ✓ krevní buňka – nevodivá



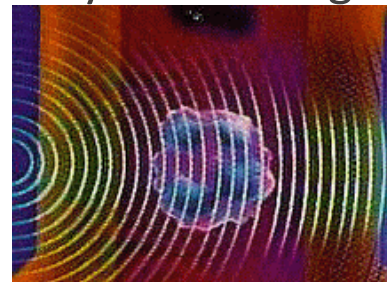
➤ průchod buněk mezi elektrodami (*stejnoseměrný elektrický proud*) → impuls

- ✓ prochází vždy jediná buňka
- ✓ počet impulsů = počet buněk
- ✓ velikost impulsů = velikost buněk



➤ možné doplnění vysokofrekvenční analýzou (*střídavý vysokofrekvenční elektrický proud*)

- ✓ na buňku superponováno vysokofrekvenční elektrické pole
- ✓ analýza vysokofrekvenčního napětí buňky = morfologie buňky



Optická analýza

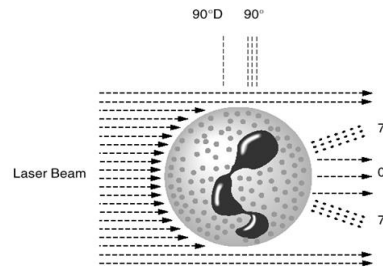
➤ ředění buněčné suspenze

- ✓ diluent – opticky inaktivní
- ✓ krevní buňka – opticky aktivní

➤ interakce buněk s monochromatickým laserovým paprskem

➤ po interakci buňky s paprskem se provádí analýza:

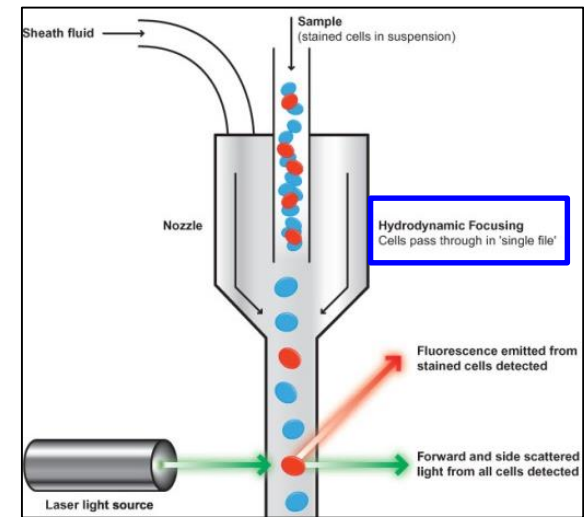
- ✓ prošlého světla (0°)
- ✓ odraženého světla
- ✓ depolarizovaného světla
- ✓ fluorescence



- *cytochemické barvení enzymu (peroxidáza) v buňkách, doplňková analýza absorpce a rozptylu světla dle stupně reakce enzymu v cytoplasmě (u některých typů přístrojů)*

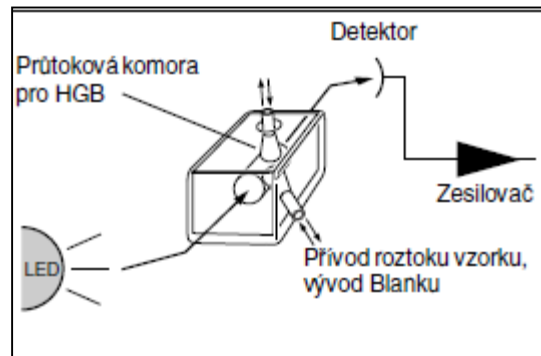
➤ vyšetření:

- ✓ kvantitativní a velikost buňky → detekce ve směru (0°)
- ✓ kvalitativní/morfologie buňky → detekce odraženého a depolarizovaného světla, fluorescence, případně kombinace s cytochemickou analýzou

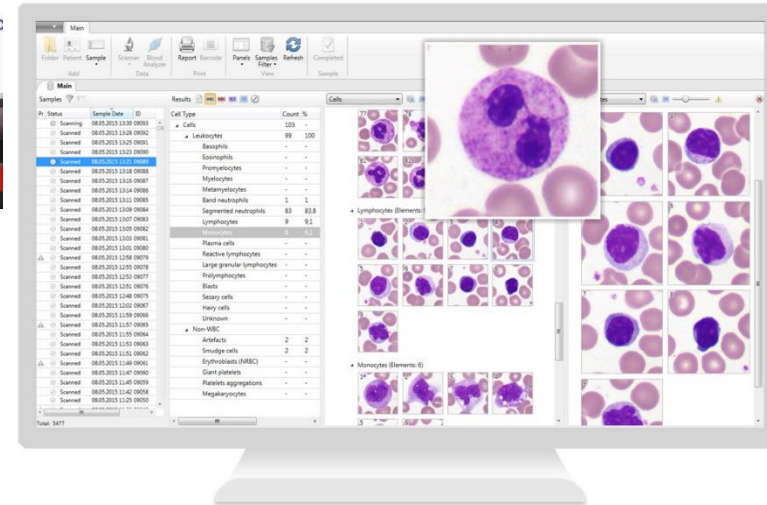
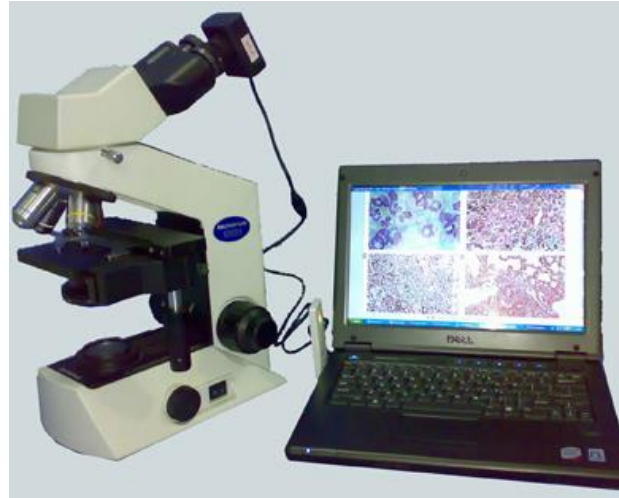


Spektrofotometrická analýza hemoglobinu

- hemolýza všech erytrocytů lyzačním (*bezkyanidovým*) roztokem
- uvolněný HGB je převeden na chromogenní formu s nejvyšší hodnotou absorpance při $\lambda = 540 \text{ nm}$
 - ✓ HGB je převeden na chromogenní formu reagensy (*např. imidazolem nebo sodium lauril sulfátem*), která vytváří hemoglobinový komplex
- měření absorpance hemolyzovaného vzorku a blanku (*lyzační roztok*)
- z rozdílu absorpancí je vypočítána koncentrace HGB

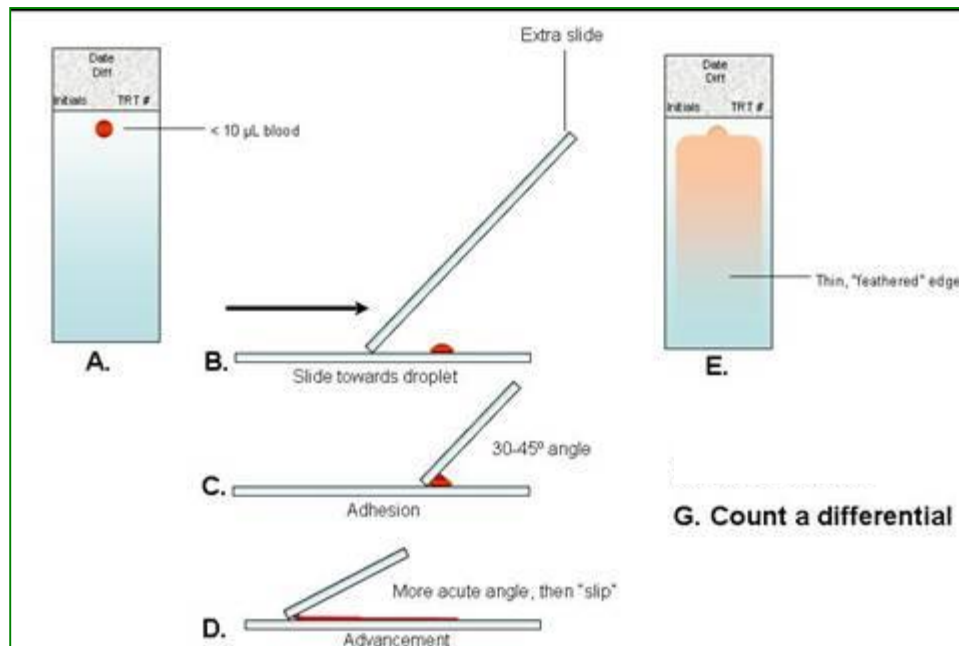


Mikroskopovací zařízení



Zhotovení nátěru krve

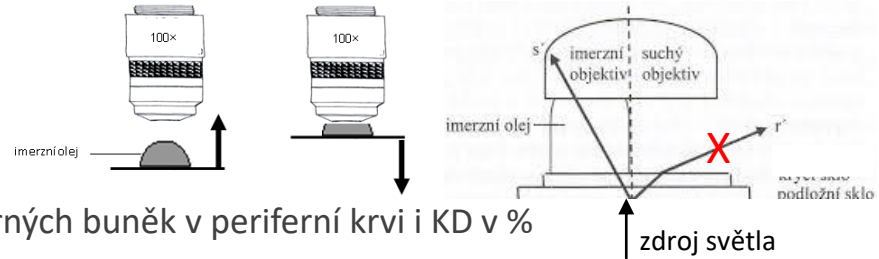
- roztírací sklíčko položit před kapku krve na podložním skle pod úhlem cca 30 - 40° (*nikdy ne do kapky krve*); po dotyku krve a roztíracího skla se krev rozlije podél hrany skla; po té rychle krev rozetřít po podložním skle
- sílu nátěru zvažovat – čím větší úhel, tím silnější nátěr
 - ✓ úhel se řídí hodnotou HCT: čím ↑ HCT, tím ↓ úhel; čím ↓ HCT, tím ↑ úhel
 - ✓ *hodnota HCT je určující jak pro manuální, tak přístrojové provedení nátěru*
- nátěr musí být: rovnoměrný, přiměřeně tenký, dlouhé okraje musí být rovné, na konci přechází „do ztracena“



Mikroskopování

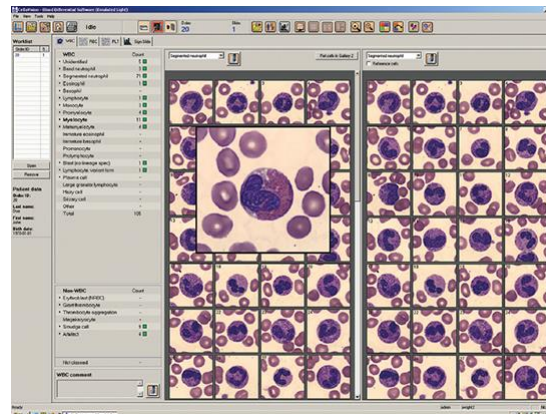
➤ mikroskop

- ✓ suchý objektiv: mezi preparátem a objektivem je vzduch (*přehledné prohlížení a buněčnost preparátu*)
- ✓ imerzní objektiv: mezi preparátem a objektivem je imerzní olej (*morfologie buněk*)
 - imerzní olej má podobný index lomu jako sklo – vznikne opticky homogenní prostředí, zvýší se index lomu prostředí mezi preparátem a objektivem
imerzí může být: voda, parafinový olej, glycerol, cedrový olej, kanadský balzám (voda má vyšší index lomu než vzduch, ale nižší než imerzní olej)
- ✓ zvětšení:
1000x (morfologie buněk)
200x (přehledný náhled na preparát)
- ✓ hodnotit nátěr komplexně (WBC, RBC, PLT)
- ✓ hodnocení subpopulací WBC a obecně jaderných buněk v periferní krvi i KD v %
- ✓ hodnocení: periferní krev (minimálně 100 WBC), kostní dřeň (minimálně 250 jaderných buněk)



➤ digitální morfologie

nové generace analyzátorů svým softwarovým vybavením digitálně zpracovávají a vyhodnocují krevní nátěry, hovoří se o virtuální mikroskopii (telehematologie), digitální analýza vytváří databázi digitálních fotografií krvinek, které lze i exportovat e-mailem nebo po internetu odborníkům ke konzultaci



Barvení nátěrů periferní krve a aspirátů kostní dřeně

➤ Panoptická barvicí technika:

- ✓ fixační roztok May-Grunwald – složení: eozin Y, metylenová modř, metylalkohol, glycerol
- ✓ barvicí roztok Giemsa-Romanowsky – složení: metylenová modř, azur-eozin, azur II, metylalkohol, glycerol, fosfátový pufr pH 6,8-7,0

➤ Základní principy barvení:

- ✓ Aniontové (kyselé) barvivo eozin Y se váže na *kationtové* části molekul proteinů a barví oranžovočerveně hemoglobin a eozinofilní granula
- ✓ Kationtové (zásadité) barvivo azur B, se váže na *aniontové* části molekul a barví modrošedě zbarvení nukleové kyseliny (DNA nebo RNA), nukleoproteiny, granula bazofilů a sekundární granula neutrofilů.

Pro správné vyhodnocení preparátů je nutná pravidelná kontrola kvality panoptického i speciálního cytochemického barvení.

Celkové obarvení nátěru je výsledkem řady různých kombinací těchto barevných reakcí, které nakonec dávají výsledný vzhled nabarveného preparátu.

Preparáty lze připravovat manuálně nebo na nátěrových a barvicích automatech. Princip barvení je vždy stejný.