

# Počítání krevních buňek

## *Principy hematologických analyzátorů*

Bourková L., OKH FN Brno

# Hematologické analyzátory

- každý má svá jedinečná specifika
- dva základní principy měření:
  - optický
  - impedanční
- z měření získáváme informace o:
  - počtu buněk (*kvantitativní analýza*)
  - velikosti, tvaru a složení buňky (*kvalitativní analýza*)
- principy měření mohou být na jednotlivých analyzátorech různě kombinovány
- různé kombinace pak umožňují různě přesnou kvantitativní i kvalitativní analýzu všech prošlých buněčných elementů

# Principy měření

- absorpční spektrofotometrie
- impedanční analýza
- optická analýza

---

*Poznámka: dle typu analyzátoru lze počítat i více jak 10.000 buněk*

# Používaná diagnostika

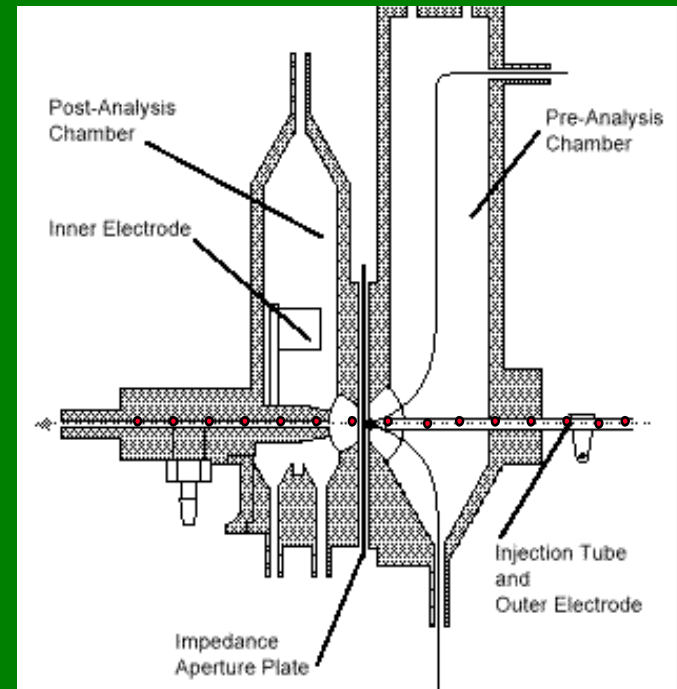
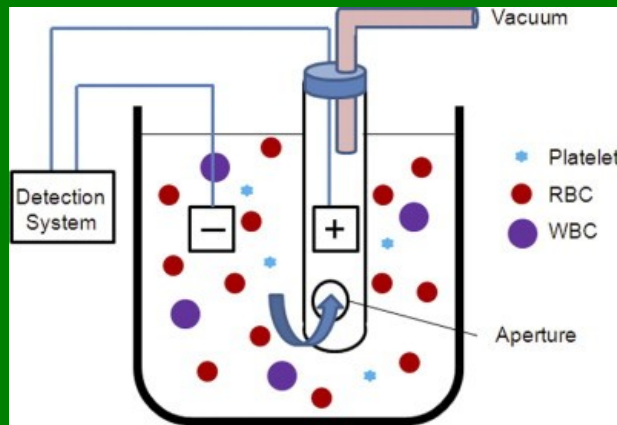
- analýza nesrážlivé periferní krve
  - odběr krve do solí EDTA (*K, Na*)
- ředící roztoky
  - *impedanční analýza*  
*vodivý roztok + nevodivá buňka*
  - *optická analýza*  
*opticky inaktivní roztok + opticky aktivní buňka*
- lyzační roztoky  
*hemolýza erytrocytů a dle typu analyzátoru může být i destrukce jiných krevních elementů*
- barvicí roztoky  
*barvení obsahu buňky (granula/enzymy, DNA, RNA)*
- čistící roztoky  
*čištění měřicího systému*

# Absorbční spektrofotometrie

- Metoda slouží ke stanovování množství hemoglobinu ve vzorku (*cca.  $\lambda = 540 \text{ nm}$* )  
(*bezkyanidové metody*)

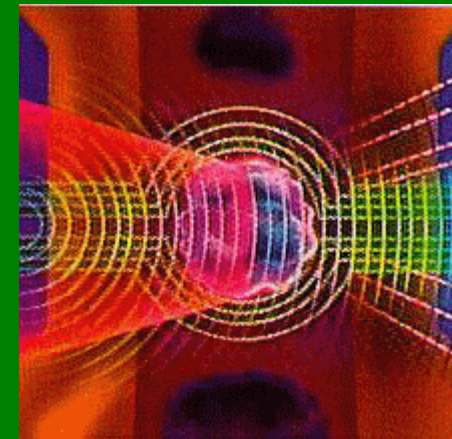
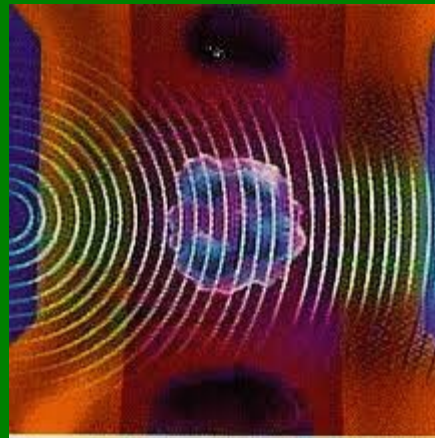
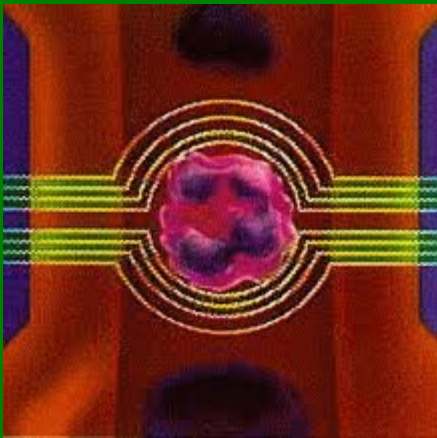
# Impedanční analýza - I

- mezi elektrodami je v apertuře standardní vodivost (vodivost zajišťuje diluent)
- buňky jsou v jedné kyvetě suspendovány diluentem (s katodou) → pomocí vakua jsou nasávány malým otvorem (aperturou) do druhé kyvetky s diluentem (s anodou)
- obě kyvety jsou přes aperturu propojeny vodivým diluentem
- při průchodu buňky aperturou se vodivost naruší/změní: vzniká impedanční impulz
- četnost impulzu  počet buněk  
velikost impulzu  velikost buňky



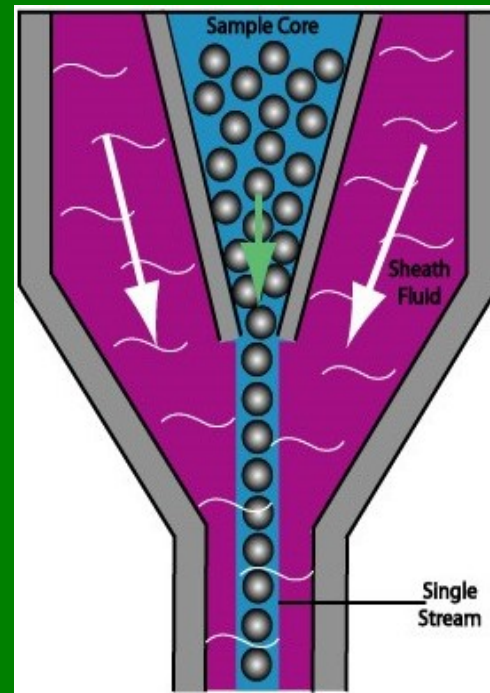
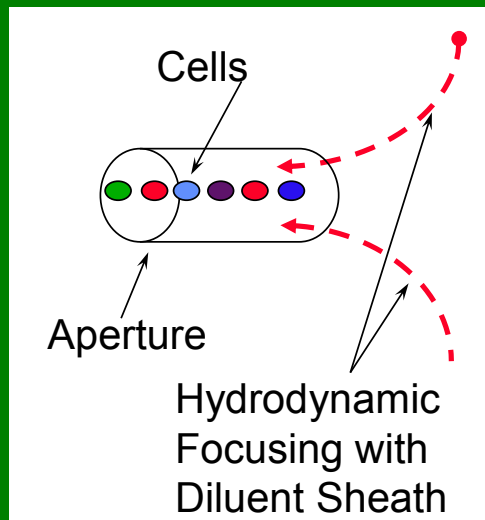
## Impedanční analýza - II

- měření může být doplněno vysokofrekvenční analýzou:
  - na stejnosměrné elektrické pole
  - je superponováno vysokofrekvenční elektrické pole
  - to pronikne cytoplazmou
  - pak se změří vysokofrekvenční vodivost buňky
  - ta odpovídá její fyzikálněchemické struktuře  
*(kvalitativní analýza buňky)*



# Hydrodynamická fokusace

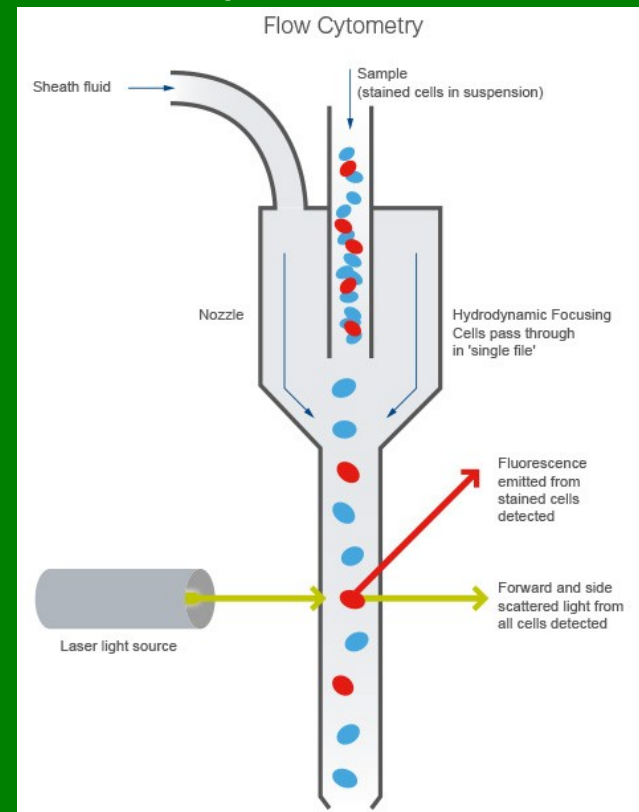
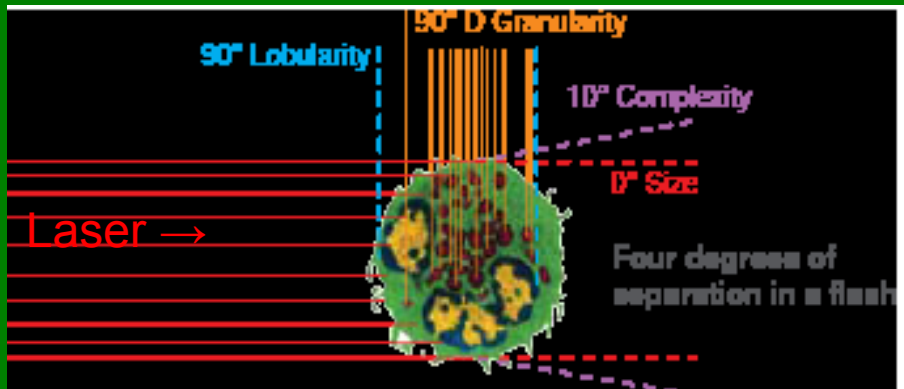
- využívá unášení jednotlivých buněk proudem kapaliny
- pro optickou analýzu





# Optická analýza

- využívá se průtoková cytometrie:  
(spolu s hydrodynamickou fokusací)
  - každá buňka je ozářena monochromatickým laserovým paprskem
  - po interakci buňky s paprskem se provádí analýza
  - analyzuje se samostatně každá buňka v suspenzi
- detekuje se světlo:
  - prošlé
  - odražené
  - depolarizované
  - fluorescence



# Detekce optické analýzy

## Analýza prošlého světla

- Detekce paprsku ve směru  $0^\circ$  udává hodnoty:
  - počet prošlých buněk
  - velikosti jednotlivých buněk

## Analýza odraženého a depolarizovaného světla

- Detekce paprsků v různých úhlech *(dle typu analyzátoru)*.
- Analýza může být doplněna cytochemickým barvením buněk.
  - Roztok se substrátem *(např. 4-chlor-1-naftol)* barví v leukocytech enzym peroxidázu.
    - *Reakcí enzymu se substrátem vznikají v buňce barevné intracelulární sraženiny, které ovlivňují úbytek světla a rozptyl paprsku.*
- Měření slouží k detekci tvaru a velikosti buňky, jádra a granularity cytoplazmy

# *Analýza fluorescence*

- Obarvení buňky speciálními barvami → ozáření buňky laserovým paprskem.
- Absorbce světla buňkou → emise světla o vyšší vlnové délce → detekce emitovaného světla
- Detekce: DNA, RNA nebo povrchové antigeny (CD znaky).

