

# **Speciální hematologická vyšetření**

Bourková L., OKH FN Brno

# ***Vyšetřování anémií***

# *Sledování vyšetření*

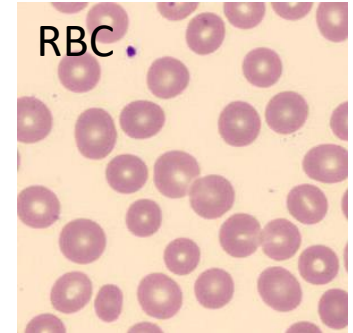
## Hodnotit:

- hloubku anémie v KO
  - ✓ změny v hodnotách měřených i počítaných parametrů RBC
  - ✓ 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*)

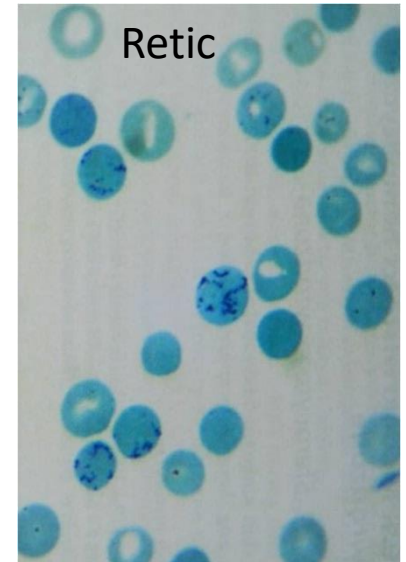


## ➤ mikroskopicky

- ✓ supravitální barvení RNA v buněčných organelách (*zbytky ribozomů a endoplazmatického retikula*)

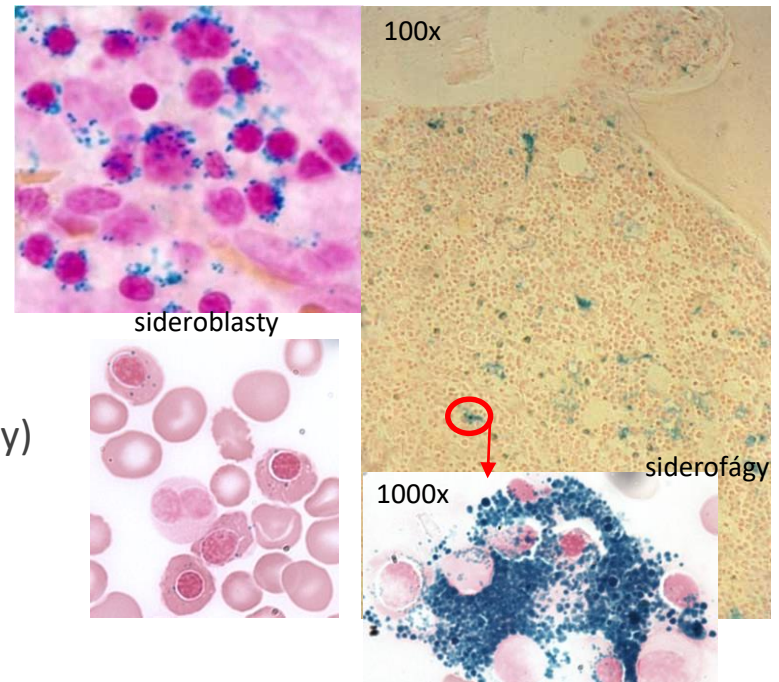
## ➤ analyzátozem

- ✓ 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  $\text{Fe}^{3+}$ : ferritin, hemosiderin (agregované molekuly feritinu)
- *Princip vyšetření:* ( $\text{Fe}^{3+}$ ) + ferrokyanid draselným -  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] + \text{HCl}$  → 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  
2-4 siderofágy ze 6 nalezených makrofágů
- *Klinický význam:*
  - ✓ snížení hodnoty:
    - sideropenické anémie
  - ✓ zvýšené hodnoty:
    - sideroblastické (přítomné prstenčité sideroblasty)
    - hemolytické anémie, megaloblastové anémie
    - MDS, leukémie



# Screeningová vyšetření pro hemolytické anémie

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

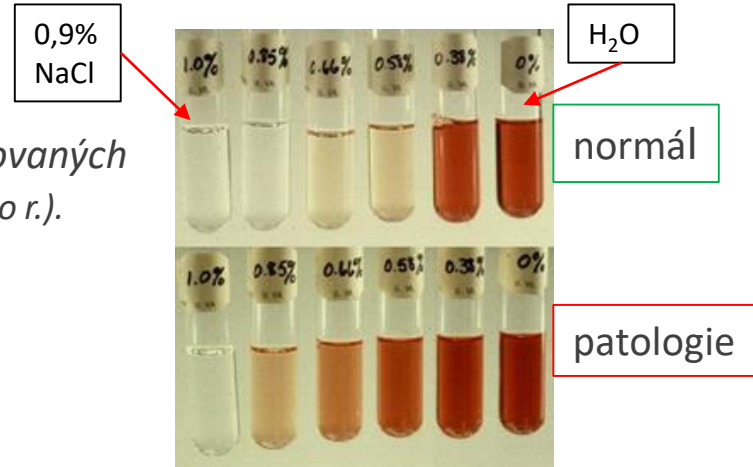
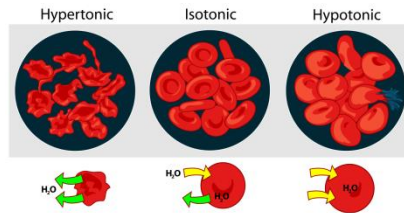
# Obecné testy

## ➤ stanovení volného HGB v plazmě

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

## ➤ vyšetření osmotické rezistence

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

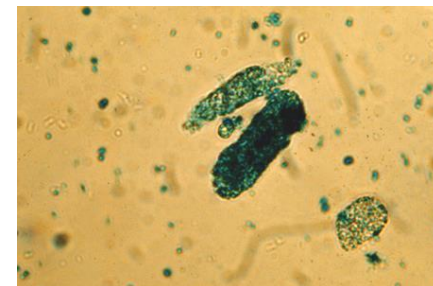


## ➤ test autohemolýzy

- ✓ *Princip – spektrofotometrické vyšetření volného HGB:*  
*sledování hemolýzy RBC v prostředí:*
  - fyziologického roztoku
  - fyziologického roztoku s glukózou
  - fyziologického roztoku s ATP.

## ➤ vyšetření hemosiderinu v moči

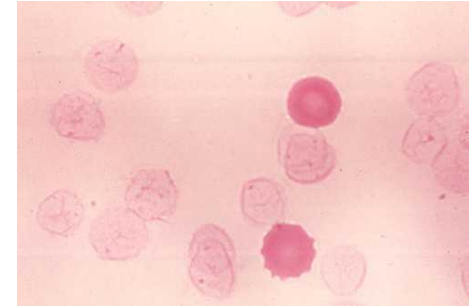
- ✓ *Princip - mikroskopicky:*  
 *$\text{Fe}^{3+}$  v hemosiderinu + HCl +  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$*   
 *$\rightarrow$  krystalky - berlínská (pruská) modř -  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$*



# Testy na průkaz abnormálních hemoglobinů

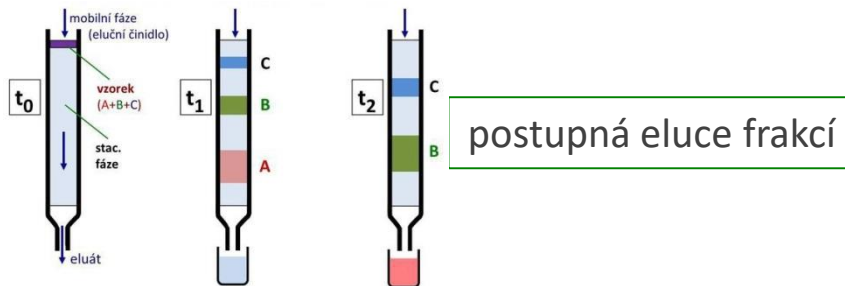
## ➤ hemoglobin F

- ✓ *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 puřem, 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 (+).*

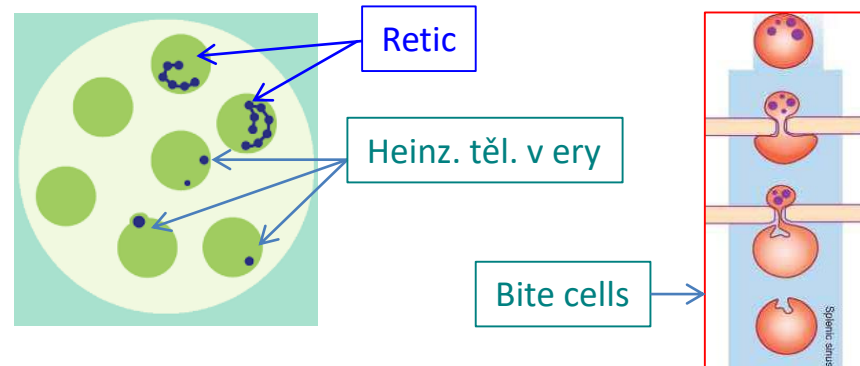
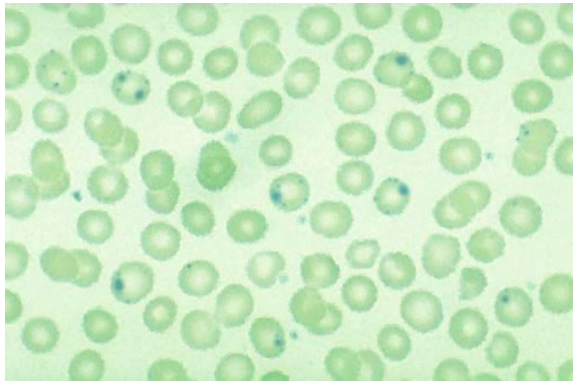


# Testy na průkaz nedostatku enzymů

## ➤ Heinzova tělíka

### ✓ Princip - mikroskopicky:

Heinzova tělíka znázorňují vysrážený degenerovaný hemoglobin v případě, že glykolytické enzymy erytrocytů nejsou schopny zabránit oxidaci hemoglobinové molekuly. Precipitáty se jeví jako oválná tělíka v erythrocytech. Objevují se těsně u buněčné membrány, ke které přiléhají, barví se supravitálně brillantcresylovou modří přímo nebo po inkubaci s acetylfenylhydrazinem. Mohou být také přítomna např. u hemoglobinopatii.



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

### ✓ Princip - spektrofotometricky:

Kinetické měření aktivity enzymu v UV oblasti. G-6PDH se podílí na redukci  $\text{NADP}^+$  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***

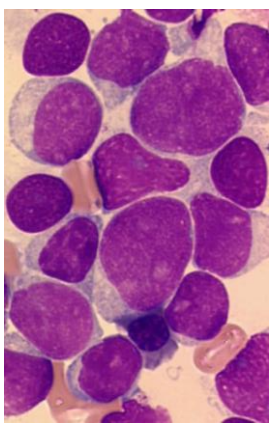
# AML (M0 – M7)

## Hodnotit:

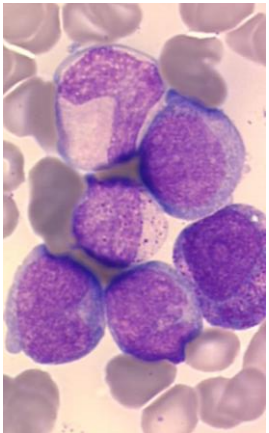
- celý krevní obraz
  - ✓ početní změny WBC, RBC, PLT, přístrojová hlášení
- morfologické změny v periferní krvi
  - ✓ WBC spolu s diferenciálním rozpočtem, RBC, PLT
- morfologické a množstevní změny v kostní dřeni
  - ✓ u leukocytární, erytrocytární a trombocytární populace, včetně MGK
    - *referenční meze myelogramu dospělých:*  
[https://labsekce.hematology.cz/wp-content/uploads/2022/11/Doporuceni\\_LS\\_CHS\\_CLS\\_JEP-Referencni\\_meze-myelogram\\_dospelych\\_v02\\_rev01.pdf](https://labsekce.hematology.cz/wp-content/uploads/2022/11/Doporuceni_LS_CHS_CLS_JEP-Referencni_meze-myelogram_dospelych_v02_rev01.pdf)
- cytochemická vyšetření

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

M0

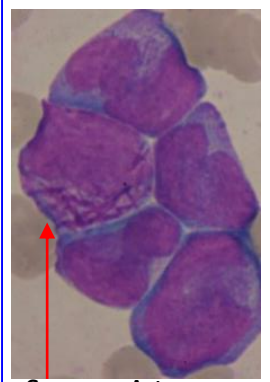


M2



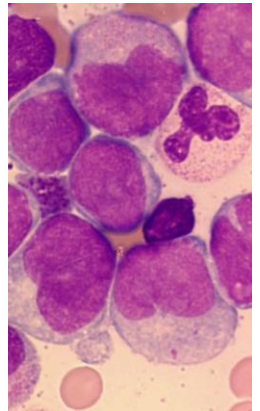
M3

Hypergranulární M3



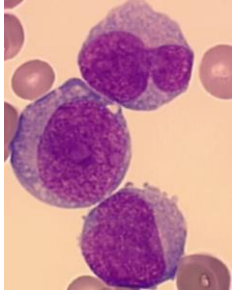
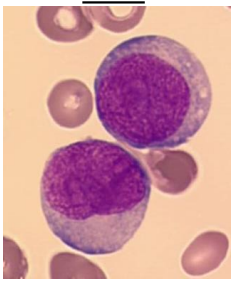
Snopce A.t.

M4



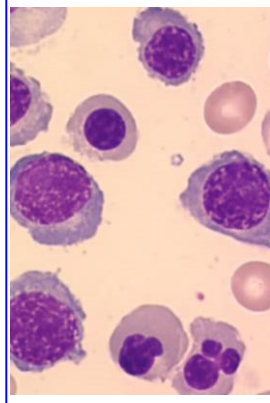
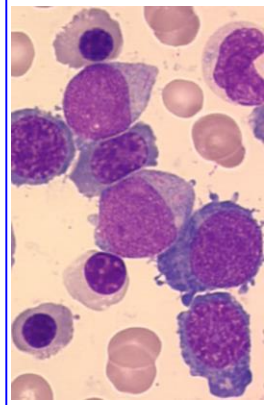
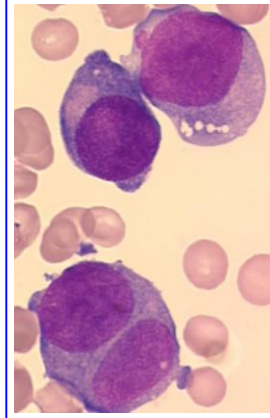
M5

M5A

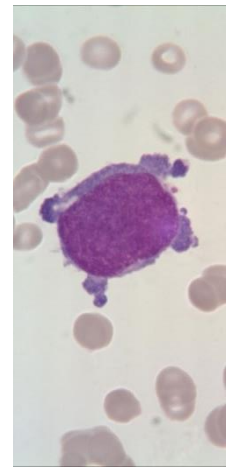
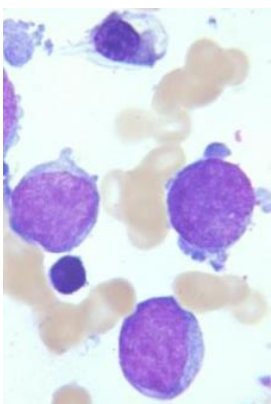
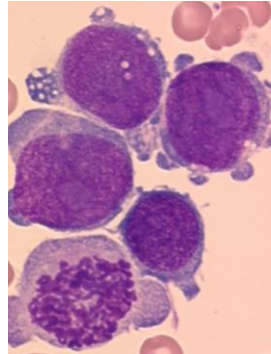


M5B

M6



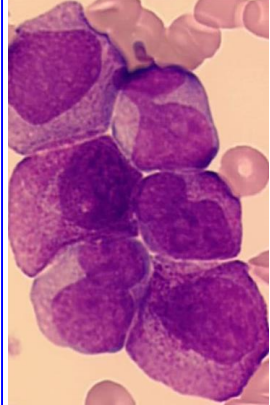
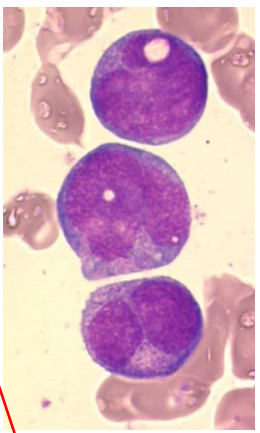
M7



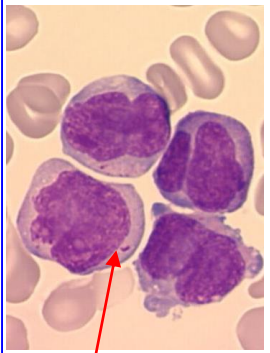
M1



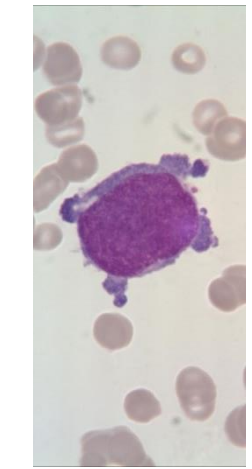
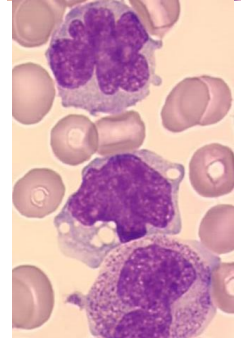
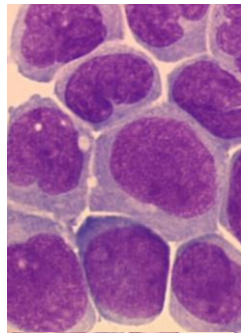
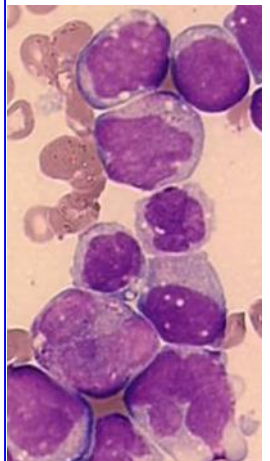
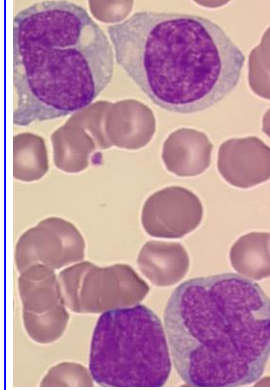
Auerova tyč



Variantní M3



Auerova tyč

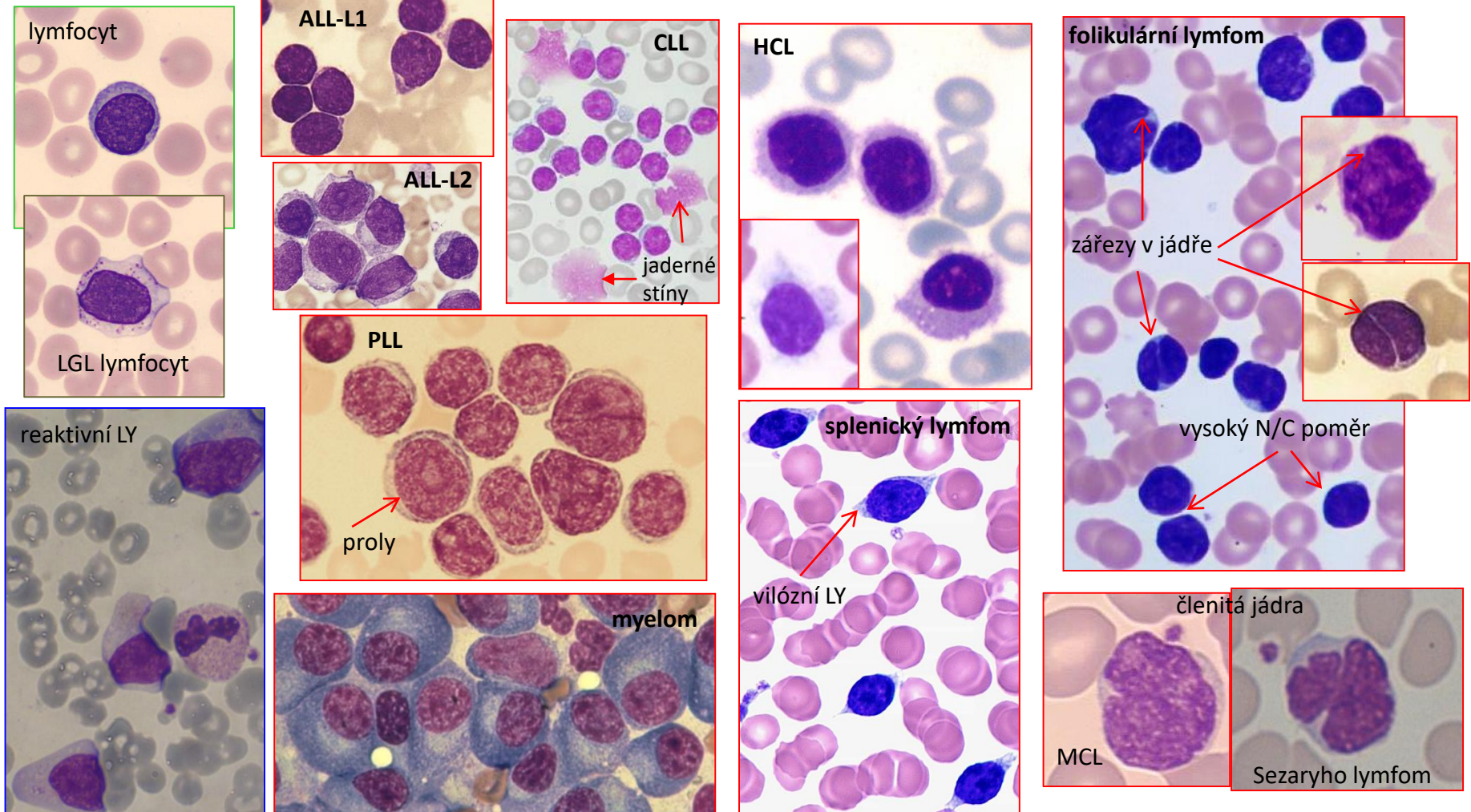


# Lymfoproliferativních onemocnění

## ➤ základní nálezy

- ✓ změny v počtu WBC ( $\uparrow \downarrow$  dle typu onemocnění až nad  $100 \times 10^9/l$  i přes  $500 \times 10^9/l$ , lymfocytóza)
- ✓ změny morfologie: reaktivní LY, atypické LY (atypie jádra a cytoplazmy, N/C poměr), mladší lymfocyty, holá jádra (jaderné/Gumprechtovy stíny)

## ➤ morfologické abnormality

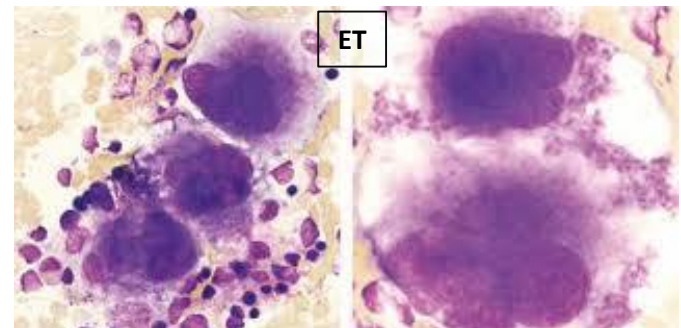
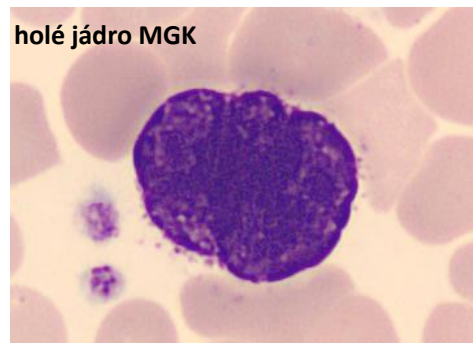
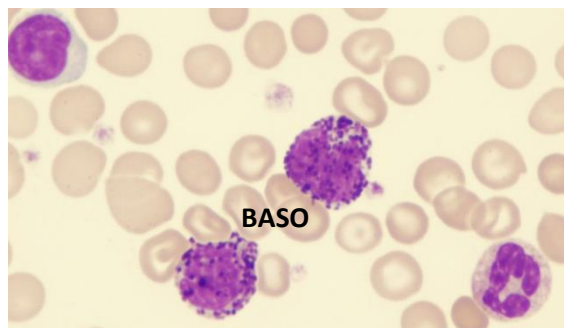
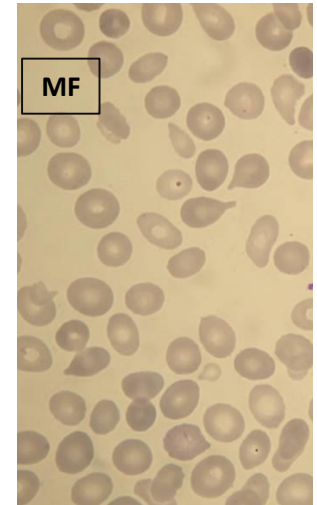
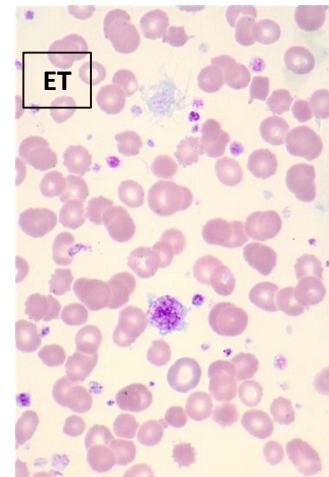
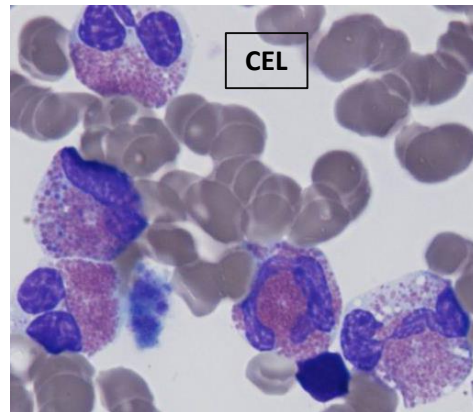
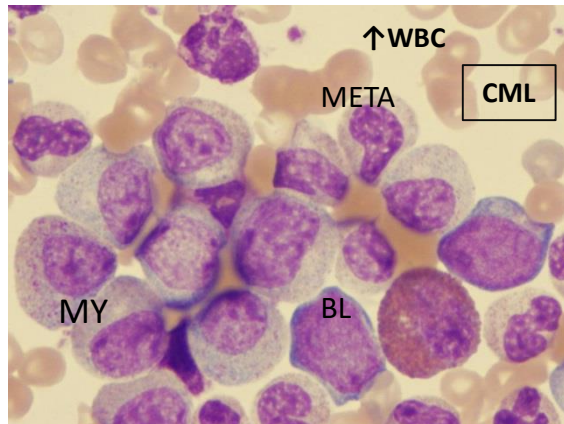


# Myeloproliferativních onemocnění

## ➤ 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

\* cytopenie

✓ erytrocyty:

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

✓ leukocyty:

*obvykle ↓WBC, ↓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 vyzrávání jádra a cytoplazmy, Auerovy tyče, pseudo-Chediakova-Higashiho granula*

✓ dysmegakaryopoéza:

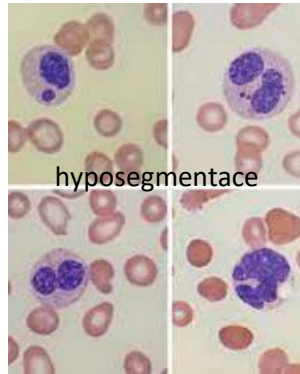
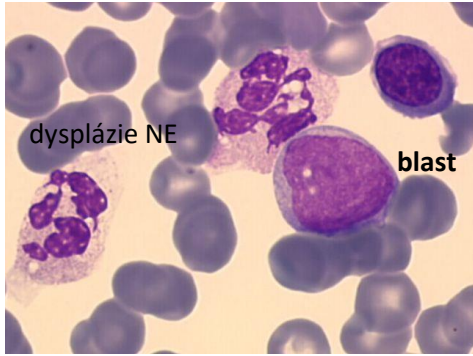
- *mikro/obrovské MGK, hypo/hyper - lobularizace MGK, vícejaderné MGK, vakuolizace, hypogranulace MGK*

---

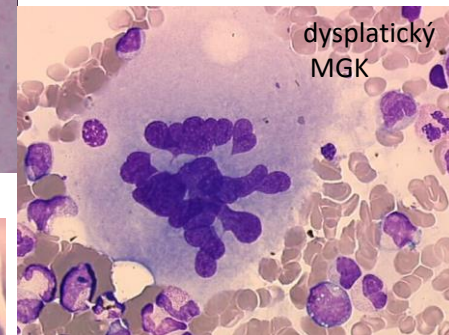
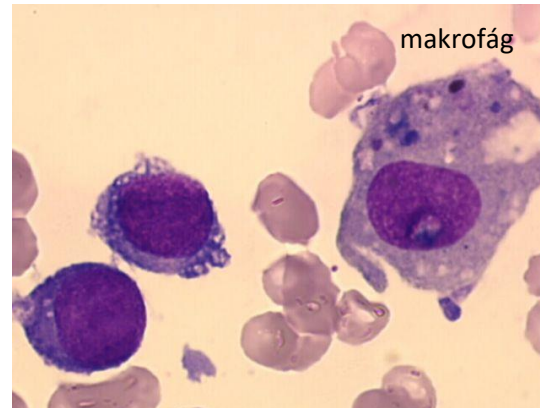
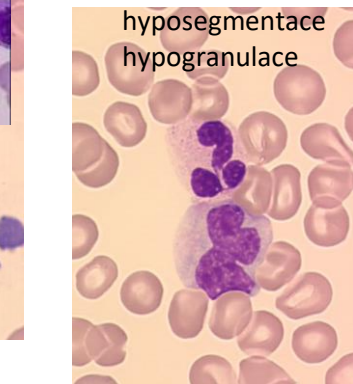
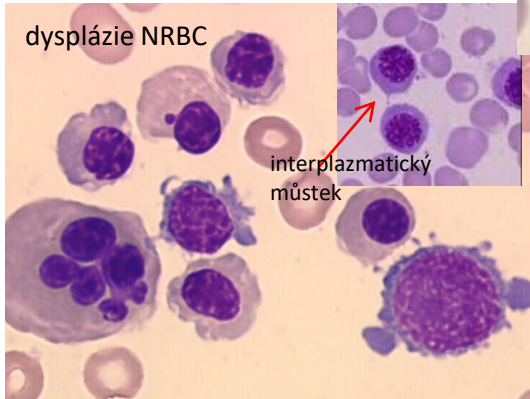
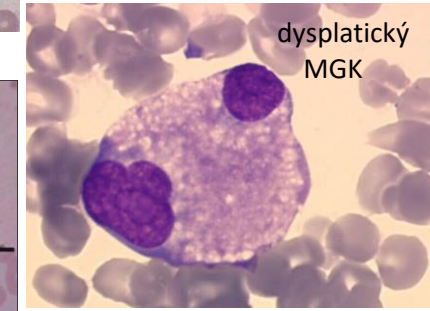
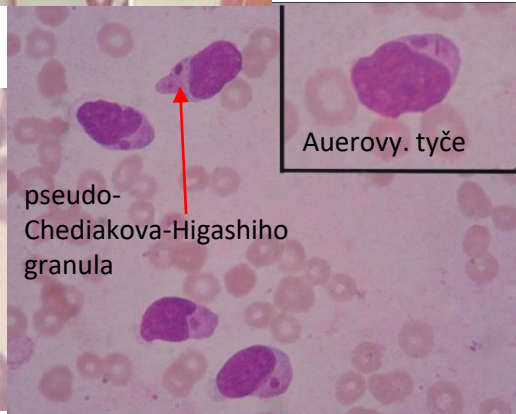
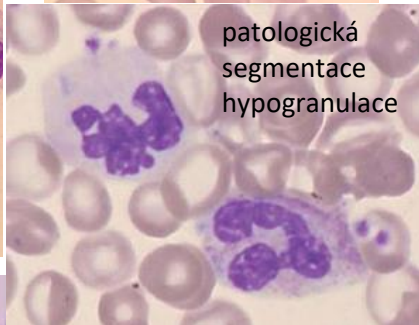
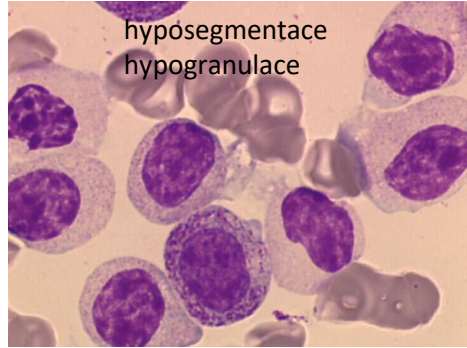
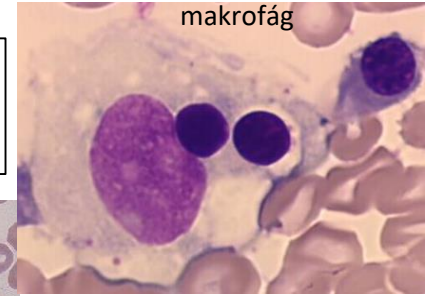
## ❖ Sledovat:

- *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 morfologických abnormalit u myelodysplastického syndromu

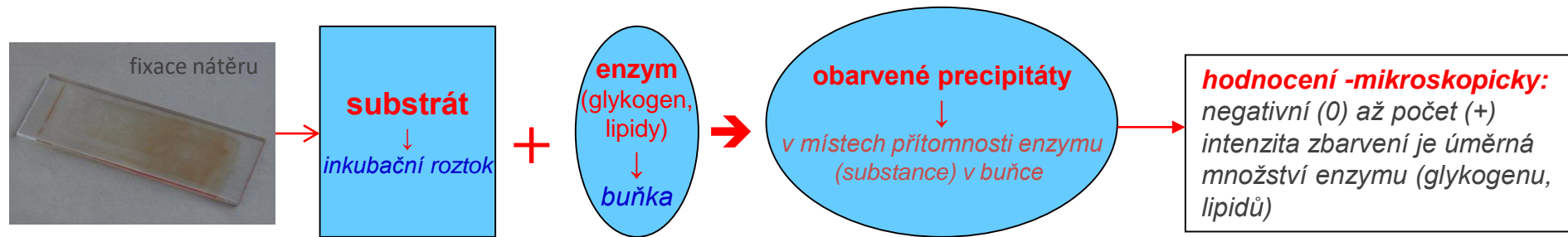


pseudo Pelger-Huetova anomálie





# Cytochemická vyšetření



## Cytochemická barvení:

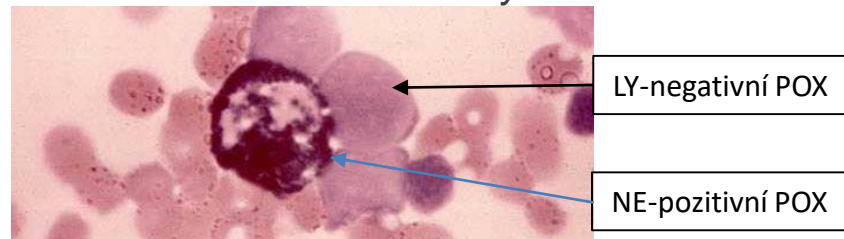
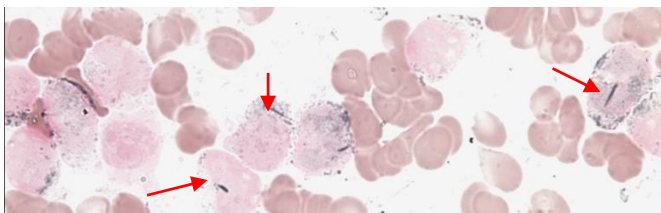
- *Myeloperoxidáza*
- *Lipidy (sudanovou černí B)*
- *Chloracetát esteráza*
- *Periodic Acid – Schiff* (průkaz vysokomolekulárních sacharidů – glykogenu)
- *Nespecifická esteráza (s blokádou fluoridem sodným)*
- *Kyselá fosfatáza (s rezistencí na kyselinu L-vinnou)*

*Poznámka: vždy provádět kontrolní cytochemická barvení*

# Cytochemická vyšetření

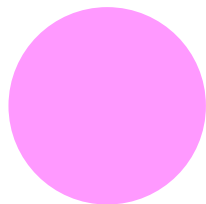
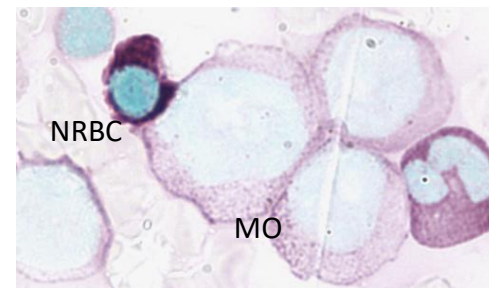
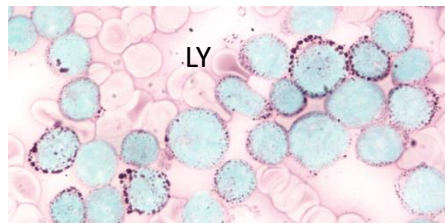
## ➤ myeloperoxidáza

- ✓ hodnocení: myeloidní buňky (-/+++ a Auerovy tyče), monocytární buňky (-/+)  
lymfocyty jsou vždy negativní
- ✓ klinický význam: rozlišení myeloblastické nebo monoblastické leukémie od lymfoblastické

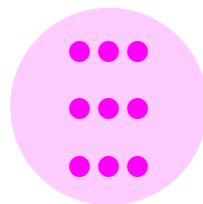


## ➤ PAS

- ✓ hodnocení: -/+ a **typ pozitivity** (difúzní, jemně nebo hrubě pozitivní granula)
  - fyziologická: myel.buňky (**difúzní**), monocytární buňky (**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



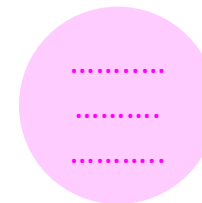
difúzní



výrazná granulace



hrubozrná pozitivita

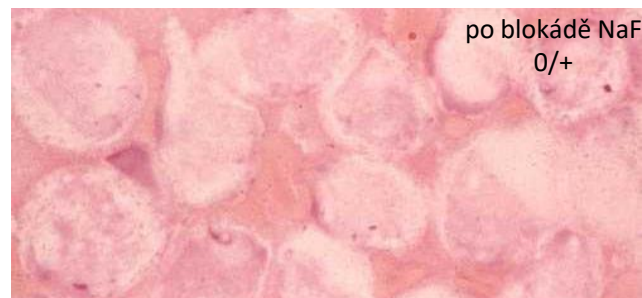
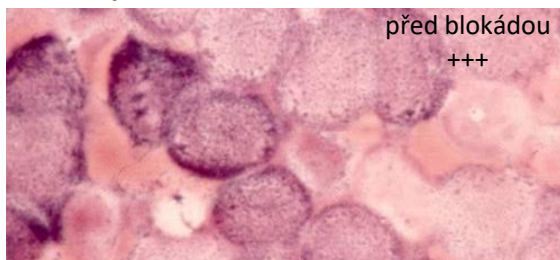


jemně granulární

# Cytochemická vyšetření

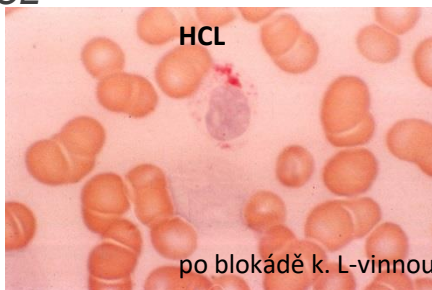
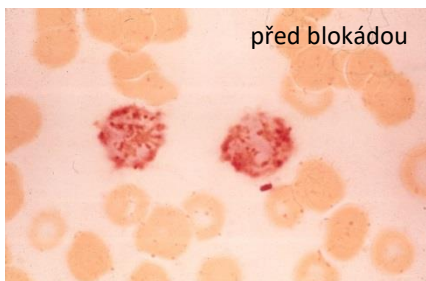
## ➤ nespecifická esteráza s blokádou fluoridem sodným

- ✓ 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



# Cytochemické reakce

	MPOX	NE	NE+NaF	PAS <i>(typ pozitivita)</i>
myeloid. b.	<b>-/+++</b>	-/+	-/+	-/+
monocyt. b.	-/+	<b>+/+++</b>	<b>-/+</b>	-/+
erytrocyt. b.	-	-/+	-/+	-/+
lymfoc. b.	-	-/+	-/+	-/+
MGK b.	-	-/+	-/+	-/+