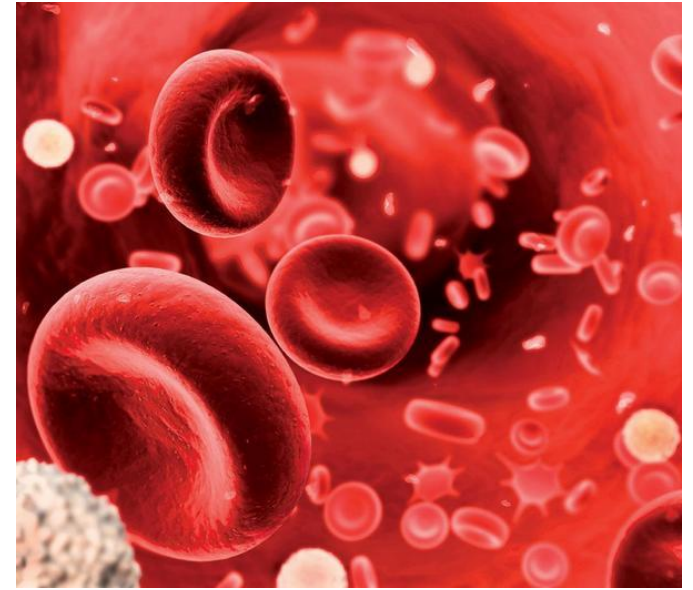


# ANÉMIE

---



Vytisková Soňa

# Vznik anemie

Anemie je stav, kdy hodnota Hb, případně Hct (nikoliv však erytrocytů) je nižší než dolní hranice fyziologické hodnoty s ohledem na věk, pohlaví a nadmořskou výšku, v níž jedinec žije.

Pozn. světová zdravotnická organizace – definice anémie: snížení Hb v krvi < 130 g/l u mužů < 120 g/l u žen  
Jsou tu i rasové rozdíly, u jedinců černé rasy jsou hodnoty Hb a Hct nižší než u jedinců bílé rasy.

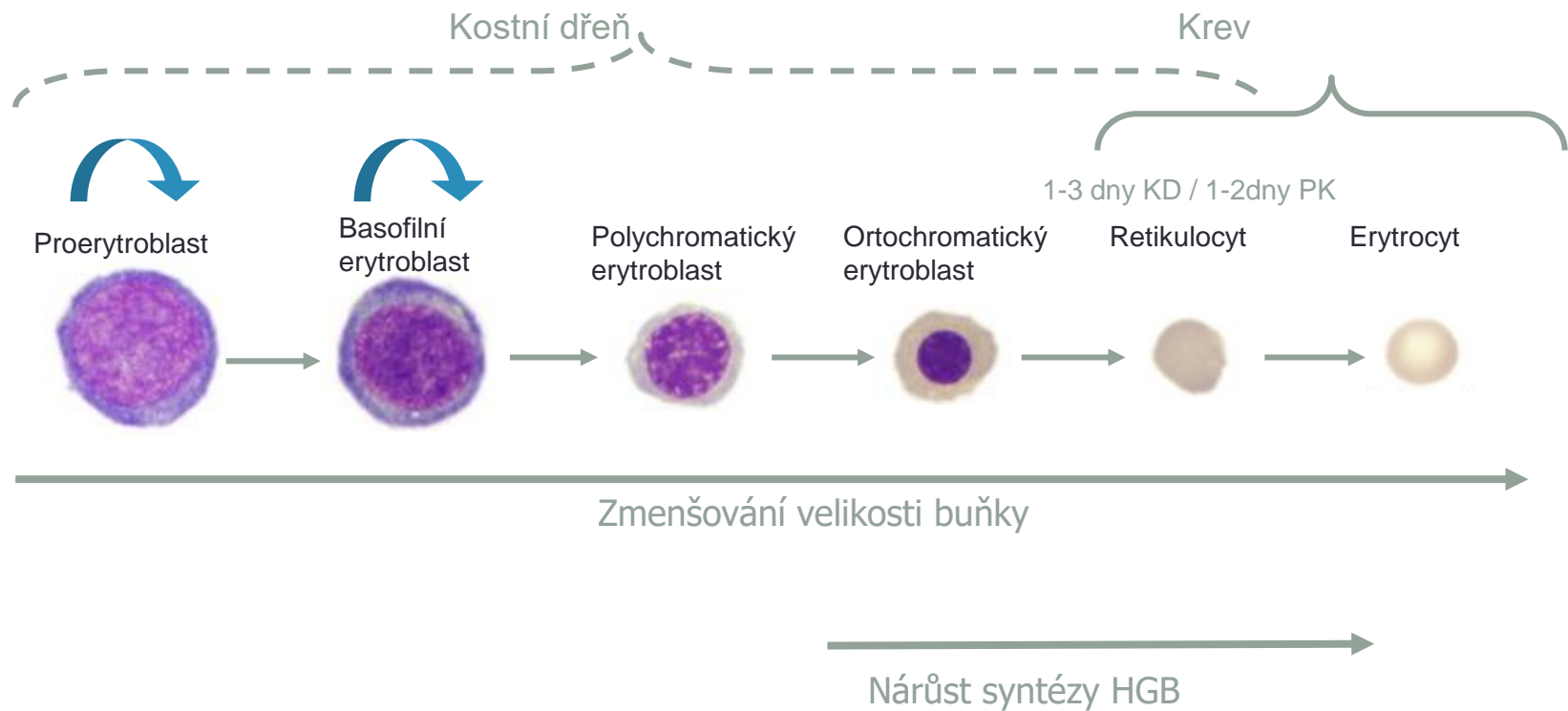
- Normálně na pokles hladiny kyslíku v organismu reagují ledviny zvýšenou produkcí hormonu erytropoetinu (*EPO*).
- *EPO* se přenáší krví do kostní dřeně, kde je vydán signál ke zvýšené produkci ERY a stav se kompenzuje.
- V určitých případech, zejména u nádorových onemocnění nebo u chronických zánětlivých procesů je ale tento proces nedostačující a vzniká *anemie*.

## *Sledování vyšetření*

Sledovat:

- hloubku anémie v KO
- morfologické změny erytrocytů v periferní krvi (barevné, tvarové, inkluze)
- morfologické a množstevní změny erytrocytární populace v KD

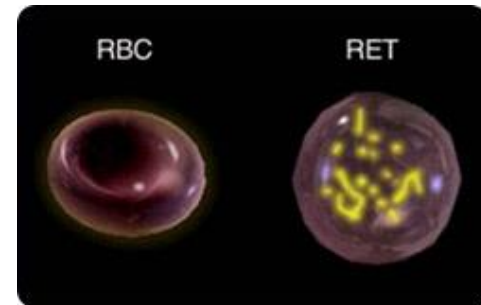
# Erytropoeza



Retikulocyt obsahuje zbytky organel obsahující RNA (ribozomy, zbytky endoplazmatického retikula).

# Erytrocyty a retikulocyty

- Vzhledem k tomu, že normální doba života RBC je 120 dní, zhruba 1/120 (~1%) nových RBC musí být denně doplněno do periferní krve, aby byl zachován jejich konstantní počet.
- Erytrocyty** jsou „dlouhověké“ a mohou nám vypovídat o erythropoetické aktivitě během několika posledních měsíců.
  - Erytrocyty již neprodukuje nový hemoglobin.



Comparison of a human RBC and Retic showing RNA

- Naproti tomu **retikulocyty** jsou „krátkověké“ a mohou nám proto poskytnout informace o aktuální erythropoetické aktivitě.
  - Retikulocyty stále produkují Hgb.

# Vyšetření retikulocytů - počet

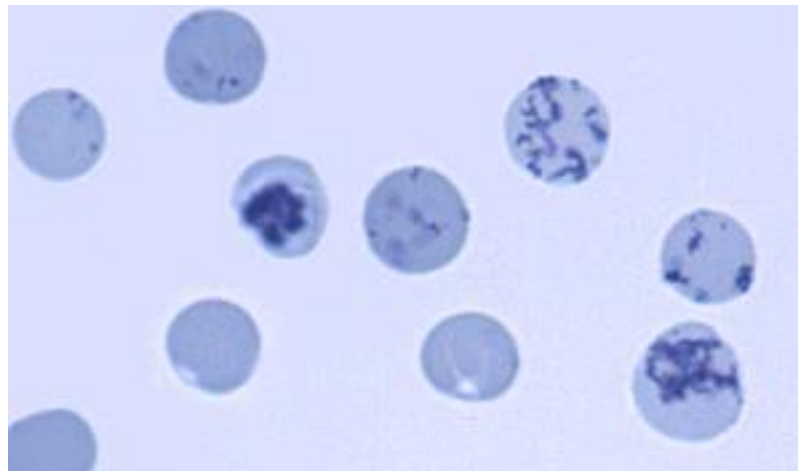
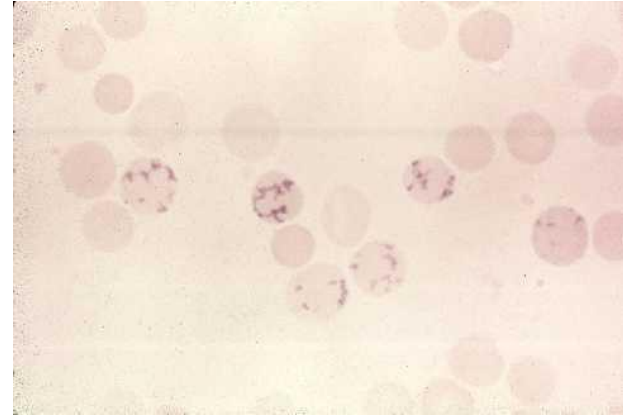
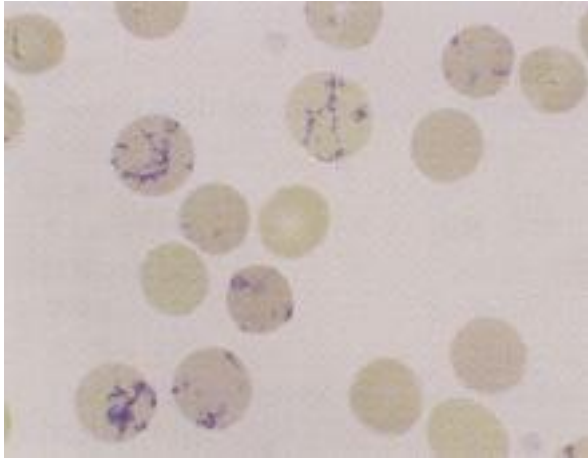
Barvení RNA v erythrocytech:

- mikroskopicky
  - supravitální barvení (*bez fixace preparátu*)
- analyzátozem
  - analýza prošlého světla
  - analýza fluorescence
  - **počet** (=kvantita) + nejvyšší třída analyzátorů **hemoglobinizace retikulocytů** (=kvalita)

# Mikroskopické vyšetření retikulocytů

- V retikulocytech se barví supravitálně brilliantcresylovou modří zbytky RNA (barví se tzv. substantia granulofilametosa)
- Pozitivita se hodnotí v 1000 erythrocytech
  - normální hodnoty: 0,5 – 2,5 %

# Retikulocyty





# Vyšetření retikulocytů na analyzátoru

- analýza prošlého světla  
probíhá v retikulocytech na precipitovaných, obervených síťových strukturách RNA
- fluorescenční analýza  
měření RNA v retikulocytech obarvených fluorescenčními barvami (*měření fluorescence*)
- cytochemická analýza (Advia, Beckman Coulter):
- *Normální hodnoty:*
  - *Počet :*            0,5 – 2,5 %  
                          25 – 100 x 10<sup>9</sup>/L
  - *RET-He:*        28 -35 pg            *hodnoty nižší než 28 pg se považují za projev funkčního nedostatku železa*
- Dle množství zbytkové RNA rozeznáváme zralé a nezralé retikulocyty (**IRF**).

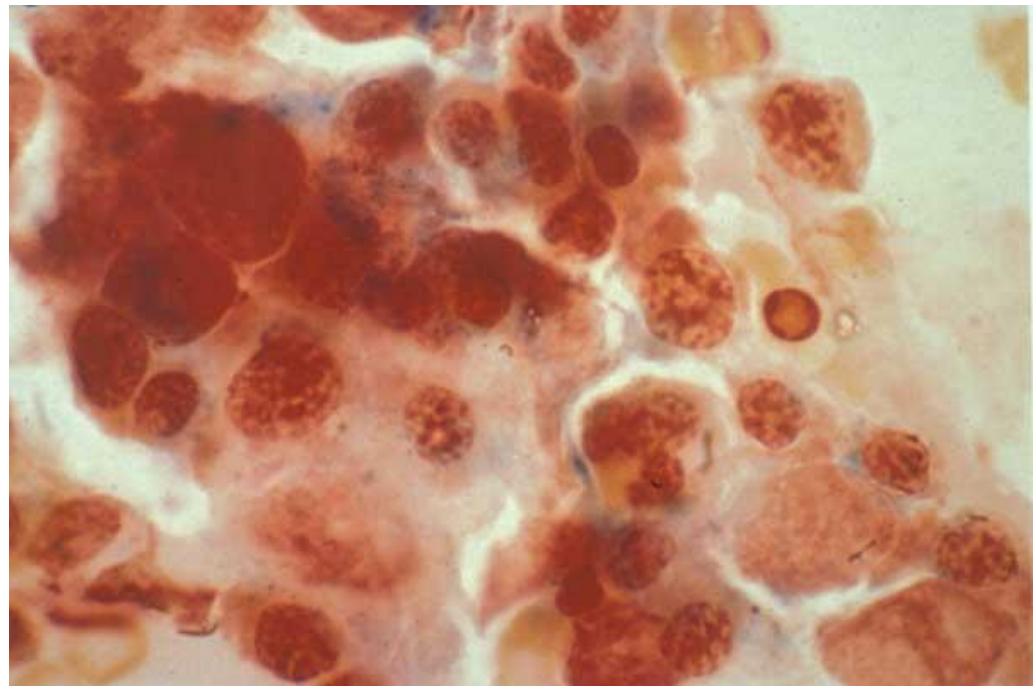
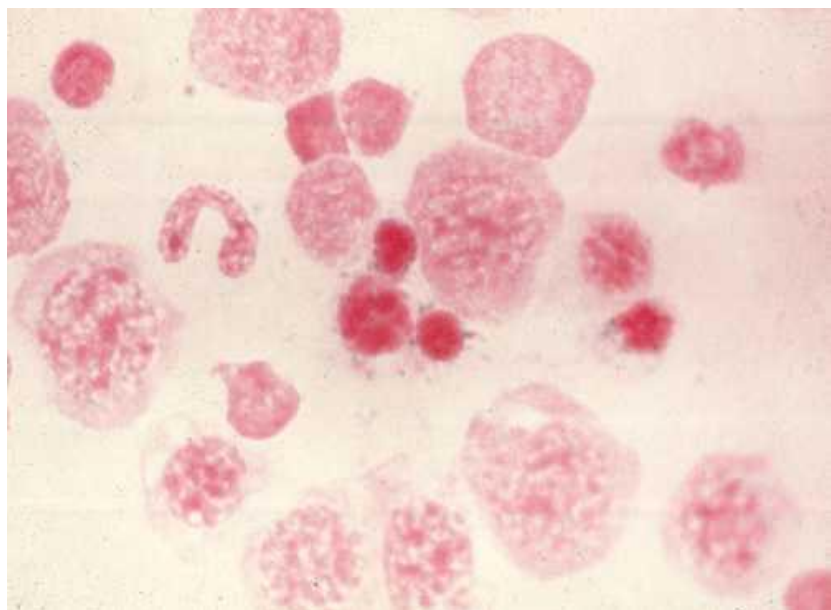
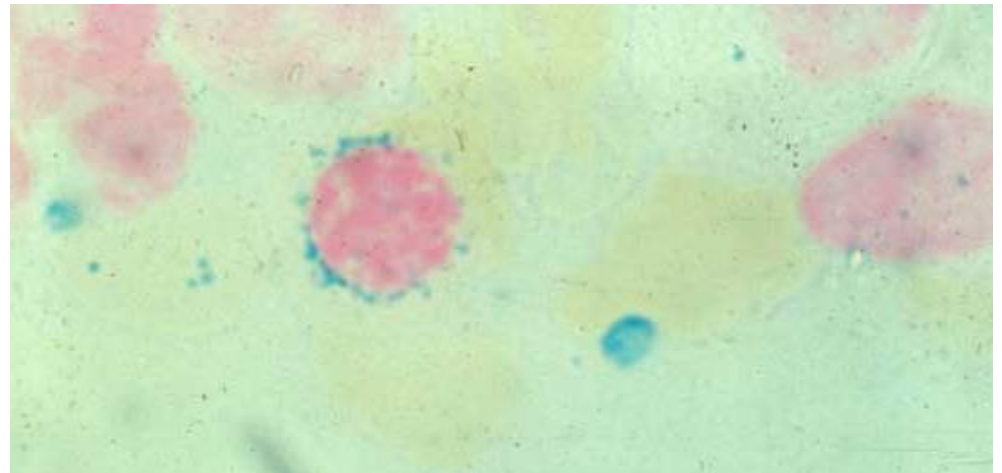
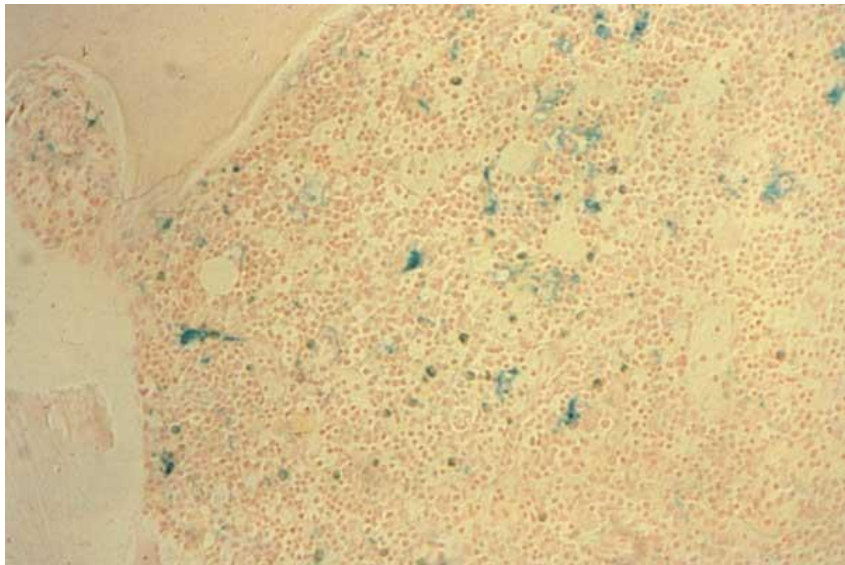
# Cytochemické vyšetření zásobního Fe - I

- Zásobní (*nehemové*) železo ve formě  $\text{Fe}^{3+}$ 
  - v erytrocytech
  - NRBC
  - makrofázích
- Princip:  
 $\text{Fe}^{3+}$  tvoří s ferrokyanidem draselným a kyselinou chlorovodíkovou barevný komplex – berlínskou modř.

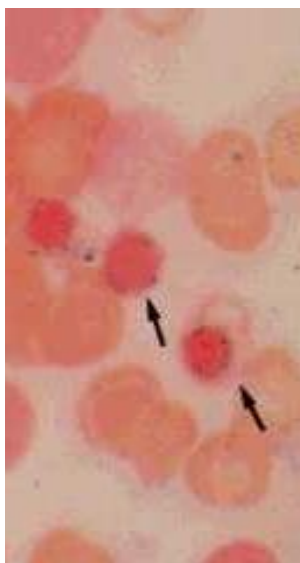
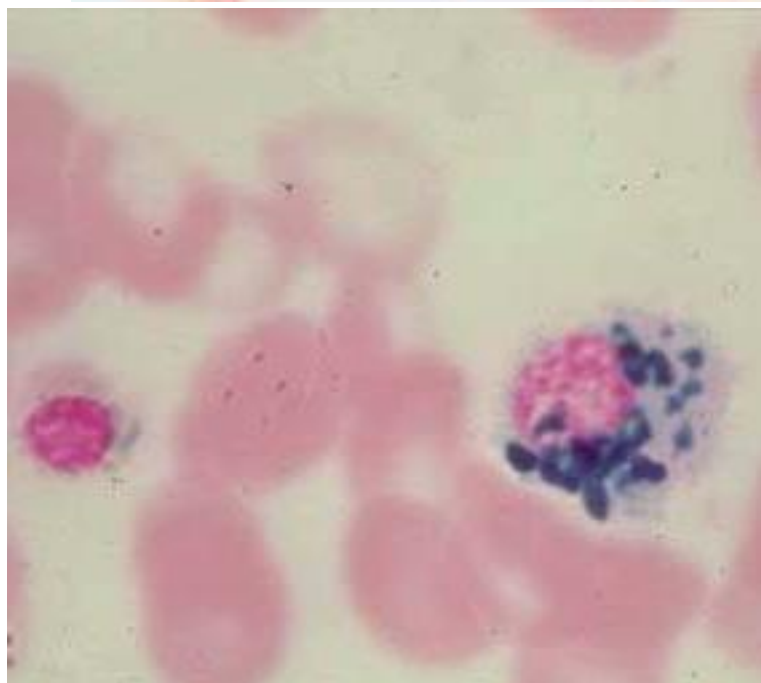
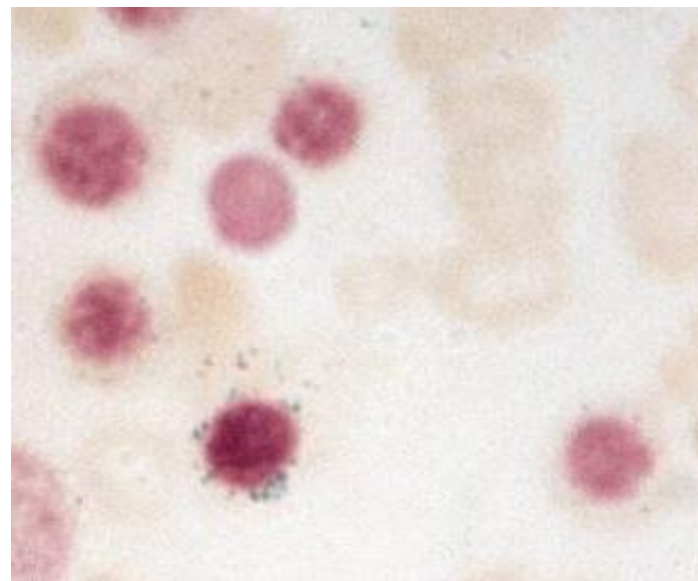
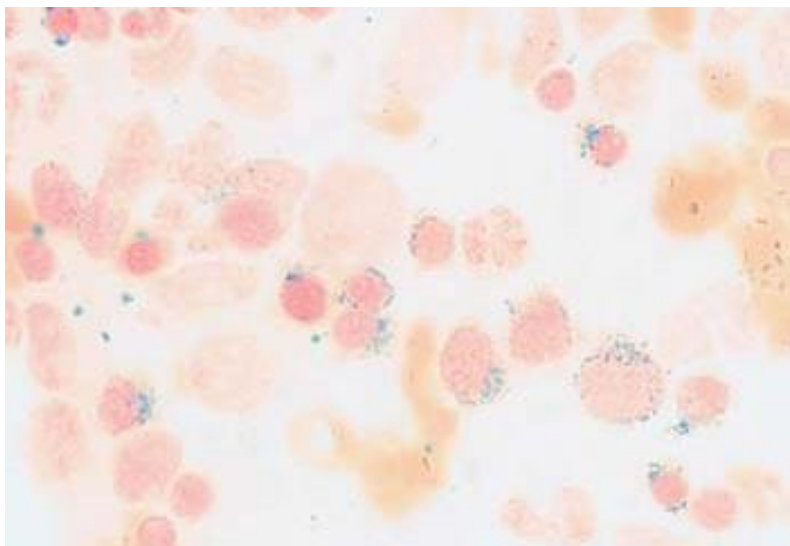
# Cytochemické vyšetření zásobního Fe - II

- Hodnocení:  
zelenomodrá granula
  - v erythrocytech (siderocyty)
  - v NRBC (sideroblasty)
    - zrnka v NRBC okolo  $\frac{2}{3}$  jádra (prstenčité sideroblasty)
  - v makrofázích (siderofágy)
- Normální hodnoty:  
20 – 60 % pozitivních NRBC  
2 - 4 siderofágy ze 6 nalezených makrofágů
- Klinický význam:  
anémie
  - *např.:* sideropenické (nízké hodnoty)
  - sideroblastické (přítomné prstenčité sideroblasty, zvýšené zásobní Fe)
  - hemolytické anémie (vysoké hodnoty)
  - refrakterní anémie (vysoké hodnoty)

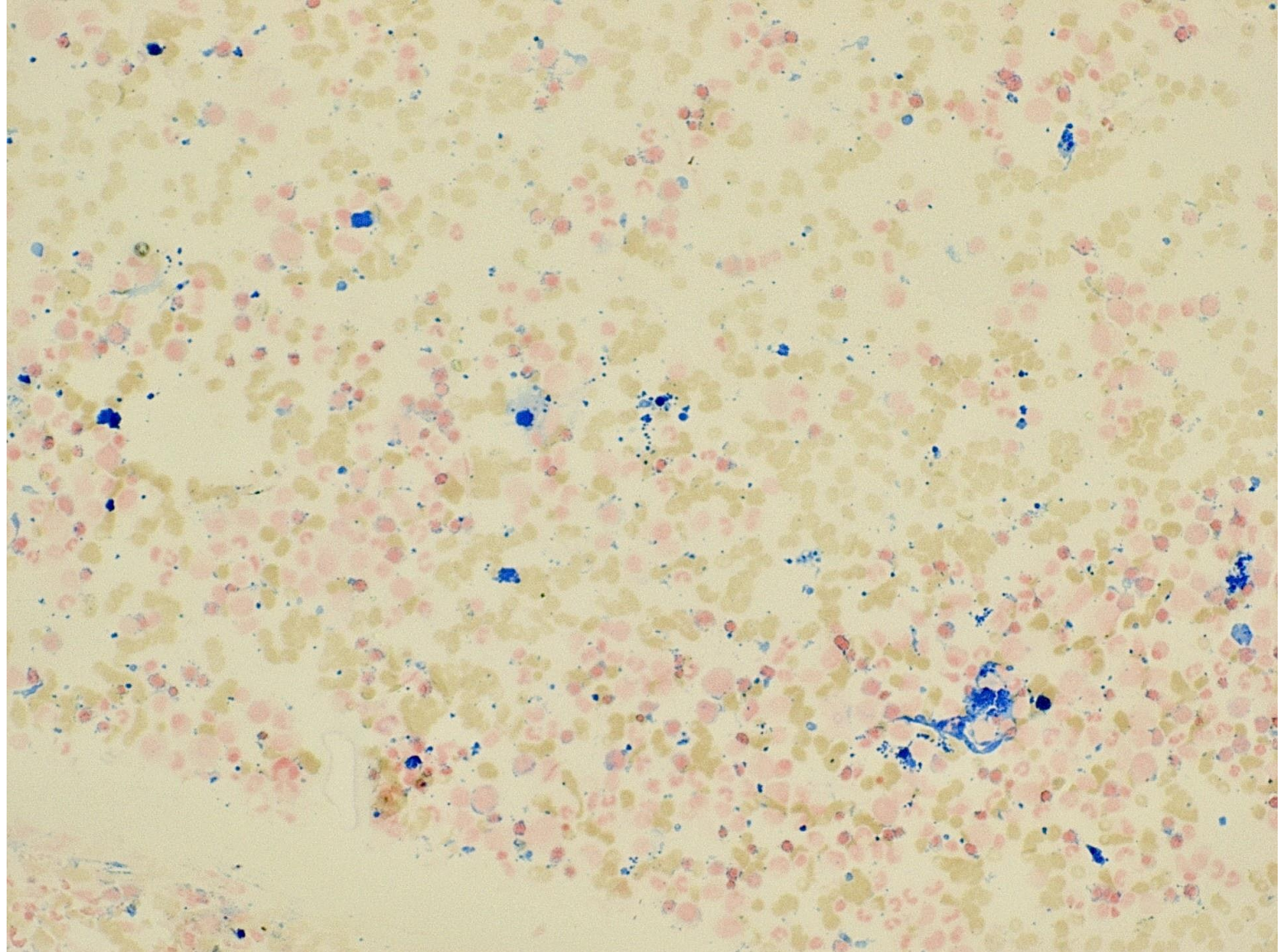
# Barvení Fe<sup>3+</sup>



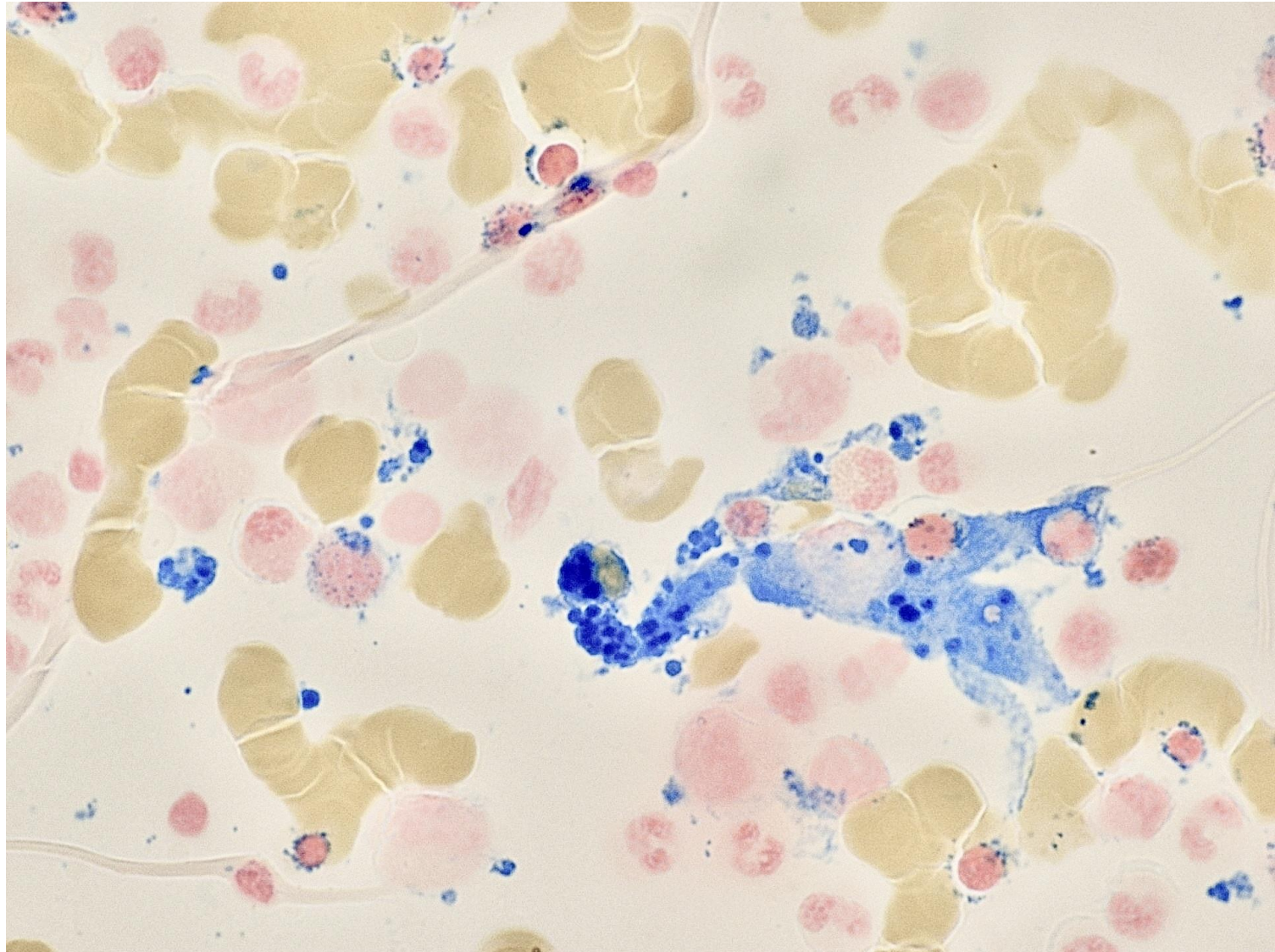
# Barvení Fe<sup>3+</sup>



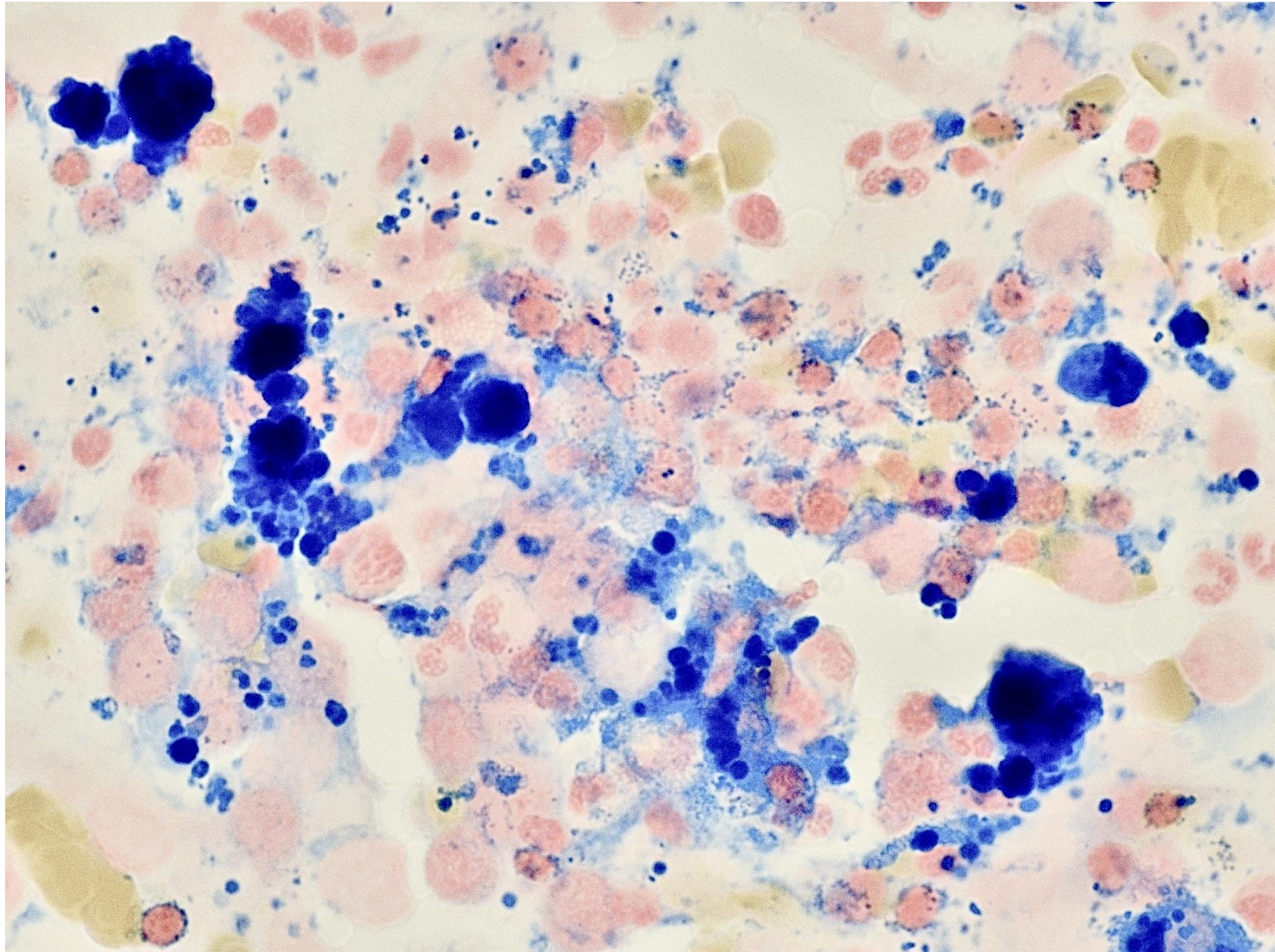
# Barvení Fe<sup>3+</sup> (MDS)



# Barvení $\text{Fe}^{3+}$ (MDS)

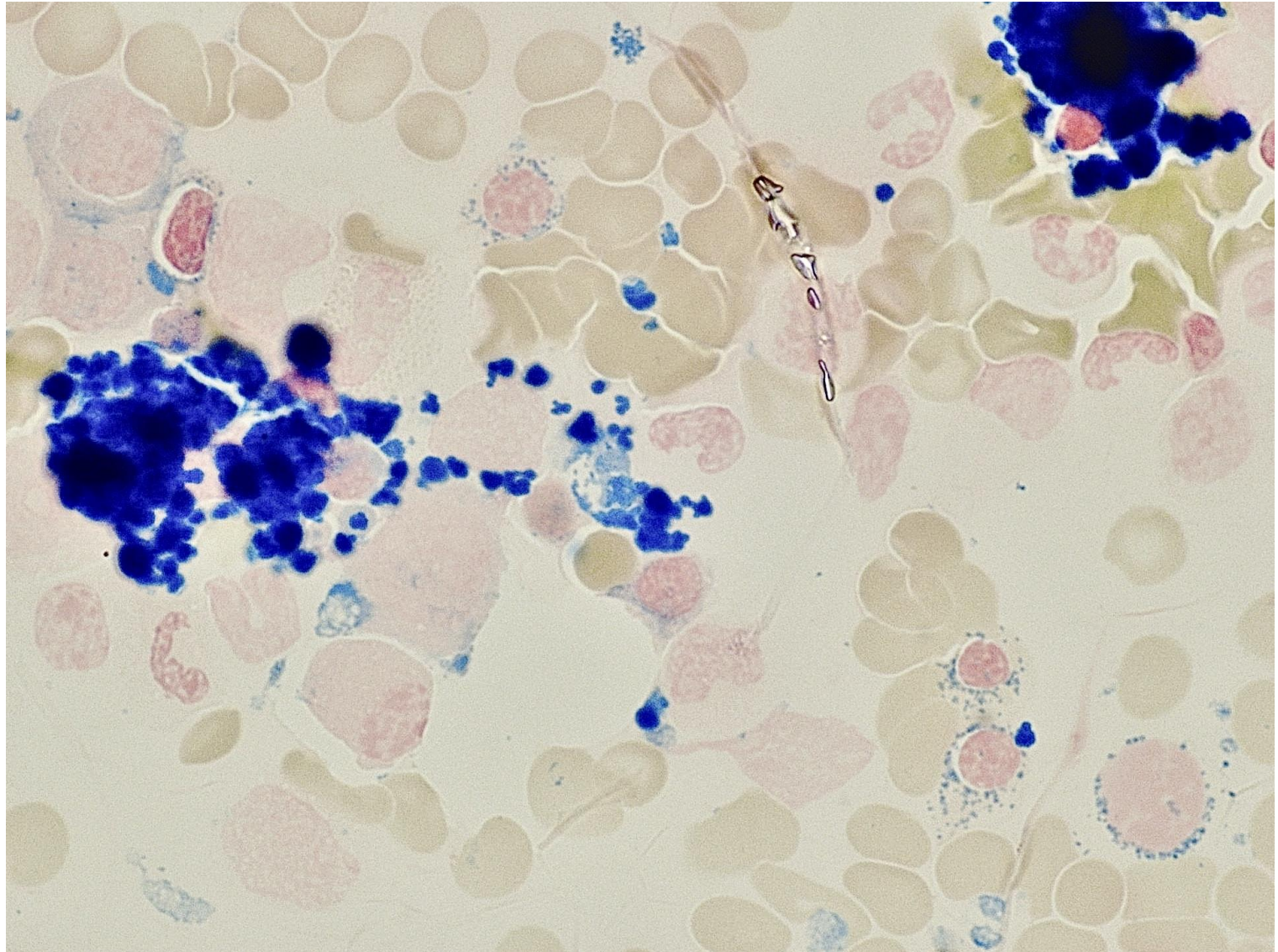


# Barvení $\text{Fe}^{3+}$ (MDS)

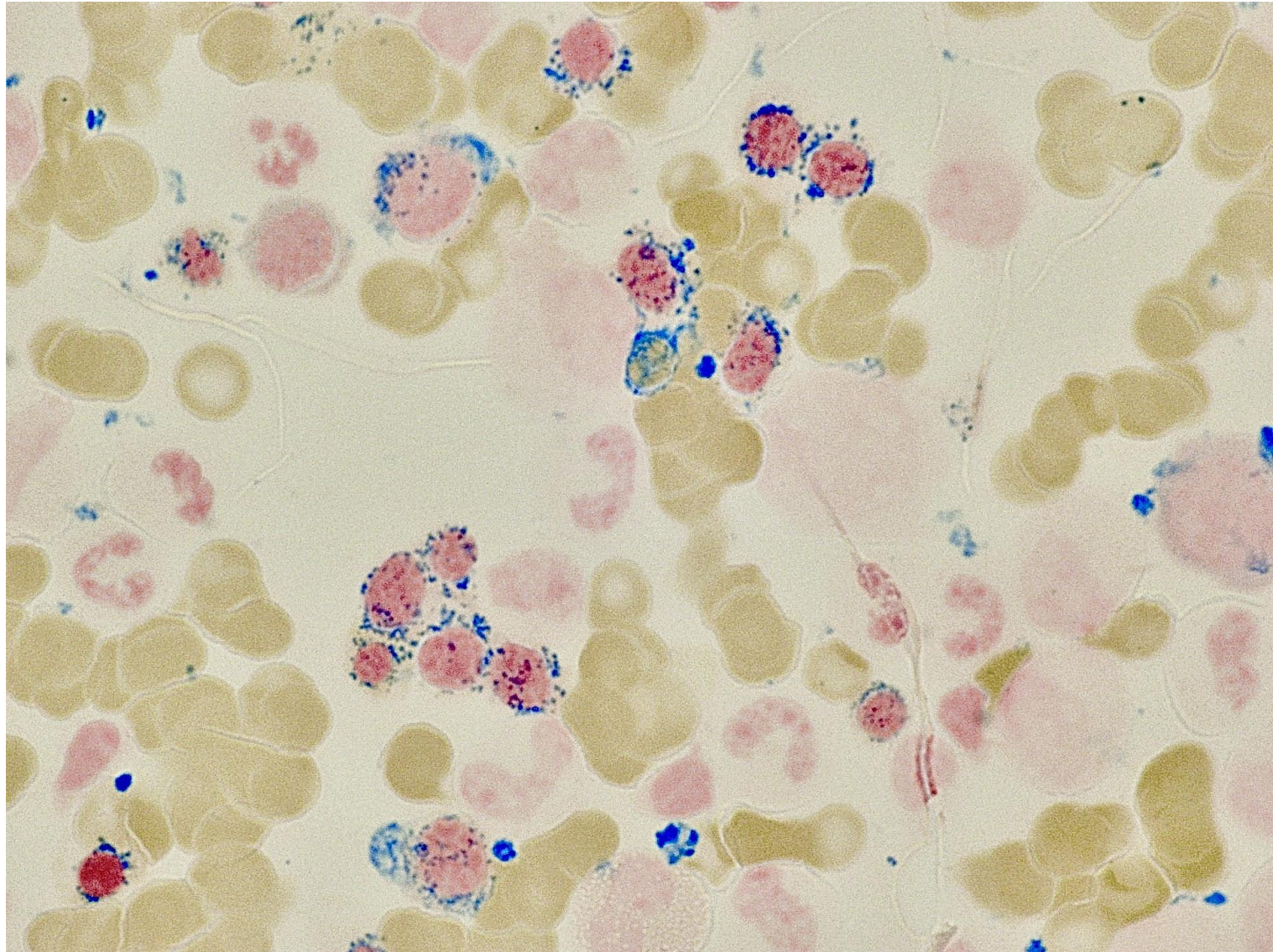




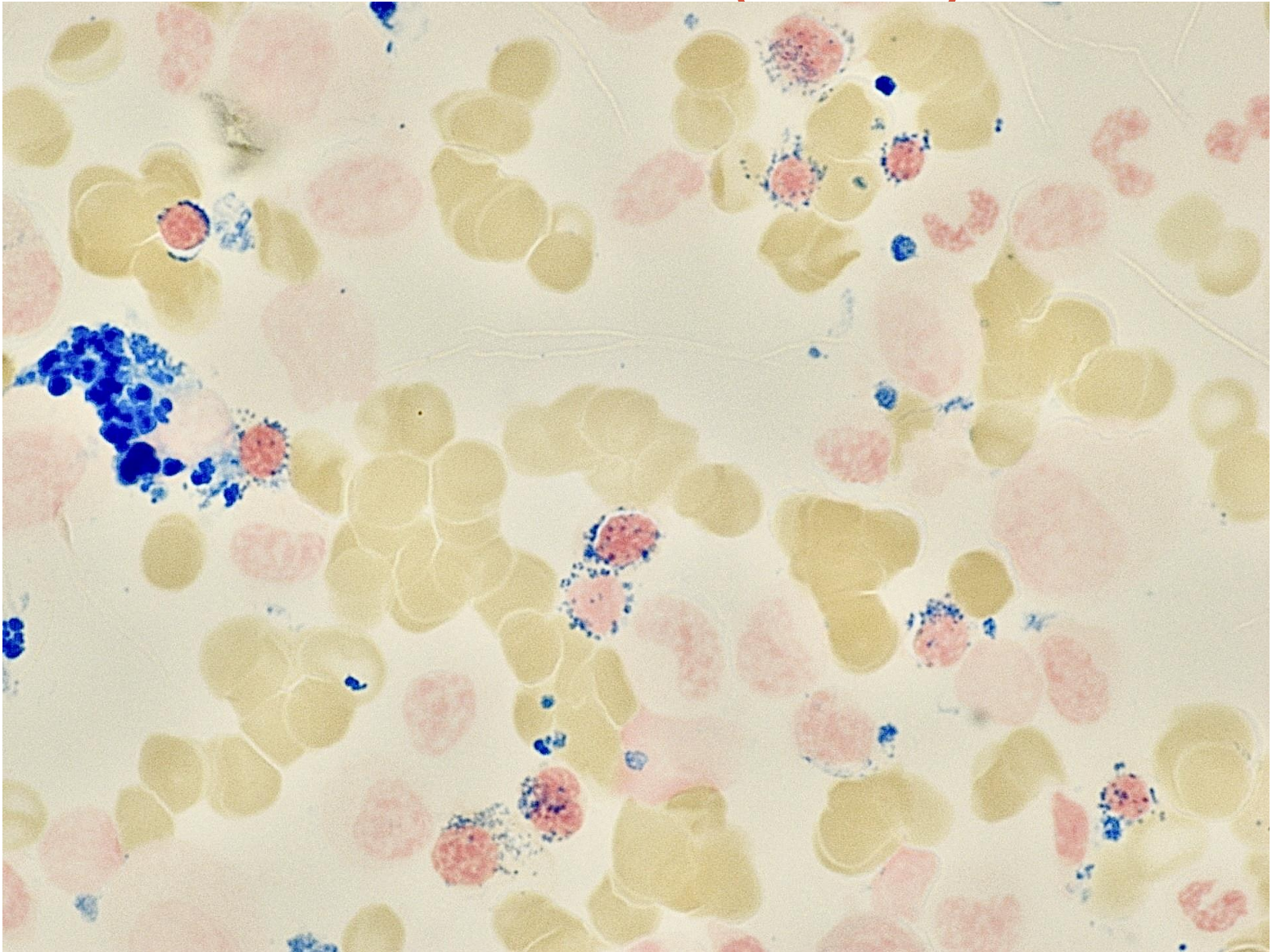
# Barvení $\text{Fe}^{3+}$ (MDS)



# Barvení $\text{Fe}^{3+}$ (MDS)



# Barvení $\text{Fe}^{3+}$ (MDS)

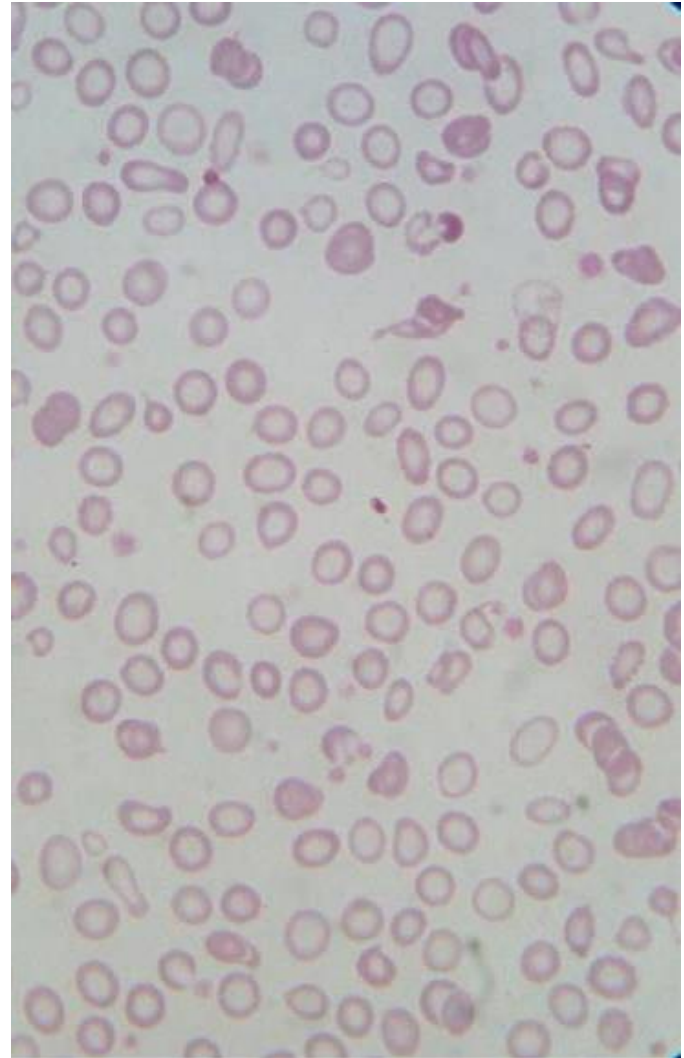
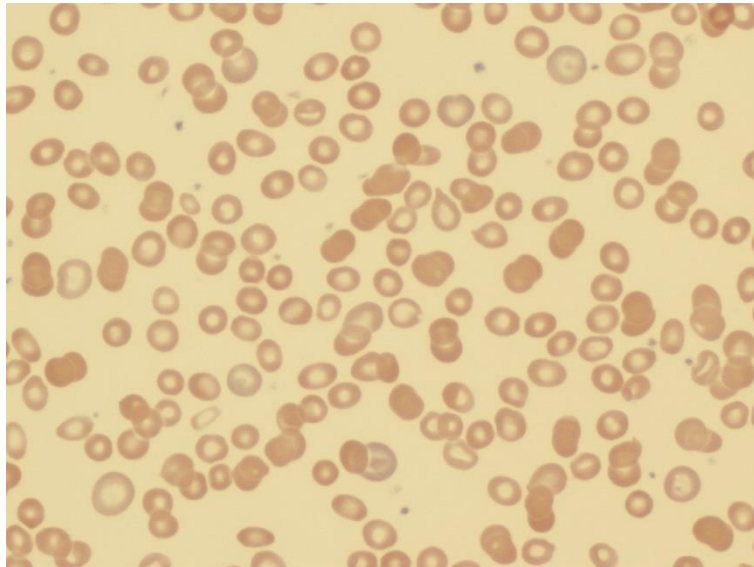
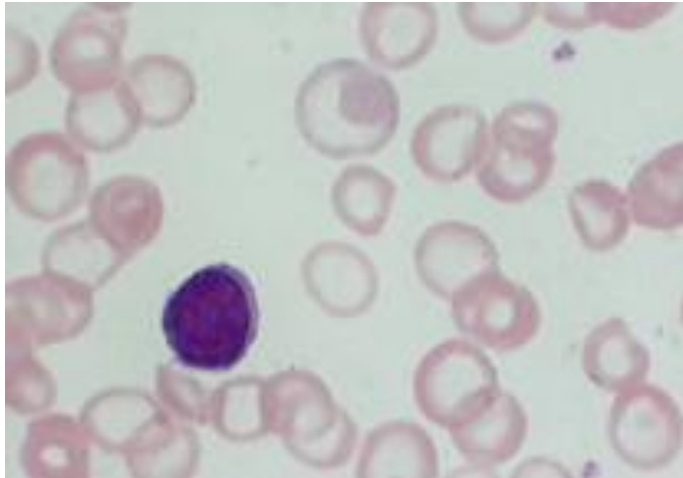


## *Porucha syntézy hemu*

### Sideropenická anémie (nedostatek železa)

- KO: pokles HGB, MCV, vyšší RDW
- nátěr PK: hypochromní mikrocyty, anulocyty, poikilocyty, bazofilní tečkování
- nátěr KD: vyšší erythropoéza, NRBC - opožděné vyzrání cytoplazmy, vyšetřování zásobního Fe (hodnoty snížené nebo nulové)

# Sideropenická anémie

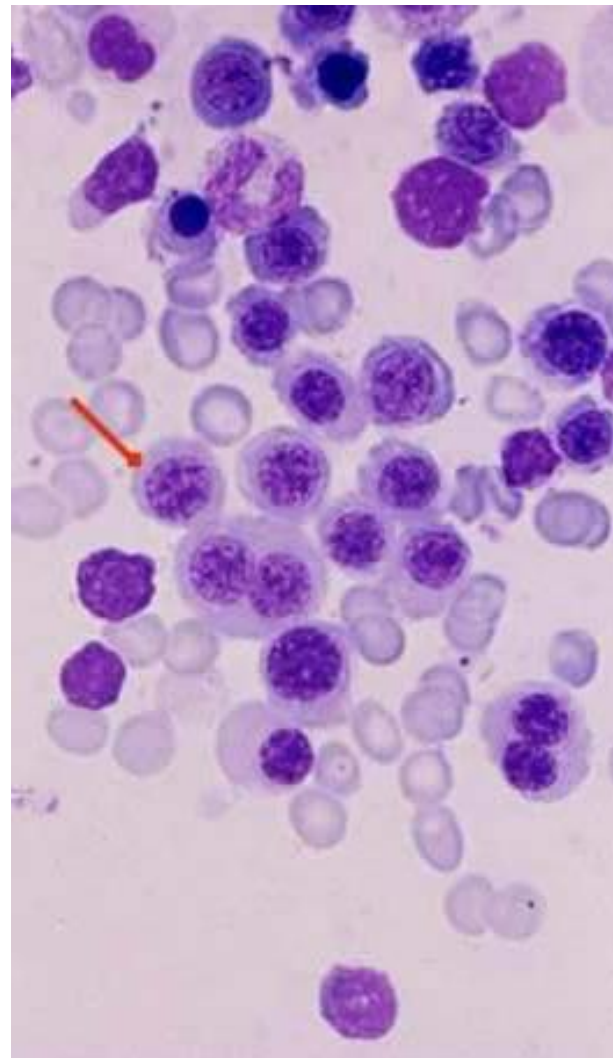
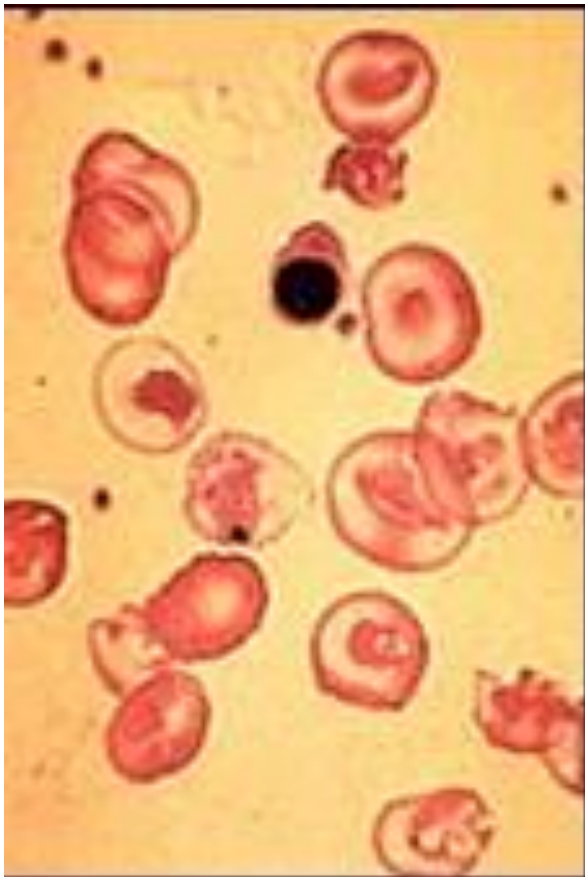


# *Porucha syntézy globinu*

## Thalasemie

- KO: nižší nebo normál. RBC, nižší nebo normál. HGB, výrazně snížené MCV, vyšší RDW, lehce vyšší WBC, lehce vyšší PLT
- nátěr PK: mikrocytóza, hypochromie, terčovité ery, polychromázie, bazofilní tečkování, H.J.tělíska, bazofilní tečkování, NRBC, mladší formy WBC
- nátěr KD: hyperplazie erytropoézy, vyšetření zásobního Fe (hodnoty zvýšené)

# Thalassemie

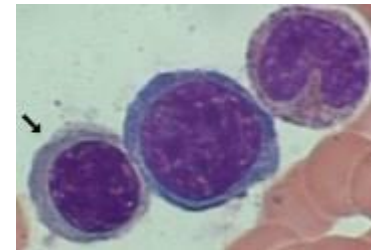
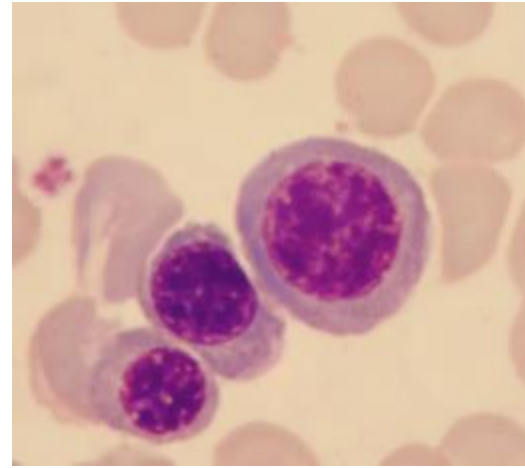
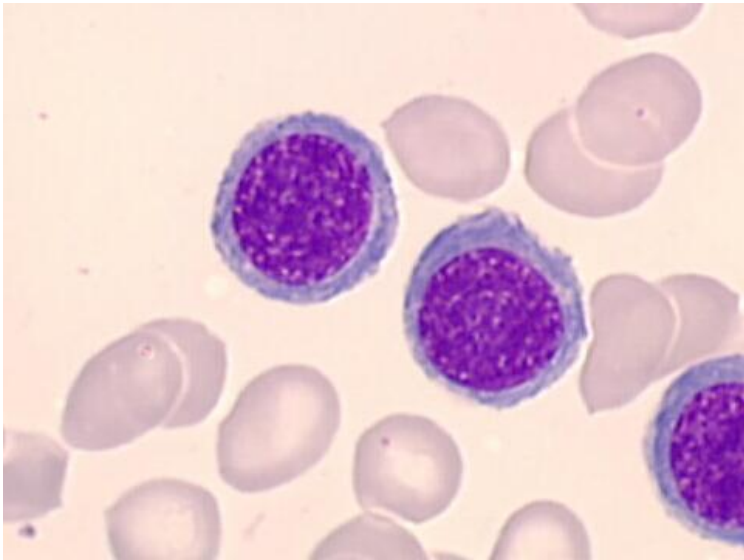


# *Porucha syntézy DNA*

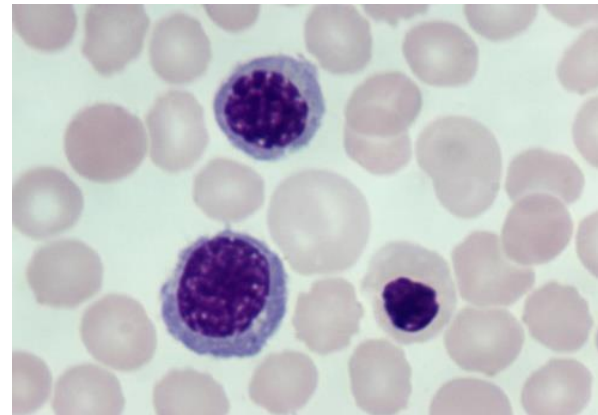
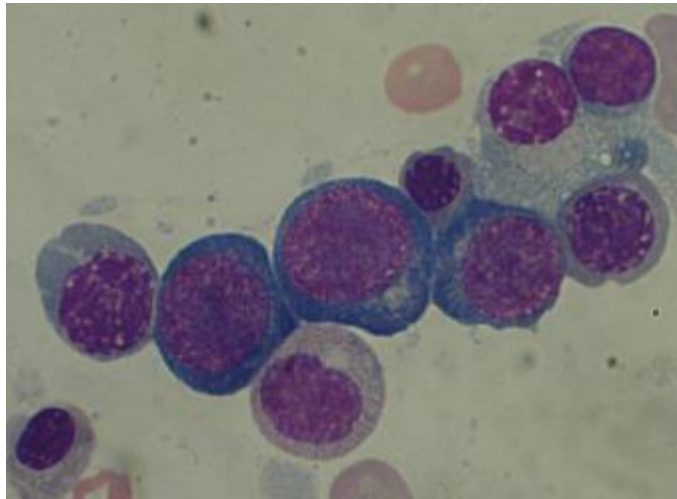
## Megaloblastové anémie

- KO: MCV >100fl, HGB až pod 50g/L, vyšší RDW, snížení WBC, NE, PLT
- nátěr PK: makroovalocytóza, poikilocytóza, Cabotovy prstence, bazofilní tečkování, H.J. tělíška, NRBC, NE - hypersegmentace, větší buňky, větší laločnatost jader i u monocytů, velké až gigantické PLT
- nátěr KD: buněčně bohatá, erythropoéza zmnožená, posun k mladším formám, (megaloblastová přestavba ve všech vývojových řadách), velké tyče, metamyelocyty, hypersegmentace MGK, vyšetření zásobního Fe (hodnoty zvýšené)

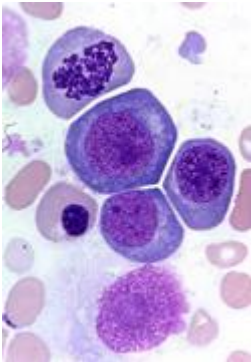
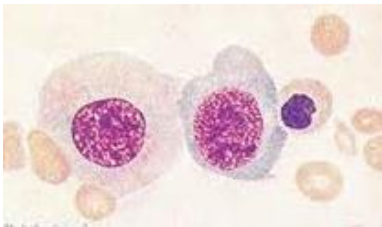
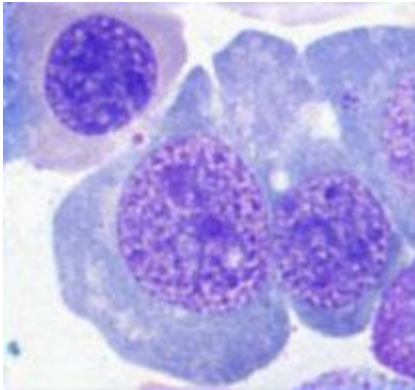
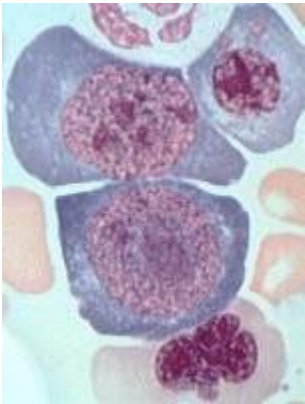
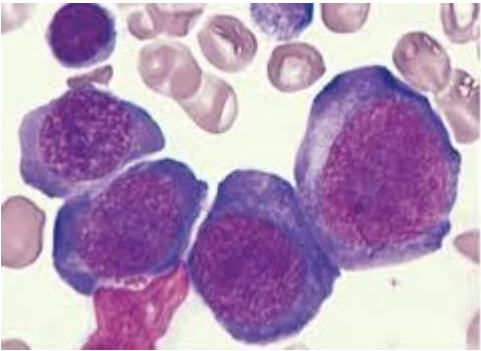




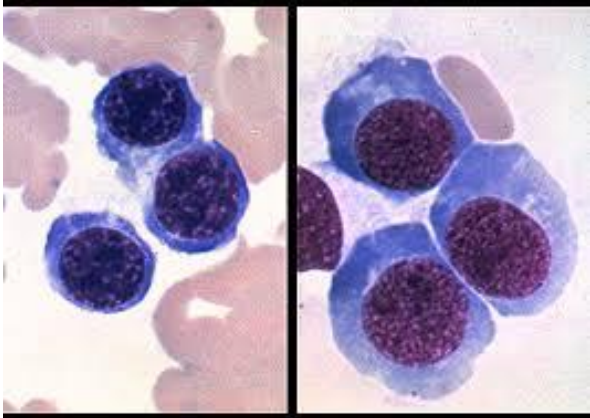
NRBC



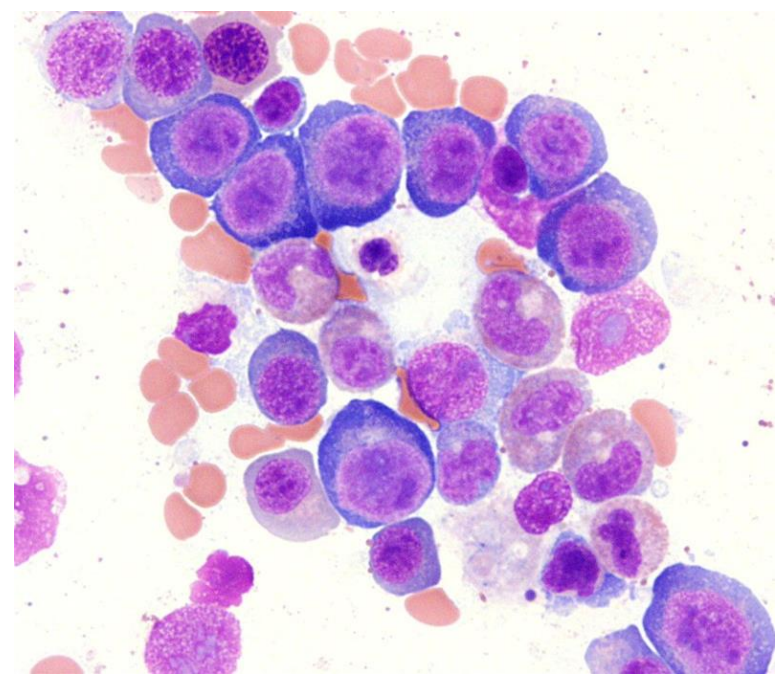
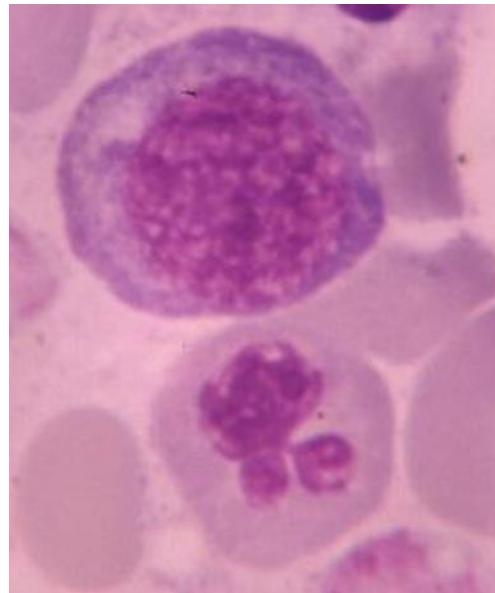
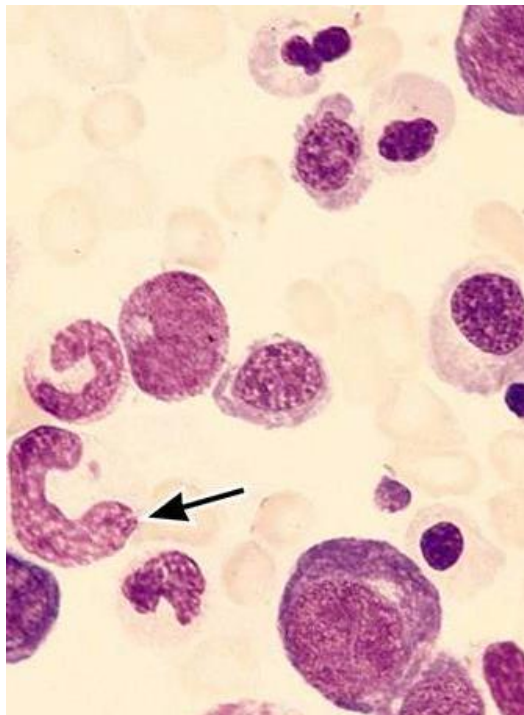
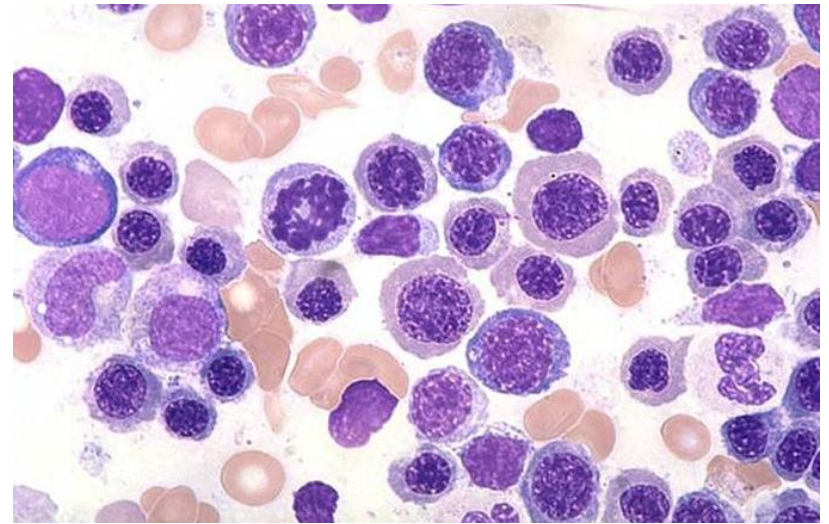
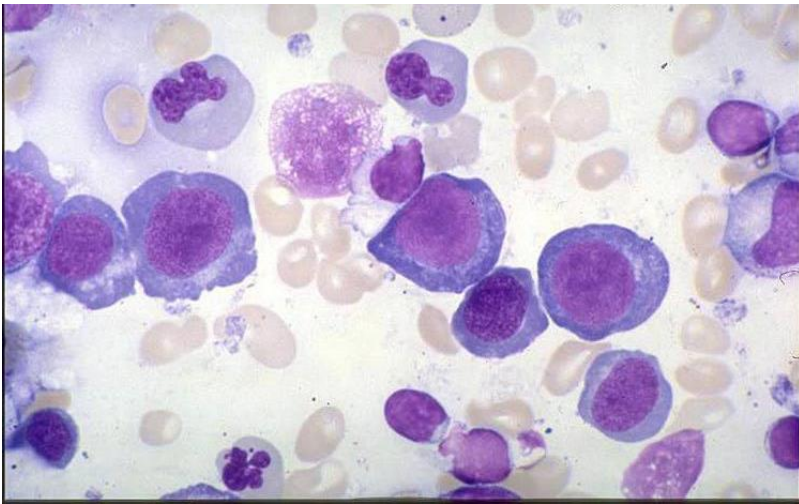
# Megaloblasty



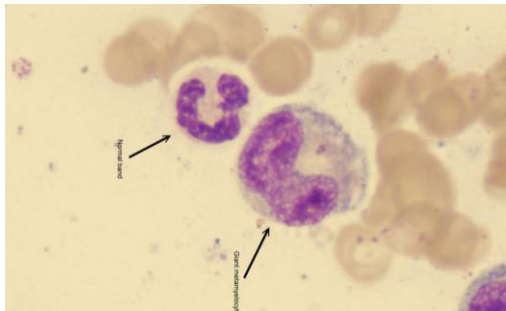
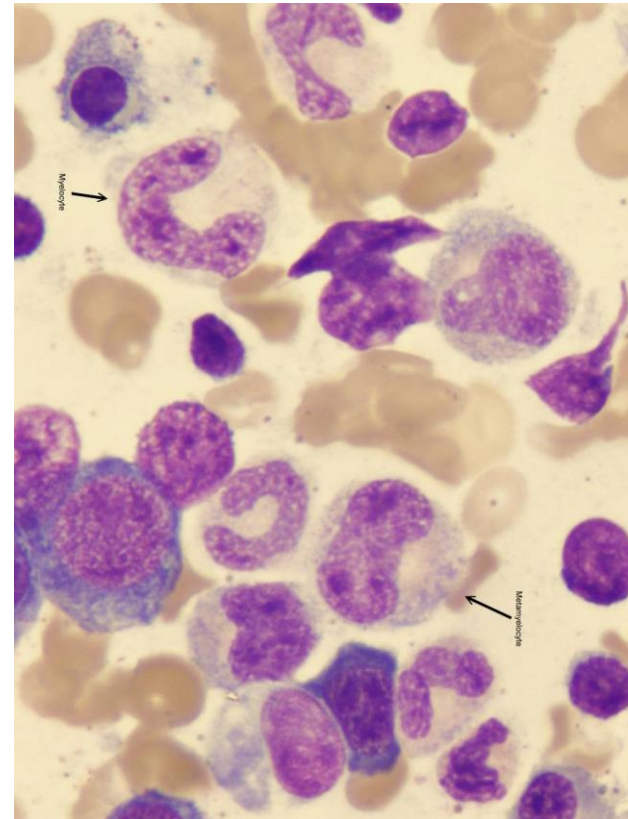
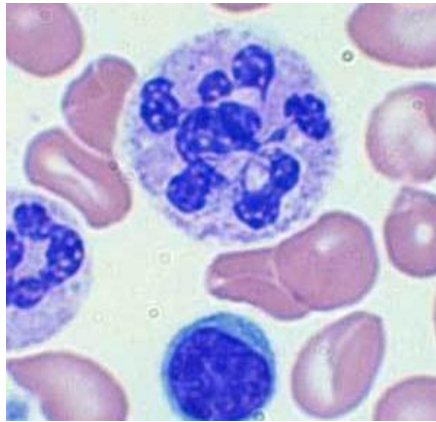
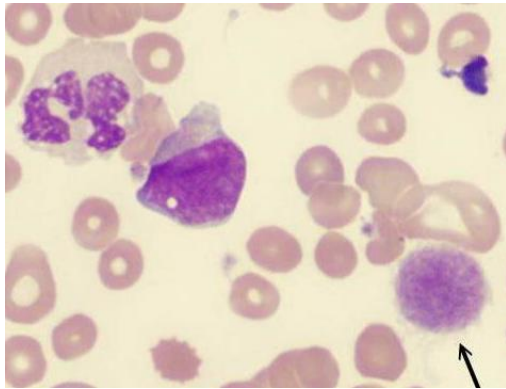
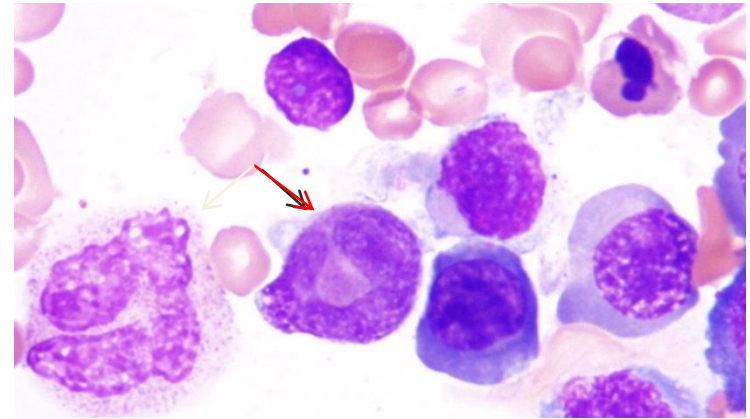
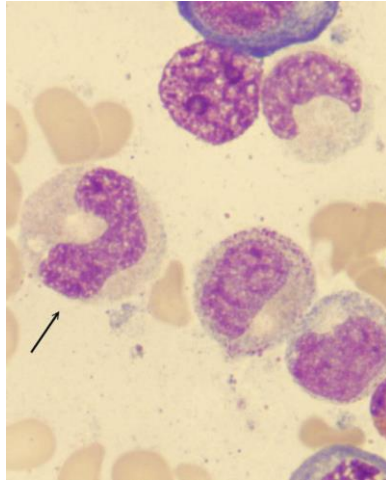
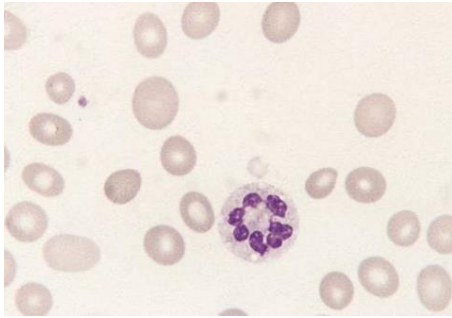
NRBC X Megaloblast



# Megaloblastová anémie



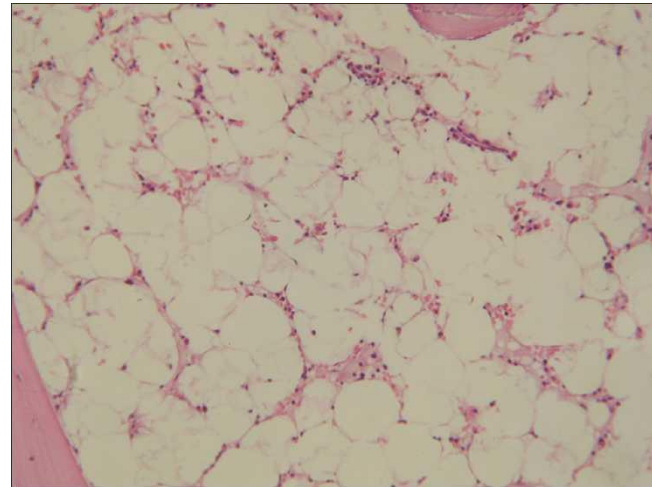
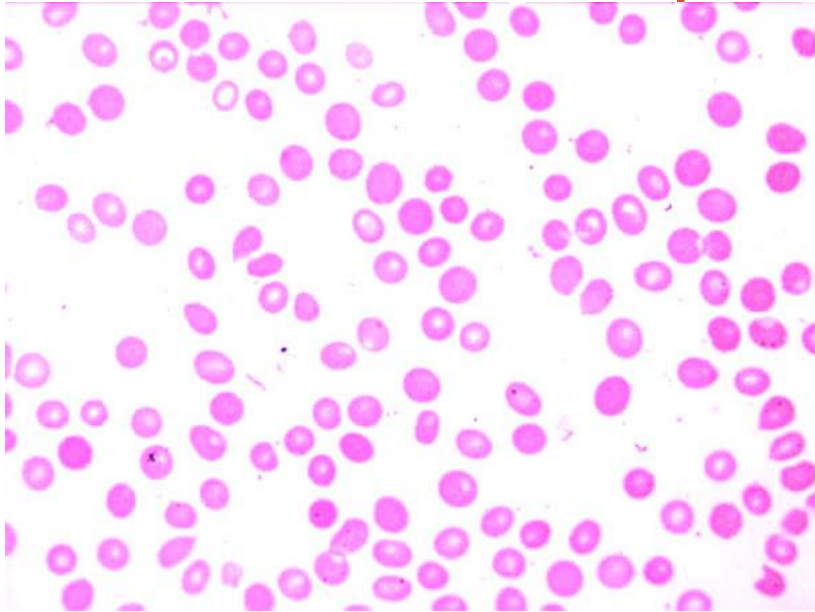
# Megaloblastová anémie



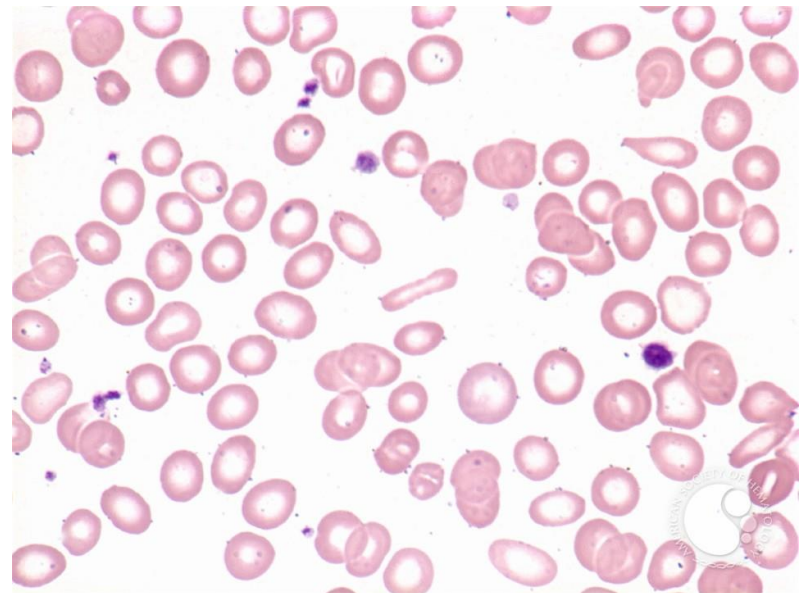
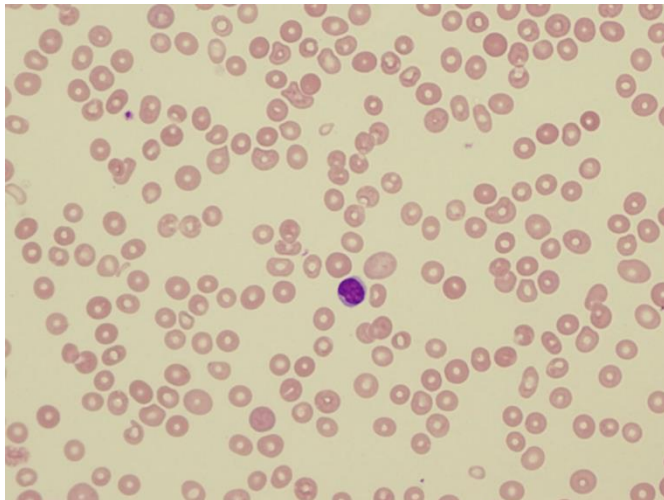
# *Aplastické anémie*

- periferní krev:  
pancytopenie nebo alespoň anemie a trombocytopenie,  
mírná makrocytóza a anizocytóza
- kostní dřeň:  
obvykle hypoplastická až aplastická, bývá zmnožení  
plazm.b. a makrofágů, megaloidní rysy, snížené množství  
magakaryocytů (MGK)

# Aplastické anémie



KD



# *Dysplastické anémie*

*Dysplázie erytropoézy - porucha vyžívání, morfologické abnormality*

- Vrozené (kongenitální dyserythropoetické anémie - KDA)
  - perifrní krev: často makrocytóza, anizocytóza, poikilocytóza
  - kostní dřeň: často megaloidní rysy, vícejaderné NRBC, karyorexe, interplazmatické můstky, mitózy, bývají zvýšené zásoby Fe
- Získané (řadí se mezi MDS)

# *Anemie ze zvýšené ztráty erytrocytů*

## Korpuskulární

- porucha membrány (*hereditární sférocytóza, eliptocytóza, stomatocytóza, akantocytóza*)
- porucha metabolismu
- hemoglobinopatie

## Extrakorpuskulární

- imunitní
- neimunitní



# Vyšetření na hemolytické anémie (HA)

*např.:*

- *volný hemoglobin v plazmě*
  - *základní metodika pro vyšetřování hemolýzy v plazmě*
- *haptoglobin*
- *feritin*
- *elektroforéza hemoglobinu*

*Speciální vyšetření:*

- *osmotická rezistence*
- *hemosiderin v moči*
- *hemoglobin F*
- *Heinzova tělíčka*
- *autohemolýza*
- *pink test*

# *Princip základní metodiky*

- *Volný hemoglobin v plazmě*

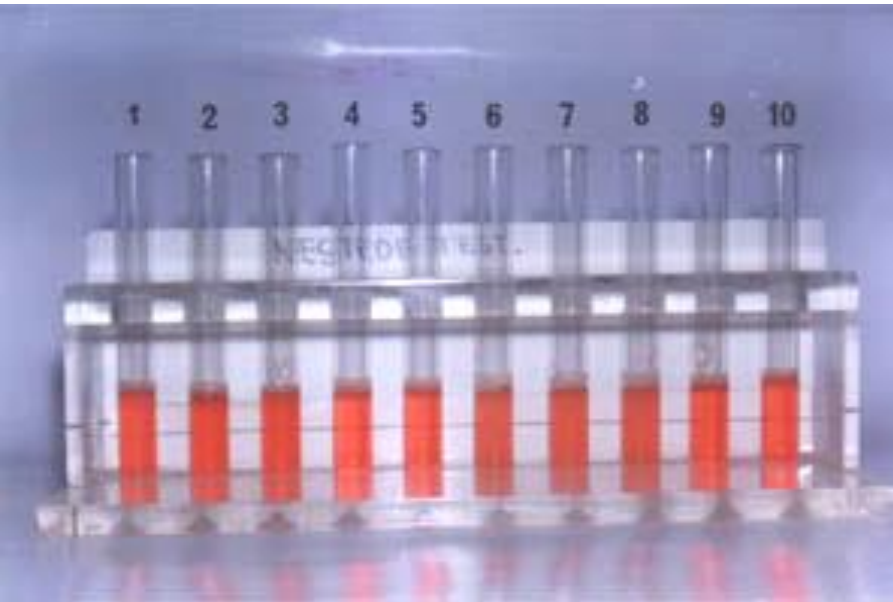
*Volný hemoglobin Hb ( $Fe^{2+}$ ) v plazmě je stanoven fotometricky po jeho oxidaci na hemoglobin ( $Fe^{3+}$ ) a ten se potom pomocí kyanidu ( $CN^-$ ) draselného přemění na barevný komplex hemoglobinkyanidu, stanovitelný fotometricky.*

# Osmotická rezistence

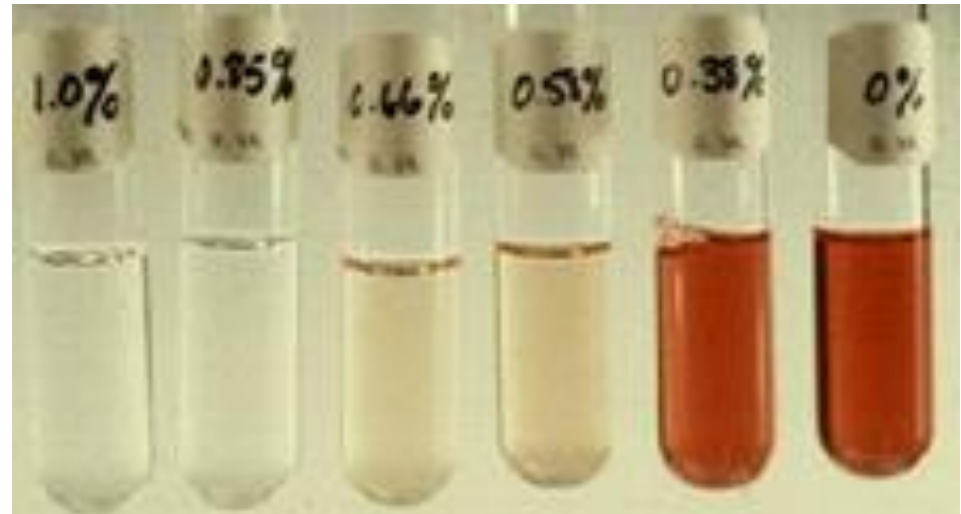
- Princip
- Stanovení odolnosti erytrocytů vůči různě koncentrovaným hypotonickým roztokům NaCl v koncentracích od 0,70 % do 0,22 % (odstupňované po 0,02 %).
- Jestliže jsou erytrocyty v isotonickém roztoku 0,9% NaCl, dochází na membráně buňky k rovnovážnému stavu a kapalina se nedostává ani z buňky ani do buňky.
- Jestliže jsou erytrocyty umístěny v prostředí hypotonického roztoku (0,70 - 0,22 % NaCl), tak buďto prasknou a dojde k hemolýze nebo se vytvoří na membráně rovnováha.

# Osmotická rezistence

příprava



normál



patologie

# Osmotická rezistence - hodnocení

- Výši osmotické rezistence posuzujeme podle koncentrace roztoku, ve kterém pozorujeme první známky osmotické hemolýzy (minimální osmotická rezistence) a podle koncentrace roztoku, ve kterém hemolyzovaly všechny krvinky (maximální osmotická rezistence).

Nulová hemolýza	Kvinky tvoří souvislý sediment, který je ostře ohraničený od bezbarvého nebo lehce nažloutlého roztoku NaCl. Musí být ve zkumavce s fyziologickým roztokem.
Částečná hemolýza	Roztok NaCl nad sedimentem je zbarven do světle červena.
Úplná hemolýza	Červená barva roztoku NaCl se vyrovná červené barvě ve zkumavce s destilovanou vodou. Musí být ve zkumavce s destilovanou vodou.

- Snížená osmotická rezistence: 0,46 % a výše - 0,34 % a výše
- Zvýšená osmotická rezistence: 0,40 % a níže - 0,30 % a níže

# Osmotická rezistence – klinický význam

- Osmotická rezistence erytrocytů popisuje odolnost erytrocytů vůči hypotonickým roztokům (roztoky NaCl). Fyziologické erytrocyty se vyznačují určitou odolností vůči hypotonickým roztokům, ale vlivem některých chorob, zejména vrozených a získaných hemolytických anémií dochází ke snížené této odolnosti. Erytrocyty pak v hypotonickém prostředí natahují vodu a vlivem zvýšeného tlaku na membránu dochází k hemolýze.
- Primární faktor ovlivňující osmotickou rezistenci červených krvinek je jejich tvar, který závisí na objemu a povrchu buňky a na funkčním stavu membrány erytrocytů. Větší povrch červených krvinek v poměru k velikosti buňky umožňuje absorbovat více tekutiny, aniž by došlo k protržení buněčné membrány a následně k lýze buňky (tzn. větší rezistence buněk k hemolýze a snížená fragilita membrány).
- Například terčovité erytrocyty mají větší povrch buňky a tedy vykazují zvýšenou rezistenci. Sférocyt má menší povrch než je jeho objem, dojde k protržení membrány, což je snížená rezistence.
  
- snížená osmotická rezistence (u hemolytických anemií a hereditární sferocytózy)  
0.46% a výše a 0.34% a výše
- zvýšená osmotická rezistence (při polycytémii, talasémii a jaterních onemocněních)  
0.40% a níže a 0.30% a níže

# Hemosiderin v moči

- Princip

$\text{Fe}^{3+}$  v hemosiderinu reaguje s kyselým roztokem ferrokyanidu draselného na ferrokyanid železitý, který vytváří krystalky Berlínské modři.

- Klinický význam

- Zásobní železo se v organizmu nachází v podobě feritinu a hemosiderinu. Hemosiderin je na rozdíl od feritinu nerozpustný ve vodě a obsahuje více železa.
- Hemosiderin dává pozitivní reakci s ferokyanidem draselným v podobě zrníček berlínské modři. Zrníčka jsou uložena v tubulárních epitelích nebo volně, případně tvoří válce.
- Hemosiderin tvoří s ferokyanidem draselným nerozpustná granula, která jsou v malém množství viditelná mikroskopem, ve velkém množství je lze spatřit i makroskopicky.
- Jeho zvýšené množství se ukládá do orgánů při onemocněních spojených s velkým rozpadem erytrocytů (hemolytické anemie), po častých transfúzích, při poruchách ukládání zásobního železa, atd.
- Přítomnost hemosiderinu v moči je detekovatelná 2 až 5 dnů po hemolytické krizi.

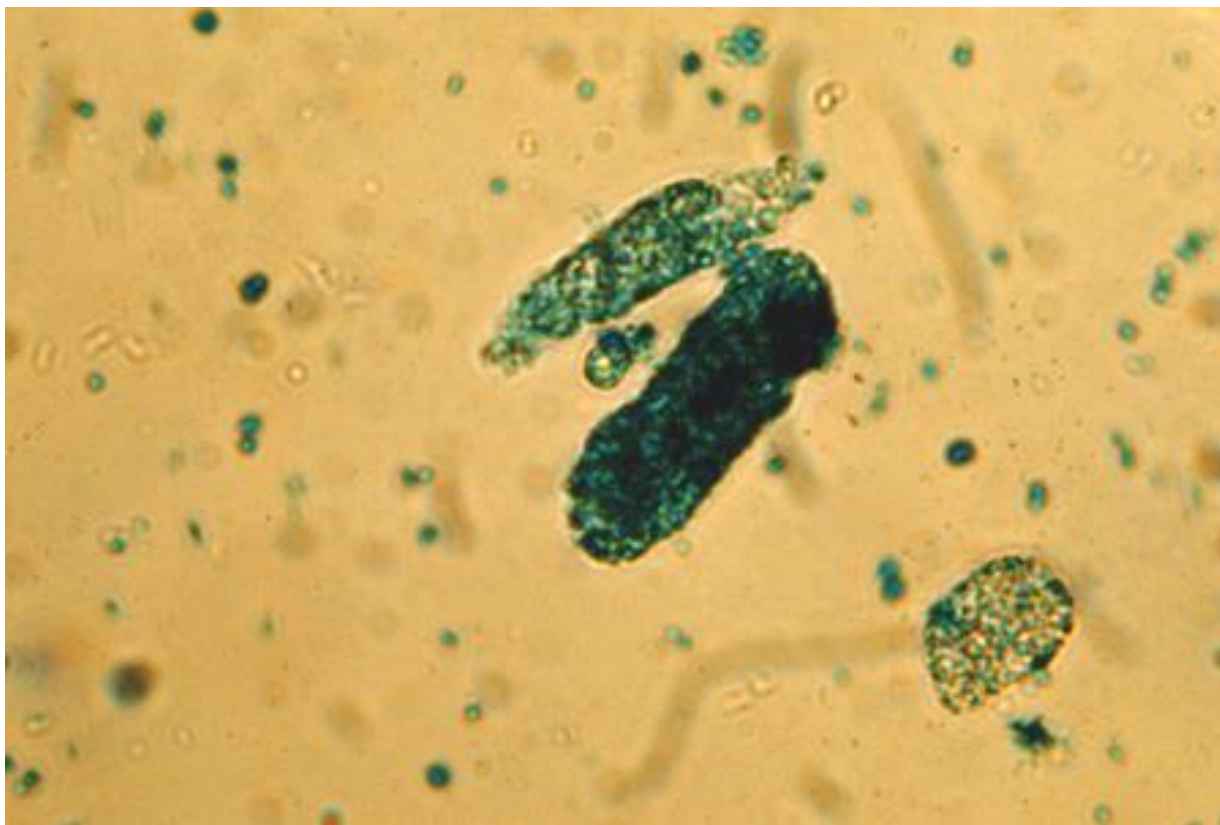
# Hemosiderin v moči

- Semikvantitativní metoda
- Nachází – li se v moči hemosiderin, jsou přítomna modře zbarvená menší či větší zrnka berlínské modři.
- Zrnka berlínské modři odečítat mikroskopicky nebo makroskopicky:

++++	velké množství hemosiderinu, roztok je zbarven již před centrifugací
+++	sediment po centrifugaci vytváří na dně zkumavky modrý kroužek
++	na dně zkumavky po centrifugaci jsou patrná modrá zrnka, mikroskopicky tvoří hemosiderin četné shluky zrn
+	makroskopicky nelze hemosiderin prokázat, mikroskopicky tvoří ojedinělé shluky zrn
stopa	hemosiderin je v moči přítomen jen jako ojedinělá zrnka



# Hemosiderin v moči



# Hemoglobin F

- Princip

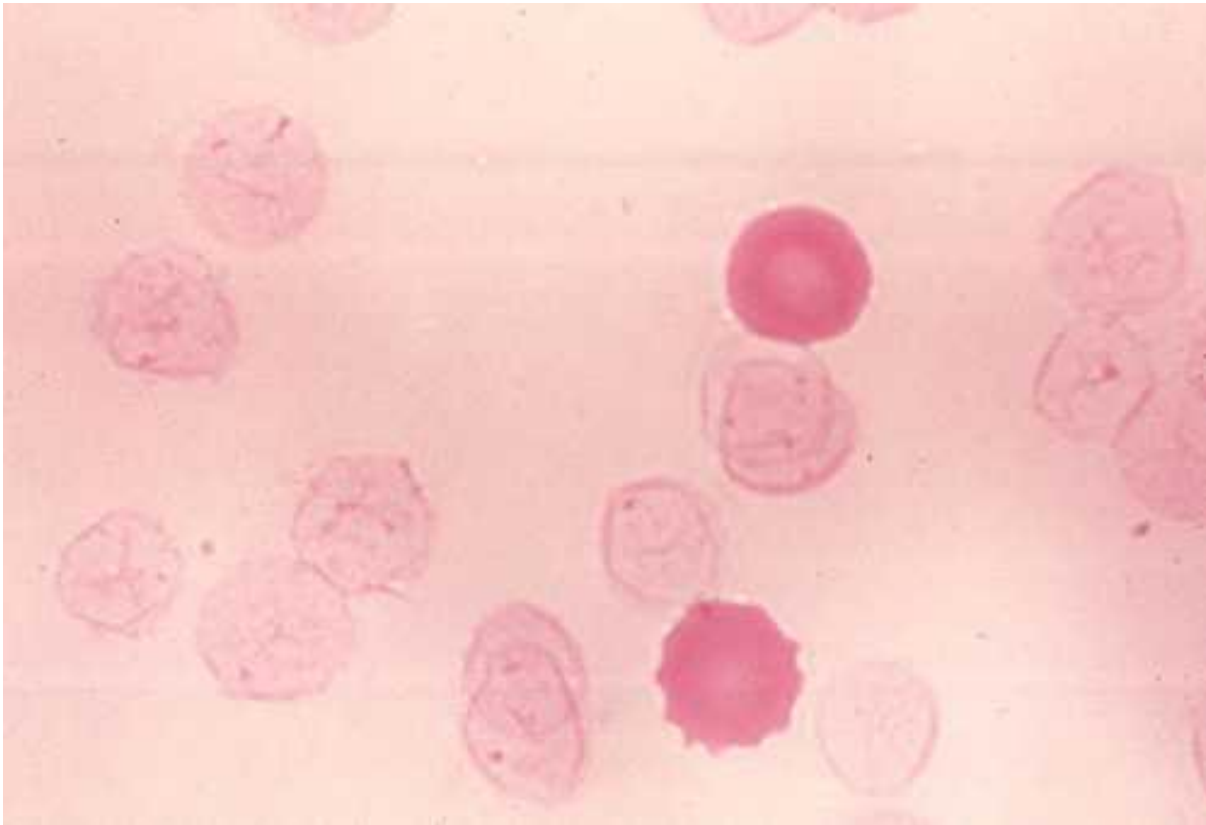
Nafixované, zaschlé nátěry se ponoří do pufru pH 3.3. Hemoglobin A (adult hemoglobin) je v buňce rozpuštěn a vyplaven, hemoglobin F (fetální hemoglobin) je ke kyselému prostředí rezistentní a v erytrocytu zůstává. Zbylý hemoglobin F se potom barví a odečítá mikroskopicky.

- Hodnocení

procentuelní hodnocení sytě zbarvených erytrocytů

- novorozenci: 50 - 90 % HbF
- věk < 2 roky: 0 - 4 % HbF
- věk > 2 roky: 0 - 2 % HbF

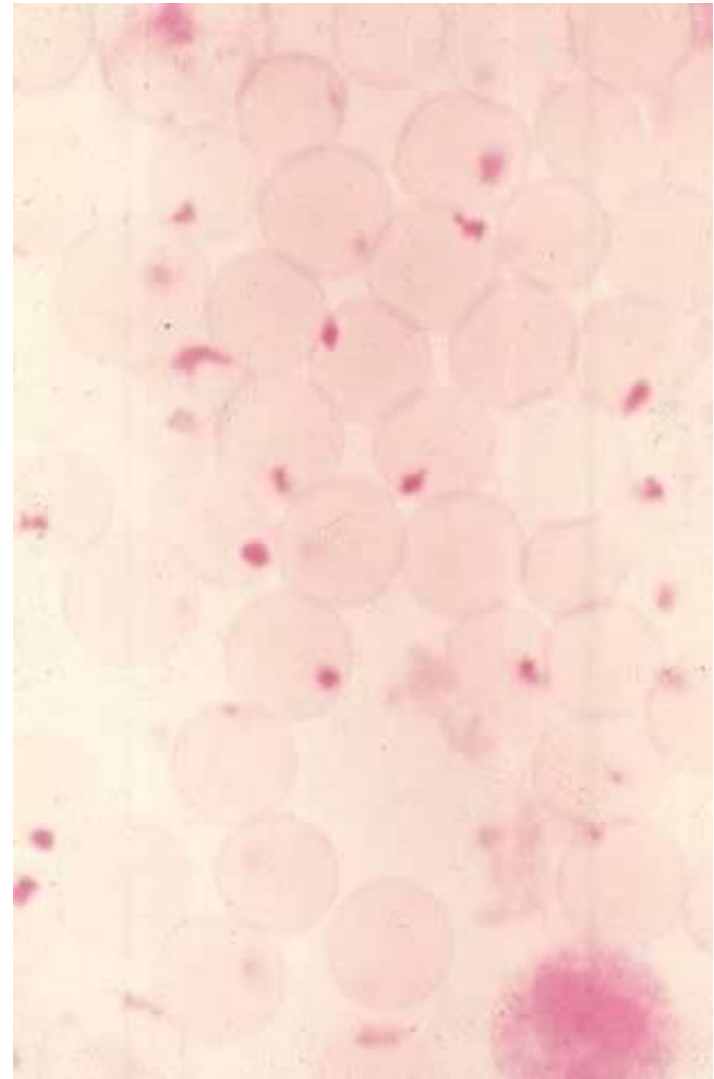
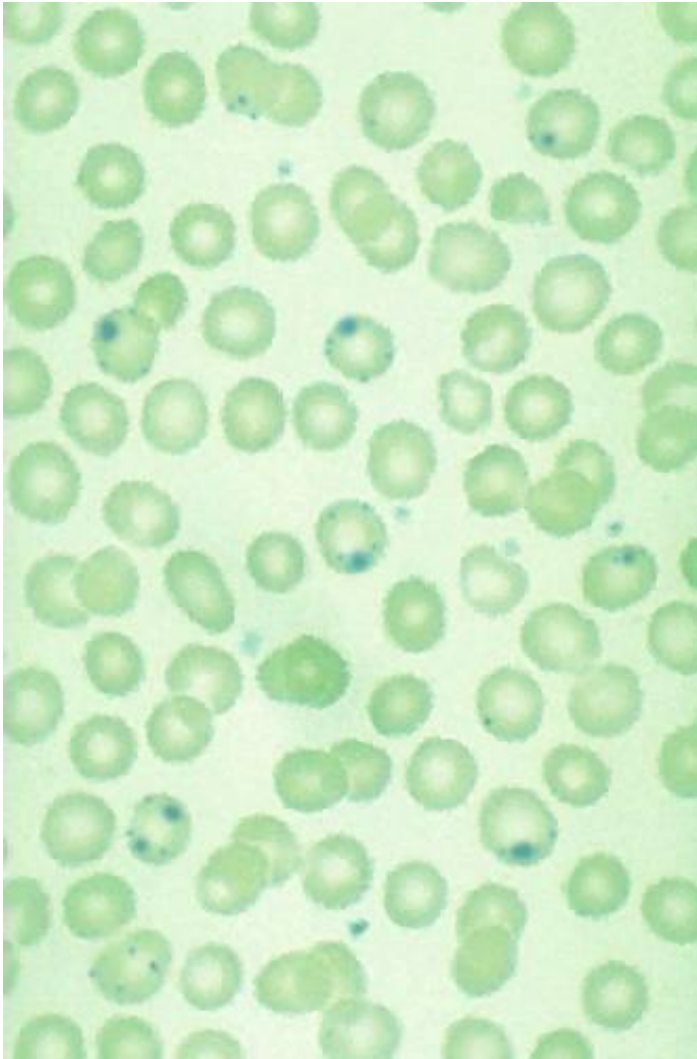
# Hemoglobin F



# Heinzova tělíška

- Heinzova tělíška znázorňují vysrážený hemoglobin v případě, že glykolytické enzymy červených krvinek nejsou schopny zabránit oxidaci hemoglobinové molekuly. Tyto precipitáty jsou představovány jedním nebo více oválnými tělísky v červených krvinkách. Objevují se těsně u buněčné membrány, ke které přiléhají.
- Během života normální červené krvinky dochází postupně ke snižování množství jednotlivých enzymů a tedy ke tvorbě malého množství Heinzových tělísek.
- Heinzova tělíška nalézáme ve větší míře za přítomnosti nestabilních hemoglobinů, při nedostatku některých enzymů (např. G-6-PDH) v redukujícím systému erytrocytů a po užívání oxidačních látek ( např. sulfonamidy, antimalarika, streptomycin atd.).
- U nestabilních hemoglobinů odstraňuje Heinzova tělíška z červených krvinek slezina, proto nejsou v buňkách viditelná, tělíška nejsou odstraňována, pokud je provedena splenektomie.
- Heinzova tělíška nejsou viditelná při běžném panoptickém barvení, ale až po barvení např. brilliantcresylovou modří. Je-li toto barvení negativní, necháme krvinky reagovat s redukující látkou acetylfenylhydrazinem. Toto barvení je pozitivní, jestliže je nedostatek enzymů v redukujícím systému červené krvinky.
- Barvení nátěrů neinkubovaných erytrocytů sleduje nestabilní hemoglobiny.
- Barvení nátěrů inkubovaných erytrocytů sleduje enzymatické poruchy.

# Heinzova tělíska



# Vyšetření HA

Fotometrická vyšetření na principu stanovení volného hemoglobinu v plazmě.

- Autohemolýza

Hodnocení spontánní hemolýzy v prostředí fyziologického roztoku, glukózy a ATP po dobu 48 hodin.

- Pink test

Orientační vyšetření při podezření na hereditární sférocytózu

# Vyšetření HA – Autohemolýza

- Hodnocení spontánní hemolýzy defibrinované krve, která je inkubovaná při teplotě 37°C v prostředí fyziologického roztoku, glukózy a ATP po dobu 48 hodin.
- Stupeň hemolýzy je ve fyziologickém roztoku vždy větší než po přidání glukózy a ATP. U normálního vzorku se hemolýza po přidání glukózy a ATP snižuje.
- Hereditární sférocytoza: autohemolýza výrazně zvýšena, po přidání glukózy se snižuje.
- PNH: autohemolýza také zvýšená, ale po přidání glukózy se hemolýza snižuje.
- Deficit pyruvátkinázy: autohemolýza ve fyziologickém roztoku výrazně zvýšená
  - po přidání ATP se upravuje
  - po přidání glukózy se hemolýza neupravuje.
- Deficit G-6-PDH: autohemolýza ve fyziologickém roztoku normální nebo lehce zvýšená, po přidání ATP a glukózy dochází k částečné úpravě.

# Vyšetření HA – Pink test

- Orientační vyšetření při podezření na hereditární sférocytózu.
- V testu se stanovuje konečné procento hemolýzy v prostředí glycerolu při pH 6,6.
- Pro snadné a rychlé provedení (ve srovnání s testem na osmotickou rezistenci a testem autohemolýzy) se test používá jako doplňující a vyhledávací vyšetření na dědičnou sférocytózu.

## Ref. rozmezí:

1 - 23.7 %, průměrná hodnota 10%

## Hereditární sférocytóza:

32 – 90 % s průměrem 60%



# Vyšetření HbS, HbA<sub>2</sub>

- Princip metody: aniontová chromatografie hemoglobinů, která probíhá v pufovaném prostředí o specifickém pH. Na pozitivně nabitě částice pryskyřice se naváží části hemoglobinu s negativním nábojem. Jednotlivé hemoglobinové frakce se z chromatografické kolony vymyjí puforem po změně pH nebo iontové síly. Množství jednotlivých typů hemoglobinů se vyšetřuje spektrofotometricky.

## HbA<sub>2</sub>

- Přesné stanovení množství HbA<sub>2</sub> v klinické praxi je důležité pro diferenciální diagnostiku anemií a thalasemií. Pro určení přesné diagnózy je nutné přihlížet také k ostatním laboratorním výsledkům, zejména se jedná o železo v séru, vazebnou kapacitu železa, morfologii červených krvinek, hemoglobin, hematokrit a střední objem erytrocytů (MCV).
- Celkové množství HbA<sub>2</sub> se ve spojení s hodnotou MCV používá jako kritérium pro diferenciální diagnostiku  $\beta$ -talasemie minor, anemie z nedostatku železa a další hypochromní mikrocytární anemie.
- U  $\beta$ -talasemie se může hodnota HbA<sub>2</sub> pohybovat ve fyziologických mezích v případě, že je snižené množství železa.

## HbS

- Kvantitativní stanovení HbS je klinicky významné pro diagnostiku srpkovité anémie (také u pacientů trpících současně srpkovitou a  $\alpha$  nebo  $\beta$ -talasemií) a dále u pacientů se srpkovitou anémií, kteří jsou léčeni transfuzemi. Za normálních okolností je hodnota HbS negativní, v případě heterozygotů (Sickle cell trait: genotyp  $\beta^A/\beta^S$ ) se hodnota HbS pohybuje v rozmezí 20-40%, v případě homozygotů (Sickle cell anemia: genotyp  $\beta^S/\beta^S$ ) se hodnota HbS pohybuje v rozmezí 80-100%