

# **Speciální hematologická vyšetření**

Bourková L., OKH FN Brno

# ***Vyšetřování anémií***

# *Sledování vyšetření*

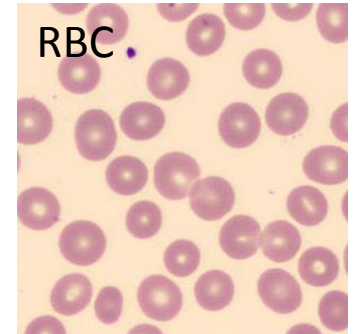
## Hodnotit:

- 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*)

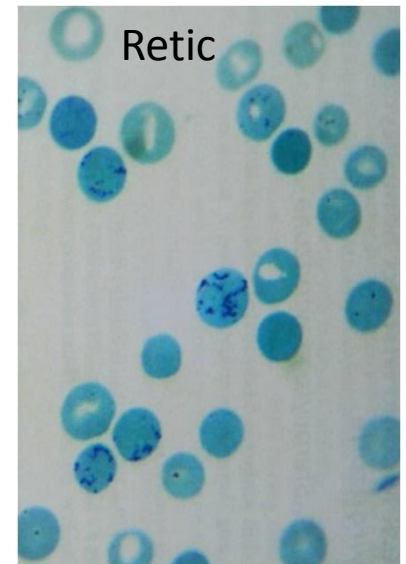


## ➤ mikroskopicky

- ✓ supravitální barvení RNA v buněčných organelách (*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  $\text{Fe}^{3+}$ : feritin, hemosiderin

➤ **Princip vyšetření:**

$(\text{Fe}^{3+}) + \text{ferrokyanid draselným} - \text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] + \text{HCl}$

→ 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

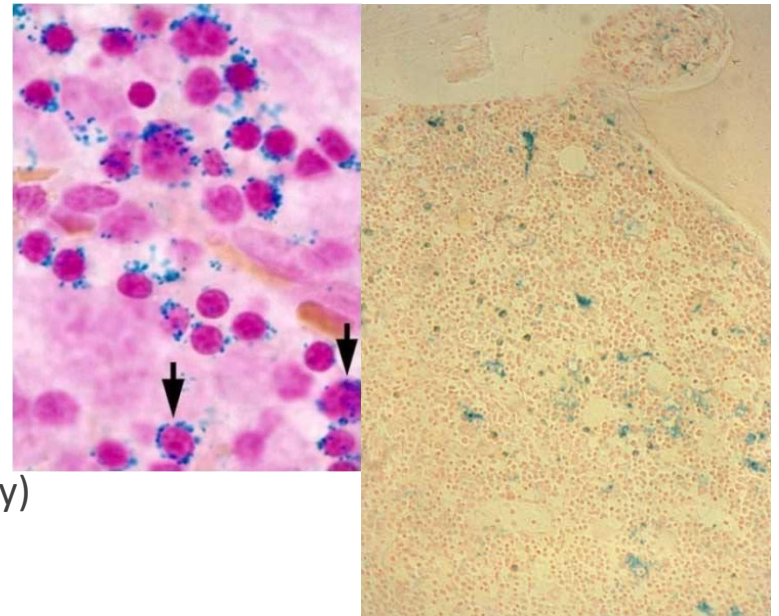
➤ **Klinický význam:**

✓ snížení hodnoty:

- sideropenické anémie

✓ zvýšené hodnoty:

- sideroblastické (přítomné prstenčité sideroblasty)
- hemolytické anémie, megaloblastové anémie
- MDS, leukémie



# Základní 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
  - ✓ *Heinzova tělíska*

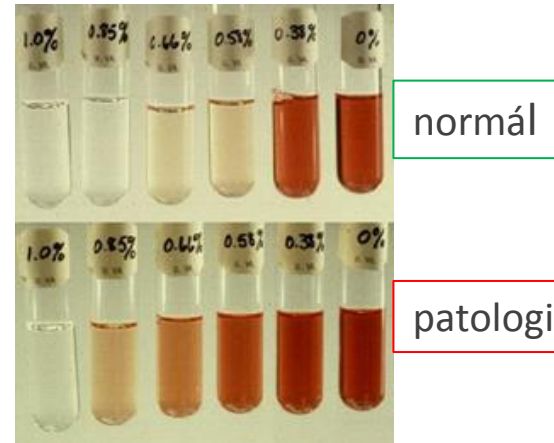
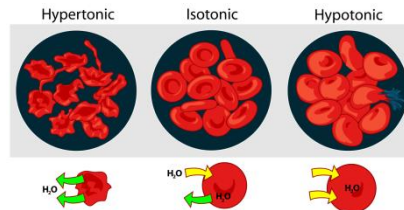
# Obecné testy

## ➤ 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:*  
*stanovení odolnosti RBC v různě koncentrovaných hypotonických roztocích NaCl (fyziologického r.).*

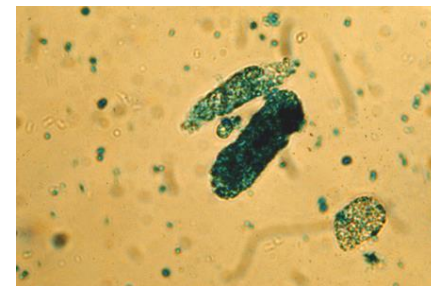


## ➤ test autohemolýzy

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

## ➤ vyšetření hemosiderinu v moči

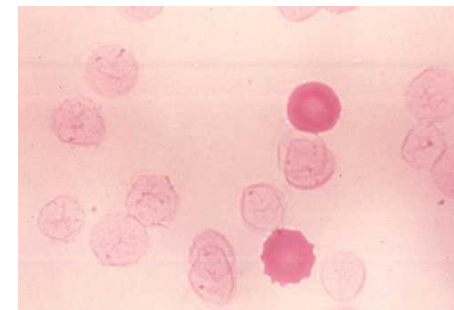
- ✓ *Princip - mikroskopicky:*  
 *$\text{Fe}^{3+}$  v hemosiderinu + HCl +  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$*   
 *$\rightarrow$  krystalky - berlínská (pruská) modř -  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$*



# Testy na průkaz abnormálních hemoglobinů

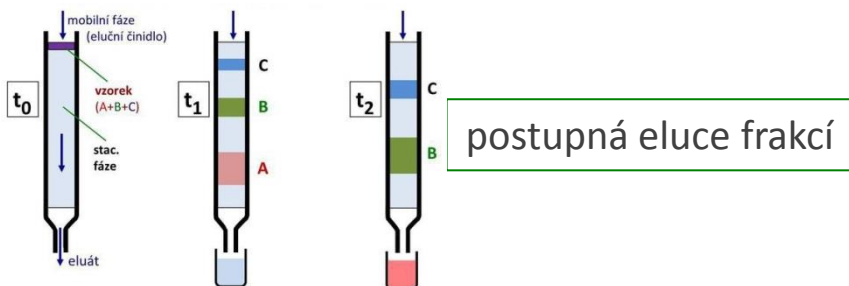
## ➤ hemoglobin F

- ✓ *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 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 (+).*

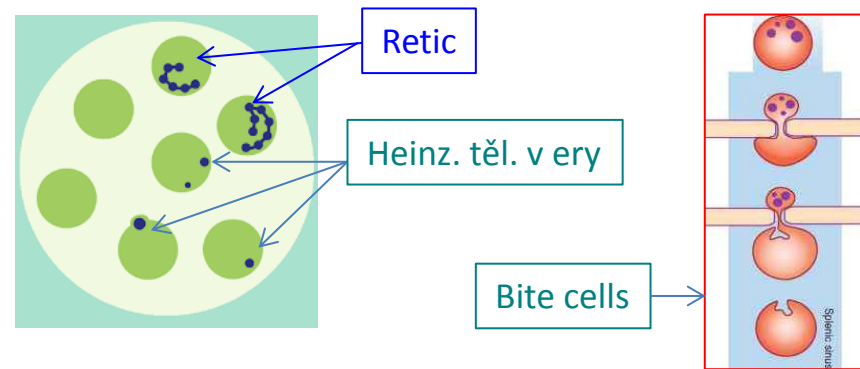
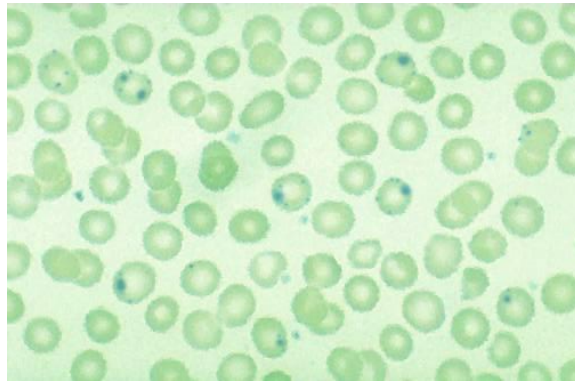


# Testy na průkaz nedostatku enzymů

## ➤ Heinzova tělíska

### ✓ Princip - mikroskopicky:

Heinzova tělíska znázorňují vysrážený degenerovaný 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 acetylfenylhydrazinem.



## ➤ 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***

# Sledování vyšetření

## 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:*  
[http://www.hematology.cz/doporuceni/laboratorni\\_sekce/files/referencni\\_meze/Doporuceni\\_LS\\_CHS\\_CLS\\_JEP-Referencni\\_meze-myelogram\\_dospelych\\_v1.pdf](http://www.hematology.cz/doporuceni/laboratorni_sekce/files/referencni_meze/Doporuceni_LS_CHS_CLS_JEP-Referencni_meze-myelogram_dospelych_v1.pdf)
- cytochemická vyšetření

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

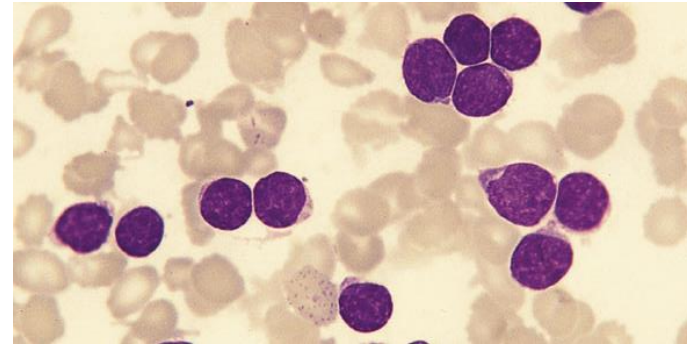
# Příklady morfologických abnormalit u akutních lymfoblastických leukémií

## Dělení dle FAB klasifikace

### ➤ ALL – L1

#### ✓ morfologické nálezy:

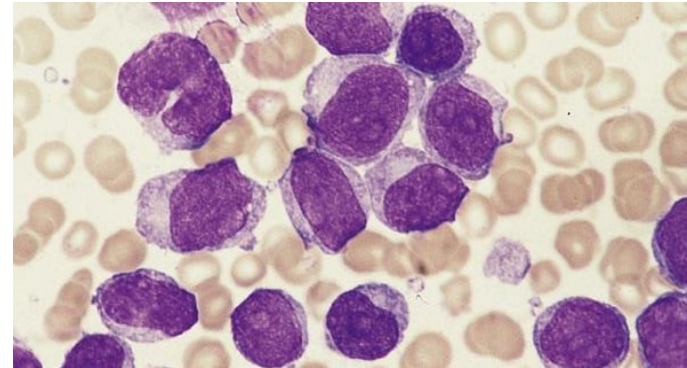
- menší blastické buňky
- vysoký N/C (nukleo-cytoplazmatický) poměr
- jemnější chromatin
- nejasná jadérka



### ➤ ALL – L2

#### ✓ morfologické nálezy:

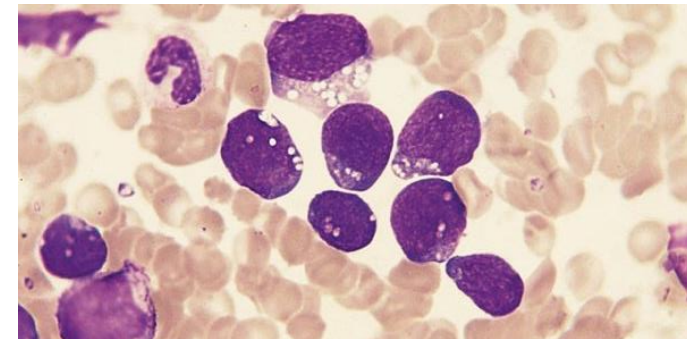
- větší, často polymorfní blastické buňky
- bohatší cytoplazma
- jasná jadérka



### ➤ ALL – L3

#### ✓ morfologické nálezy:

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

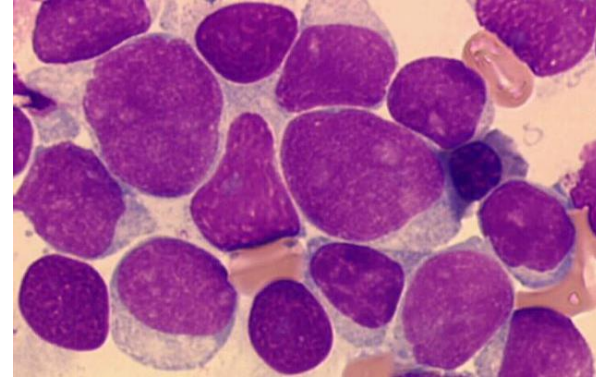


# Příklady morfologických abnormalit u akutních myeloblastických leukémií

## Dělení dle FAB klasifikace

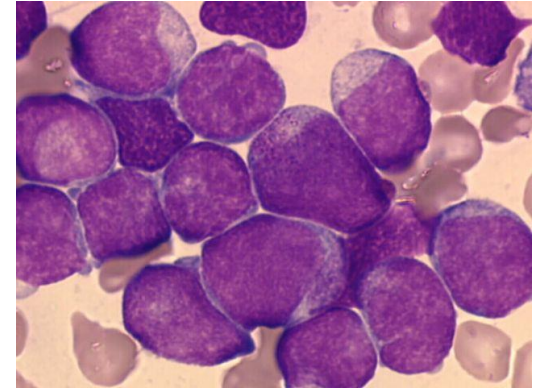
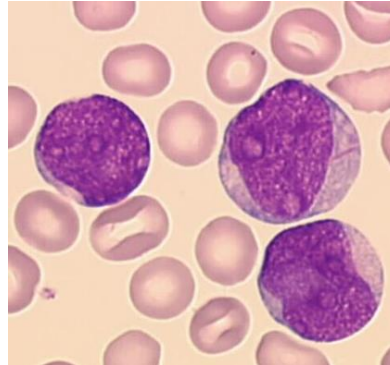
### ➤ AML – M0

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



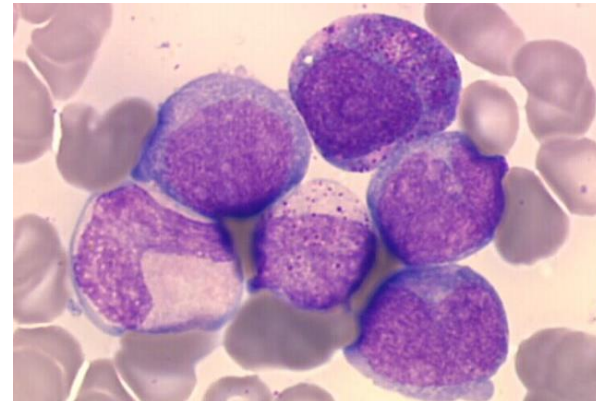
### ➤ AML – M1

- ✓ 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 monoctárních buňek <20%
  - Auerovy tyče



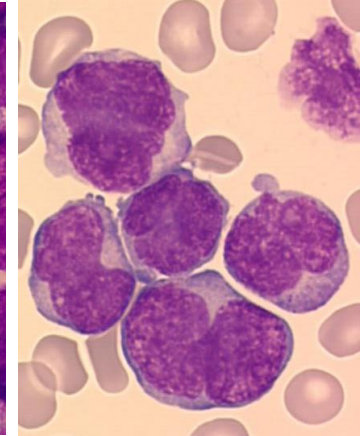
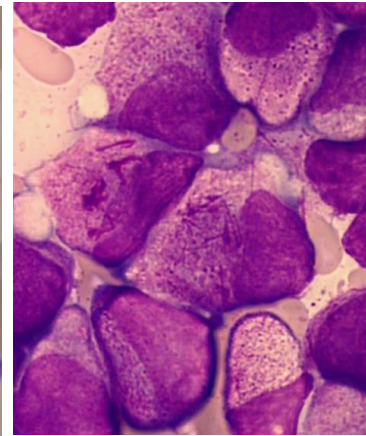
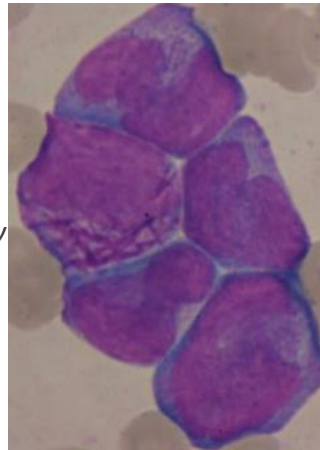
# Příklady morfologických abnormalit u akutních myeloblastických leukémií

## Dělení dle FAB klasifikace

### ➤ AML – M3

#### ✓ morfologické nálezy:

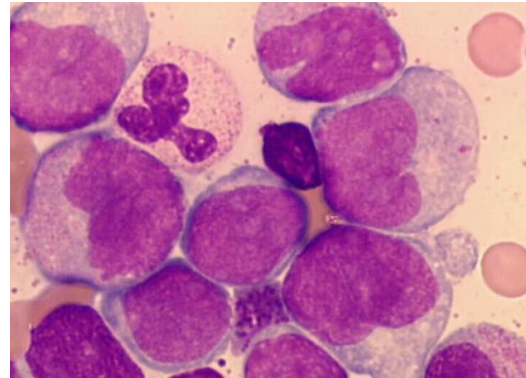
- AML - promyelocytární
- do nádorové populace buněk zahrnovány blasty i abnormální promyelocyty
- typ M3 – hypergranulární  
Auerovy tyče, snopce Auerových tyčí
- typ M3 – variantní  
dvoulaločnatá, mnoholaločnatá jádra  
až agranulace cytoplazmy, oválné inkluze, Auerovy tyče



### ➤ AML – M4

#### ✓ morfologické nálezy:

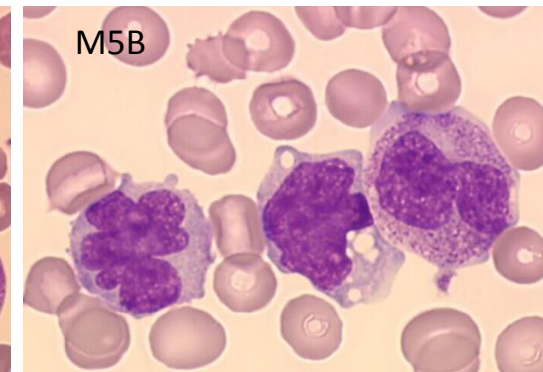
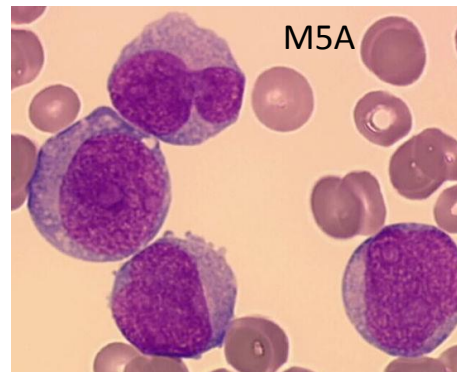
- AML - myelomonocytární
- většina blastů z nonerytroidní řady
- podíl monocytárních buněk > 20%
- v KO bývá monocytóza



### ➤ AML – M5

#### ✓ morfologické nálezy:

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



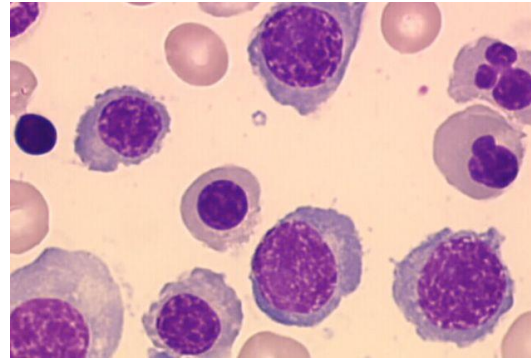
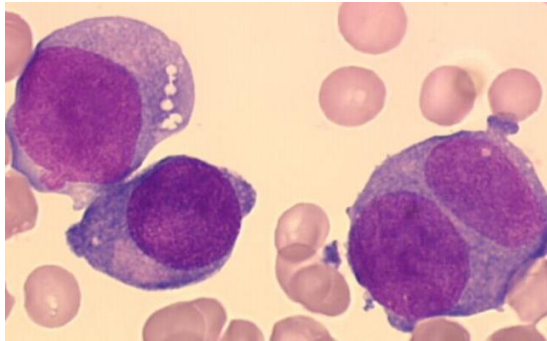
# Příklady morfologických abnormalit u akutních myeloblastických leukémií

## Dělení dle FAB klasifikace

### ➤ AML – M6

#### ✓ morfologické nálezy:

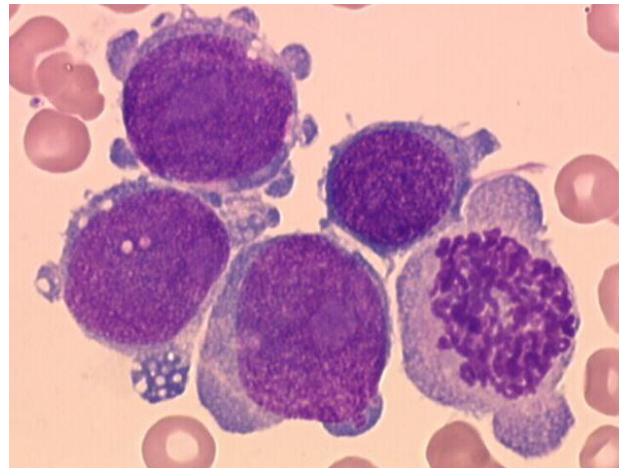
- erytroleukémie
- erytroblasty (proerytroblasty + NRBC) > 50% ze všech jaderných buněk
- myeloblasty > 20% (mohou být Auerovy tyče)
- dysplázie v erytrocytární řadě (členitá jádra, karyorexe, vícejaderné NRBC, vakuolizace, megaloblasty)



### ➤ AML – M7

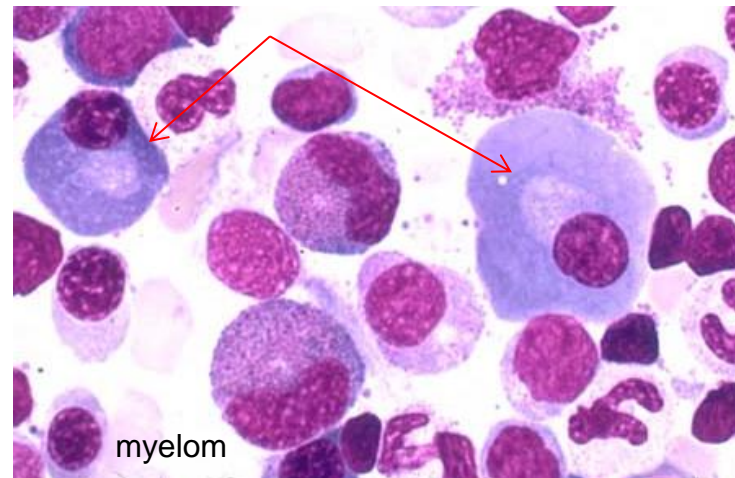
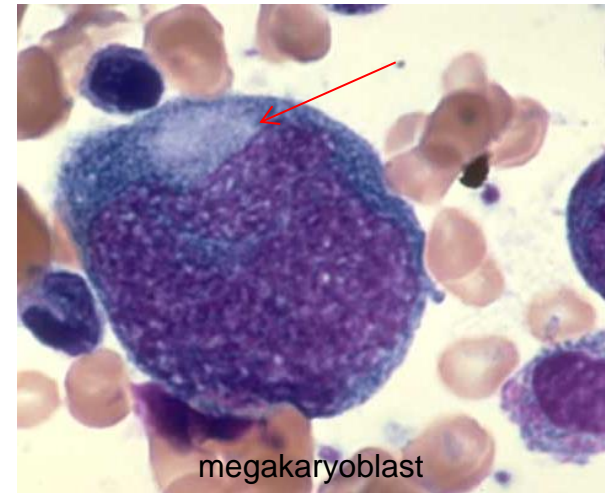
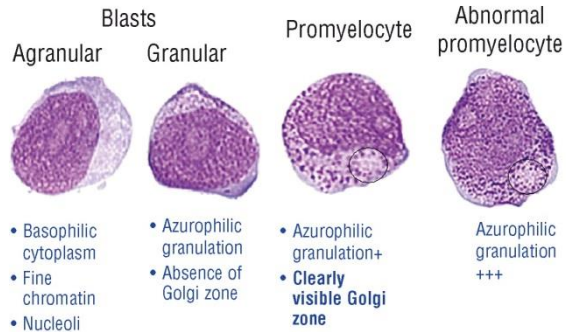
#### ✓ morfologické nálezy:

- megakaryocytární leukémie
- blasty většinou megakaryoblasty
- dysplastické změny MGK



# Perinukleární projasnění

Golgiho zóna (*návaznost na endoplazmatické retikulum*)



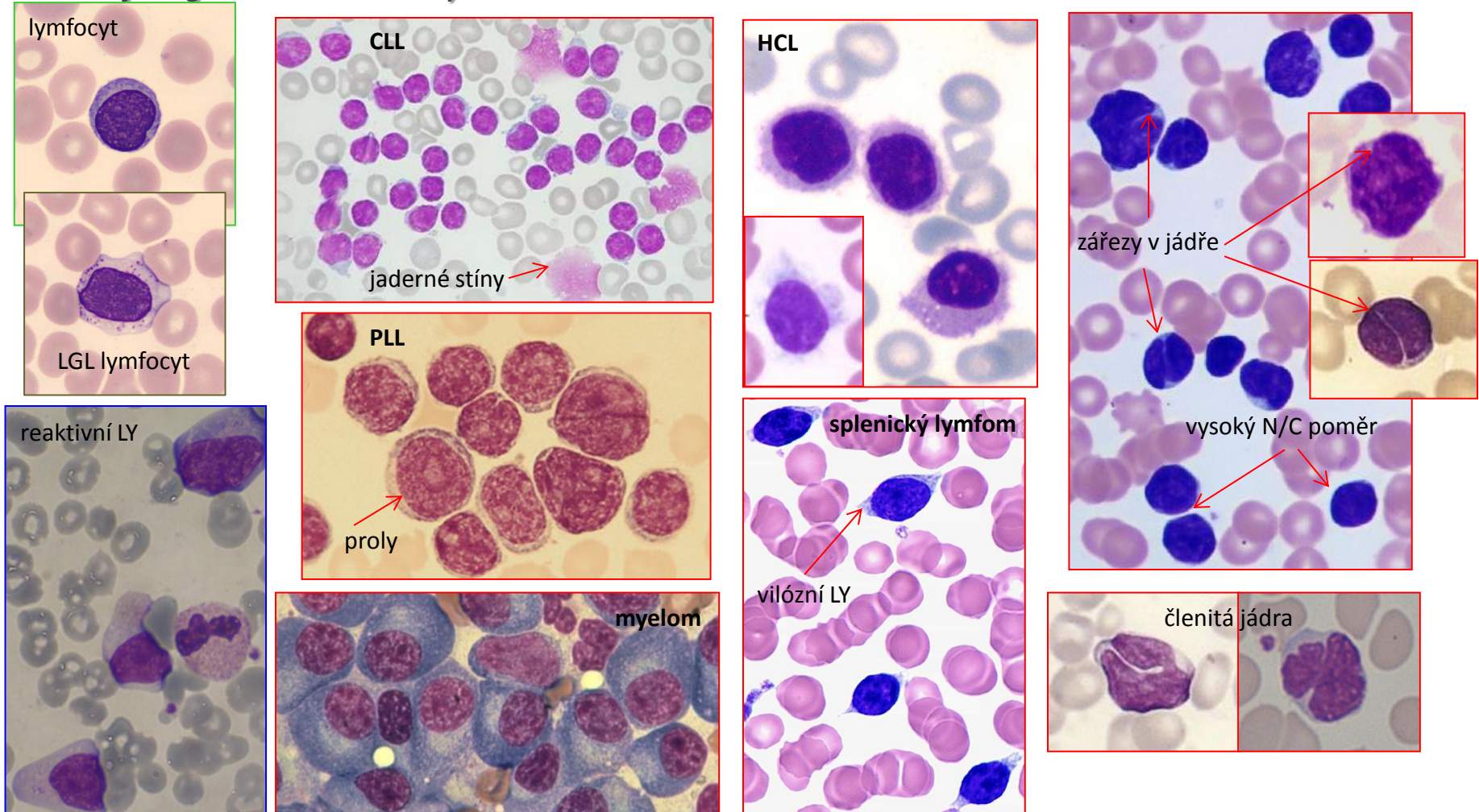


# Příklady morfologických abnormalit u lymfoproliferativních onemocnění

## ➤ základní nálezy

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

## ➤ morfologické abnormality

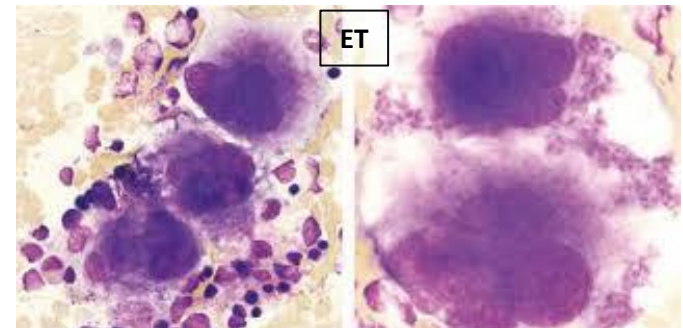
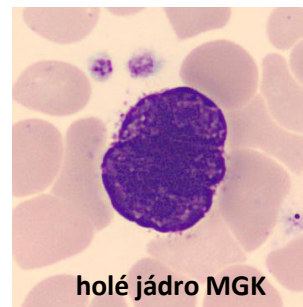
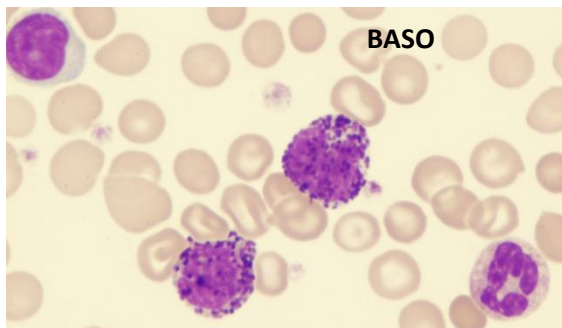
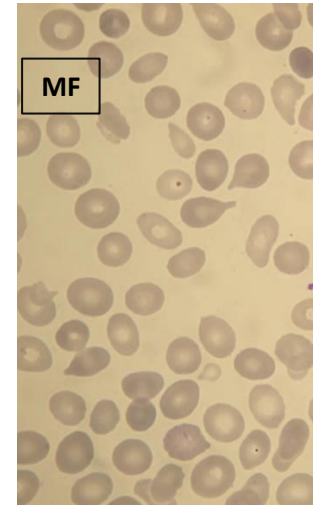
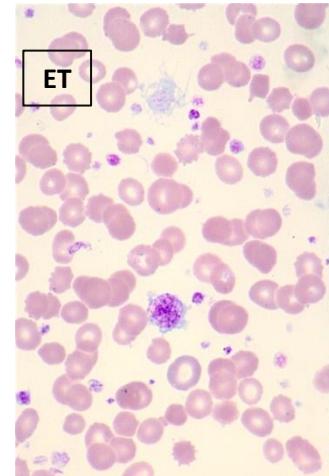
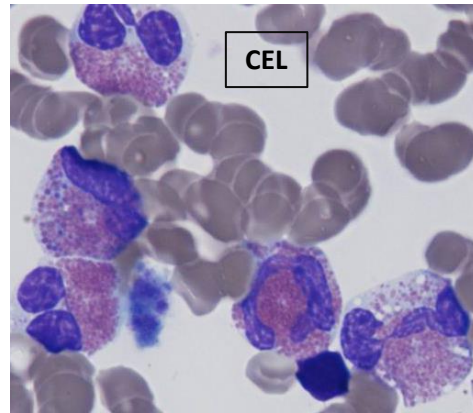
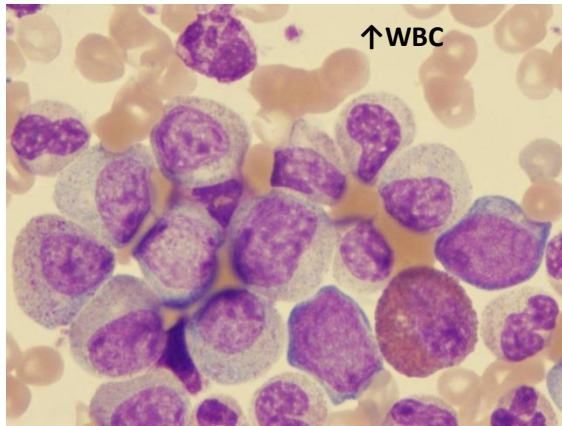


## D - Příklady morfologických abnormalit u myeloproliferativních onemocnění

### ➤ 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 vyzářování jádra a cytoplazmy, Auerovy tyče, pseudo-Chediakova-Higashiho granula

### ✓ dysmegakaryopoéza:

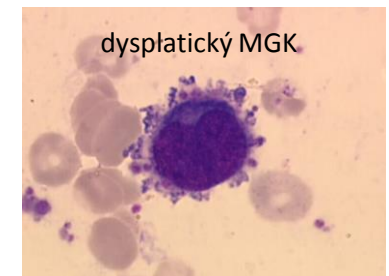
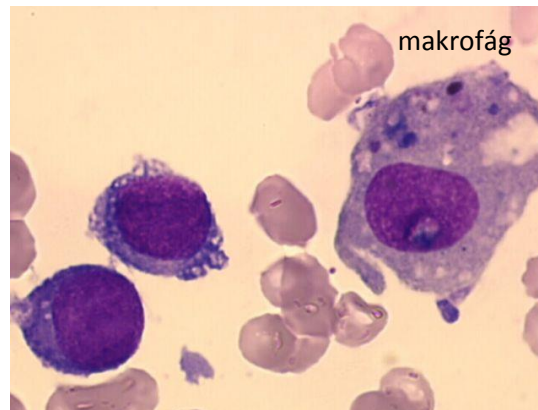
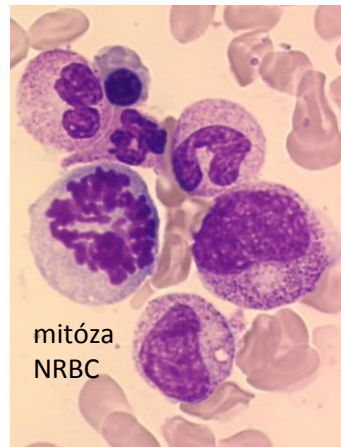
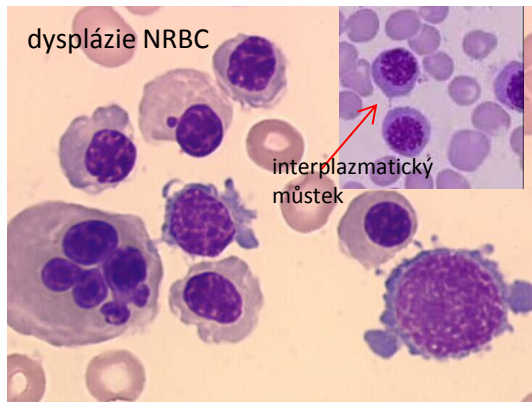
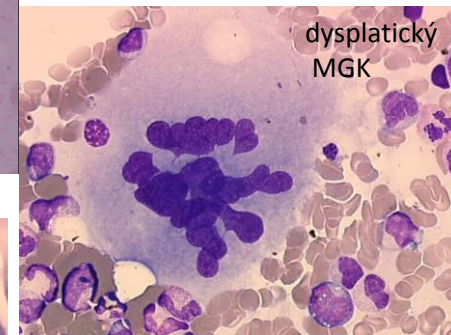
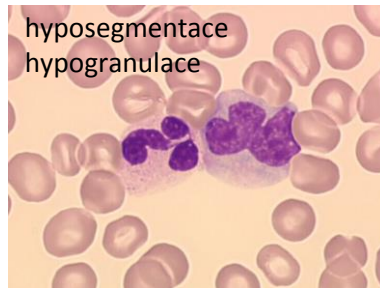
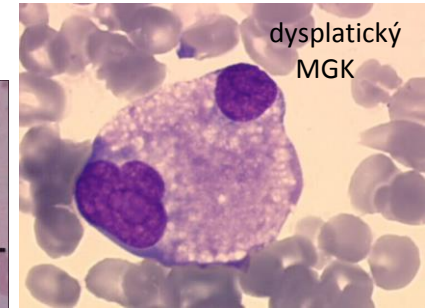
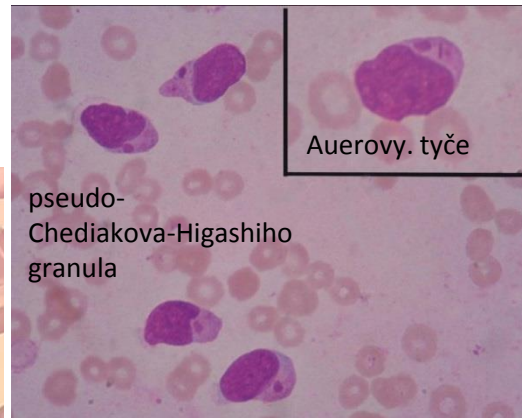
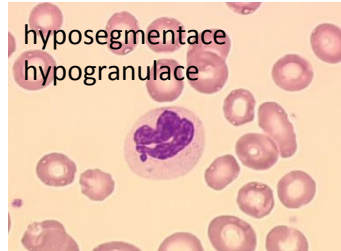
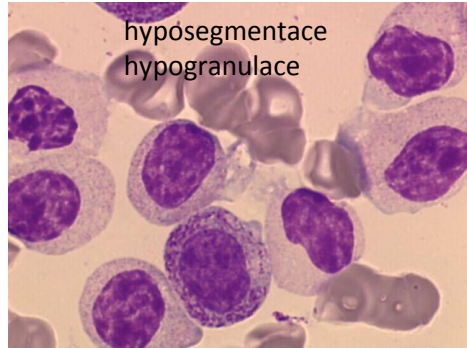
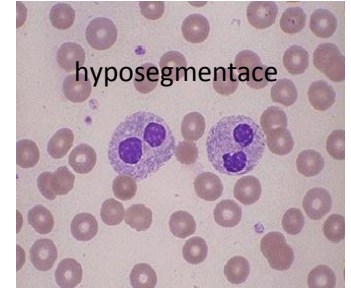
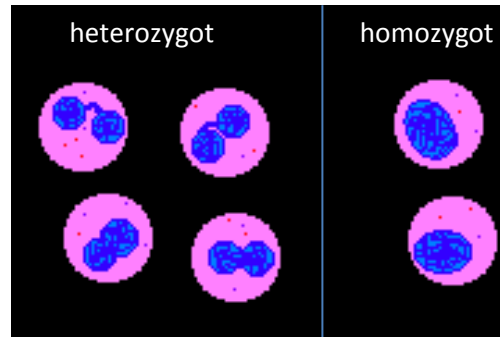
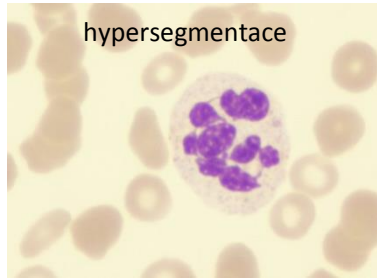
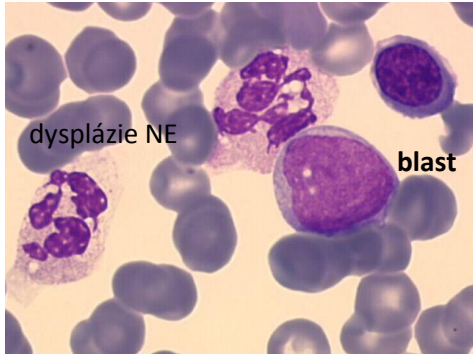
- mikro/obrovské MGK, hypo/hyper - lobularizace MGK, vícejaderné MGK, vakuolizace, hypogranulace MGK

---

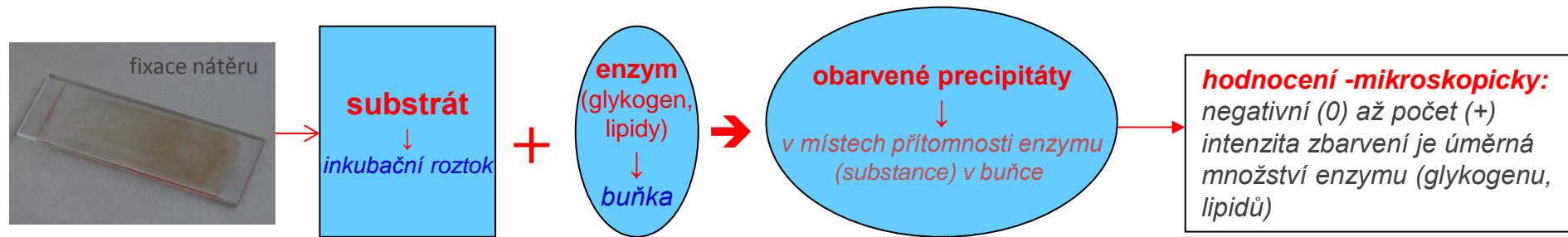
## ❖ Sledovat:

- 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



# Cytochemická vyšetření



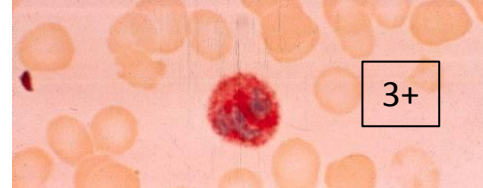
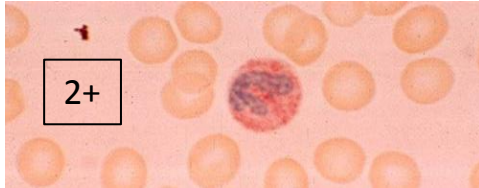
## Cytochemická barvení:

- 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

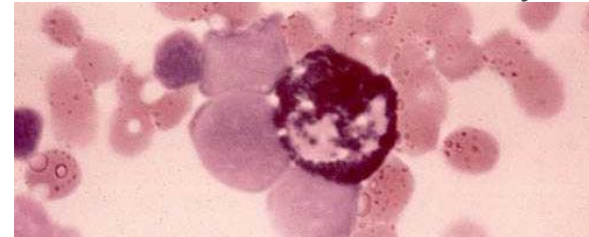
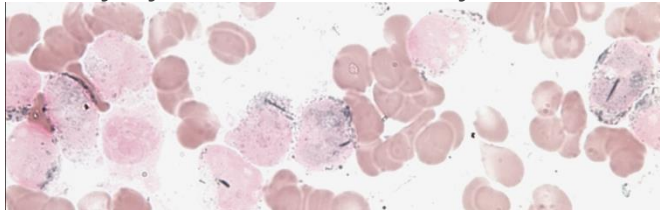
## ➤ neutrofilní alkalická fosfatáza

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



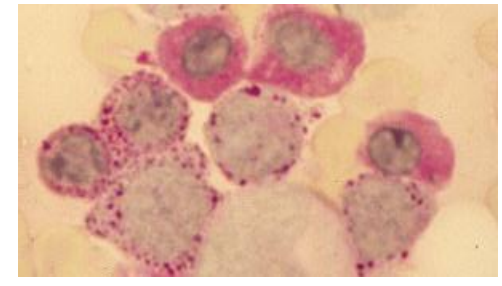
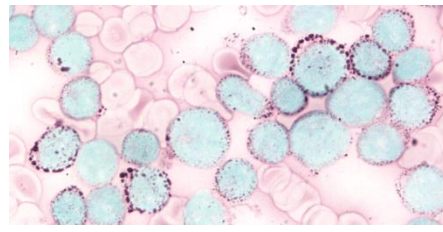
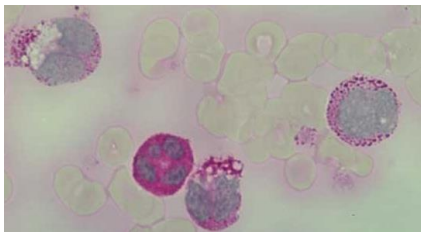
## ➤ myeloperoxidáza

- ✓ 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

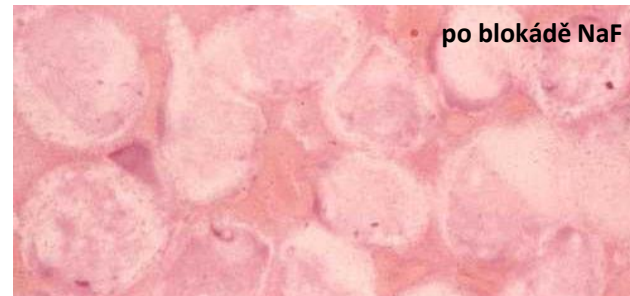
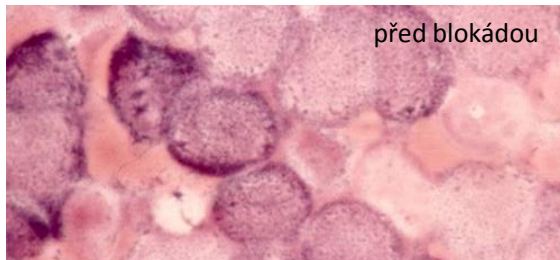
- ✓ hodnocení: typ pozitivita (difúzní, jemně nebo hrubě pozitivní granula)
  - fyziologická: myel.buňky (difúzní), monocytárníbuňky (jemná granula), lymfocyty (mohou být výraznější granula), NRBC (negativní)
  - patologická: LY u CLL (většinou výrazná granulární pozitivita), lymfoblasty u ALL (většinou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



# Cytochemická vyšetření

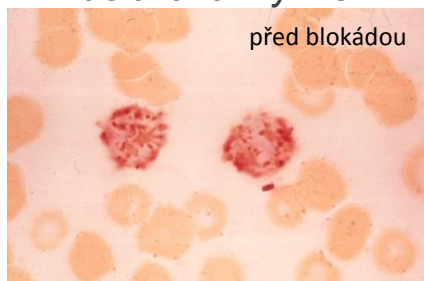
## ➤ nespecifická esteráza s blokádou fluoridem sodným

- ✓ 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



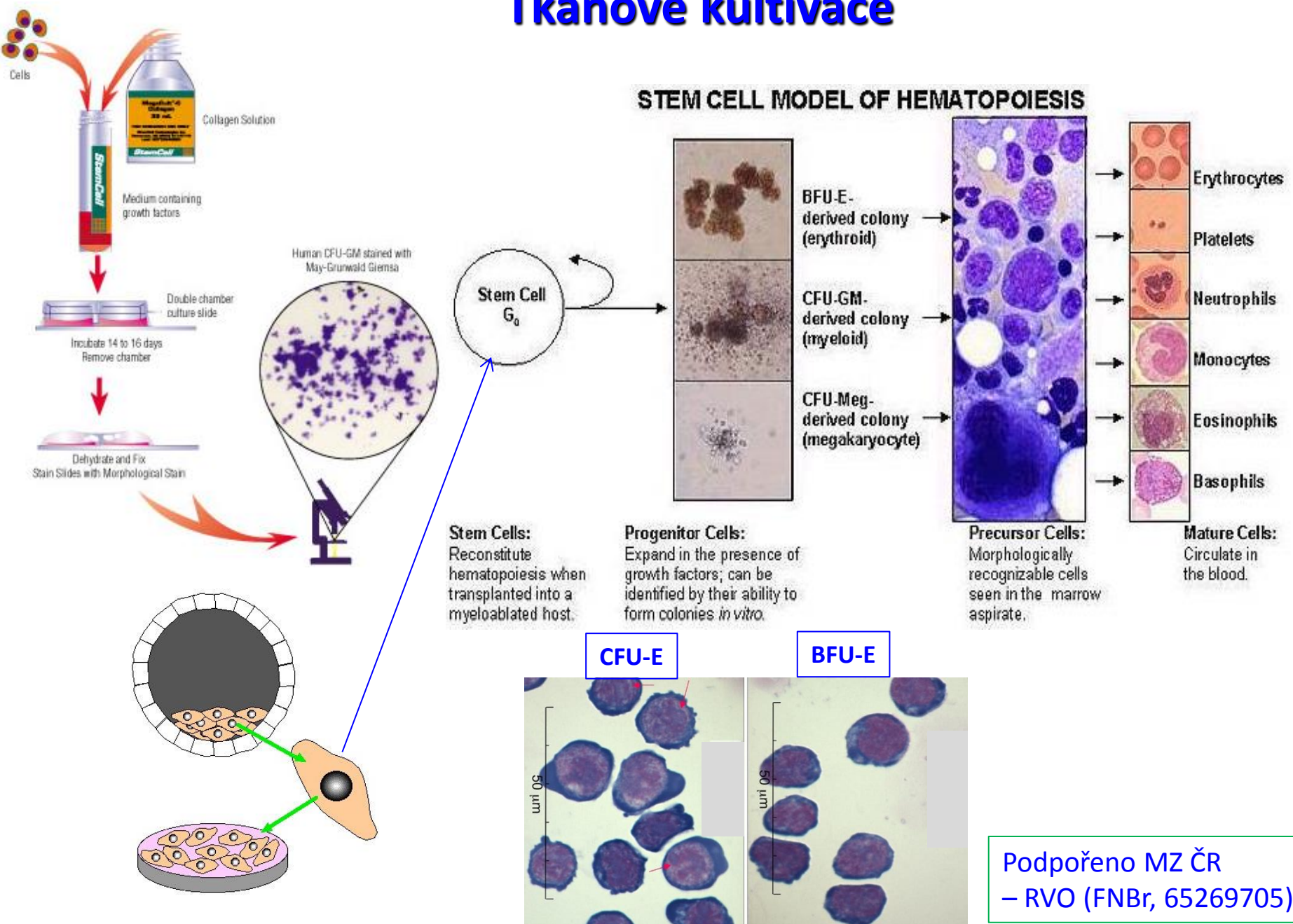
## ➤ kyselá fosfatáza s rezistencí na kyselinu L-vinnou

- ✓ 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



# Tkáňové kultivace

## STEM CELL MODEL OF HEMATOPOIESIS



Podpořeno MZ ČR  
 – RVO (FNBr, 65269705)