

**Projekt sponzorován z fondů FRVŠ
2334/2010 – G3**



Vyšetřovací metody

**BARBORA LUDÍKOVÁ
DAGMAR POSPÍŠILOVÁ**

**DĚTSKÁ KLINIKA – FAKULTNÍ NEMOCNICE OLOMOUC
LÉKAŘSKÁ FAKULTA – UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Vyšetřovací metody



- Od počátku 80-tych let nástup automatizace hematologických vyšetřovacích metod
- základní údaje - počet erytrocytů, hemoglobin, hematokrit (=odvozená hodnota), střední objem erytrocytů (=měřená hodnota)
- další údaje - střední koncentrace Hb v ery (MCH) nebo míra anizocytózy erytrocytů (RDW = red cell width)

Hemoglobin



- Hodnotí se v objemové jednotce krve = jak erytrocytech i v plazmě
- Fyziologické hodnoty – pro dospělou populaci
ženy: 125 – 155 g / 1 litr
muži: 135 – 175 g / 1 litr
- **Zvýšení:** polycytémie, dehydratace
- **Snížení:** anemie, hyperhydratace

Hemoglobin g/l



VĚK	HLADINA
1-3dny	145-225
2 měsíce	90-140
6-12 let	115-155
12-18 let holky	120-160
12-18 let chlapci	130-160
Dospělost ženy	120-160
Dospělost muži	135-175

Fyziologické hodnoty pro dětský věk- dolní hranice normy



	Hemoglobin	Hematokrit	MCV
Věk	(g/dL)	(%)	(μ^3)
novorozenec	14	40	100
0,5 - 1,9	11	33	70
2 - 4	11	34	73
5 - 7	11,5	35	75
8 - 11	12	36	76
15 - 17:			
Žena	12	36	79
Muž	13	38	78
18 - 49:			
Žena	12	37	80

Hematokrit



- procentuelní zastoupení formovaných krevních elementů v objemové jednotce krve
- Fyziologické hodnoty – pro dospělé populaci
ženy: 0,35 – 0,46 35 - 46 %
muži: 0,38 – 0,49 38 - 49 %
- po narození: až 0,60 - postupné snížení, na počátku puberty až k 0,39
- na konci puberty již hodnoty dospělé populace
- **Snížení:** anemie, expanze ECT
- **Zvýšení:** polycytémie, dehydratace

Hematokrit - % objemu erytrocytů/ objem celé krve



1. den	48-69
2 dny	48-75
3 dny	44-72
2 měsíce	28-42
6-12 let	35-45
12-18 let holky	36-46
12-18 let kluci	37-49
Dospělost ženy	36-46
Dospělost muži	41-53

Hodnota erytrocytů



- udává se v hodnotách - $x 10^{12} / 1 \text{ liter}$ nebo $x 10^9 / 1 \text{ ml}$
- Fyziologické hodnoty pro dospělou populaci:
ženy: $3,8 - 5,2 \times 10^{12} / 1 \text{ liter}$
muži: $4,2 - 5,8 \times 10^{12} / 1 \text{ liter}$
- **Snížení:** anemie, expanze ECT
- **Zvýšení:** polycytémie, dehydratace

Retikulocyty



- (resp. retikulocytový index)
- je udáván v % všech buněk červené řady v krvi
- nezbytným vyšetřením v rámci dif.dg
- Norma: ženy i muži 0,5 – 1,5 %
 - a) při intravitálním barvení (brilantkresylová modř) je podíl RTC stanoven z nátěru
 - b) stanovením průtokovou cytometrií jsou udány absolutní hodnoty

Retikulocyty



- anémie se sníženou produkcí erytrocytů v kostní dřeni (počet retikulocytů $< 0,005$)
- anémie se zvýšenou produkcí erytrocytů v kostní dřeni (počet retikulocytů $> 0,020$)
- **Zvýšení:** krvácení, hemolýza (kompenzační činnost dřeně)
- **Snížení až vymizení:** útlum erythropoézy, útlum dřeně

Retikulocyty - %



VĚK	POČET
1 den	0,4-6,0
1 týden	méně 0,1 – 1,3
1-4 týdny	méně 0,1 – 1,2
5-6 týdnů	méně 0,1 – 2,4
7-8 týdnů	0,1 – 2,9
9-10 týdnů	méně 0,1 – 2,6
11-12 týdnů	0,1-1,3
Dospělost	0,5 – 1,5

Střední objem erytrocytu - MCV



- Fyziologické hodnoty pro dospělou populaci
= 87,5 fl (80-96fl)
- různá hodnota při anizocytóze erytrocytů- nespolehlivý ukazatel
- rozlišení normo-, mikro- a makrocytárních anemií
- **Rozdělení:**
- mikrocytární MCV < 80 fl
- normocytární MCV 80 – 96 fl
- makrocytární MCV > 96 fl
- Výpočet: hematokrit $\times 10^3$ / počet ery ($\times 10^{12}$ / 1 litr)

MCV



VĚK	MCV
Narození	98-118
1-3 dny	95-121
2 týdny	86-124
2 měsíce	77-115
3-6 měsíců	74-108
0,5-2 roky	70-86
2-6 let	75-87
6-12 let	77-95
12-18 let dívky	78-102
12-18 let chlapci	78-98

Střední koncentrace hemoglobinu -MCH



- Norma: 29 pg (28-33pg)
- **zvýšení:** makrocytární anemie,
- **snížení:** mikrocytární anemie
- Výpočet: $MCH = \frac{Hb \text{ (v g / 100 ml krve)}}{ery \text{ (x } 10^{12} \text{ / 1 liter)}}$

MCH-mean corpuscular hemoglobin pg/ buňka



VĚK	HMOTNOST
Narození	31-37
1-3 dny	31-37
1-4 týdny	28-40
2 měsíce	26-34
3-6 měsíců	25-35
0,5-2 roky	23-31
2-6 let	24-30
6-12 let	25-33
12-18 let	25-35
Dospělost	26-34

Střední koncentrace hemoglobinu v erythrocytech



- Norma = $34 \pm 2 \%$
- **zvýšení:** hereditární sférocytóza
- **norma až mírné snížení:** makrocytární anemie
- **snížení:** mikrocytární anemie
- Výpočet: $MCHC = \text{Hb (v g /100 ml krve)} \times 100 / \text{hematokrit}$

Distribuční šíře erytrocytů

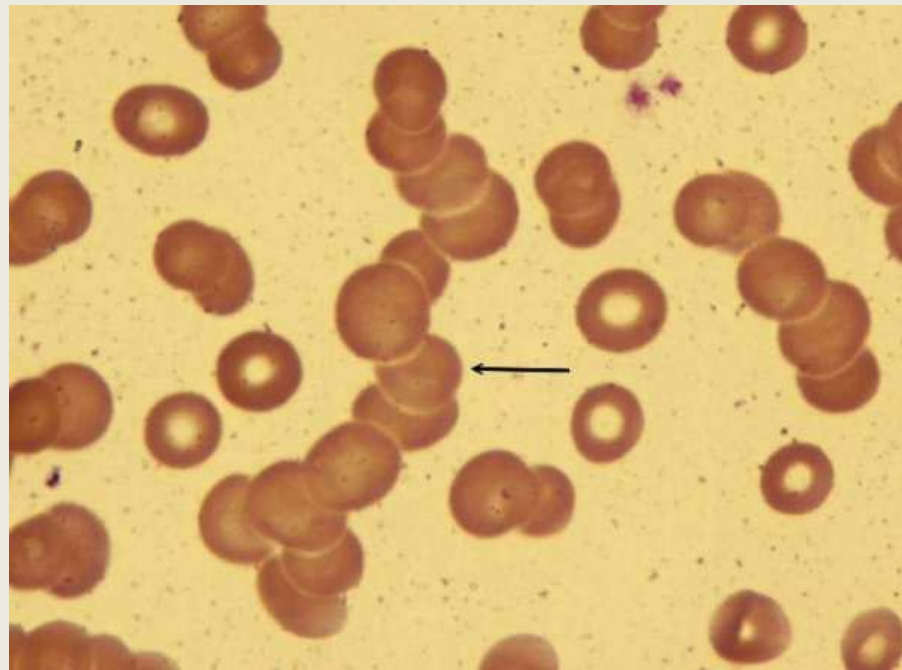


- RDW - Red cell Distribution Width
- charakterizuje uniformitu, resp. diverzitu populace červených krvinek
- Vychází z naměřených objemů jednotlivých buněk
- RDW - jako variační koeficient (CV) v procentech, lze se rovněž setkat s výsledkem v podobě směrodatné odchylky (SD) - v tomto případě jsou jednotkou femtolitry (fm) a hodnota je zhruba dvojnásobná
- Fyziologické hodnoty: 11-16%

Sedimentace erytrocytů (FW)



Rychlost sedimentace závisí na tvorbě agregátů erytrocytů – penízkovatění (suspenní stabilitě)



Sedimentace erytrocytů (FW)





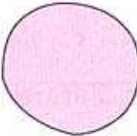
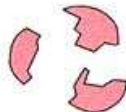






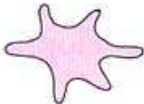

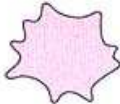

- **Zrychlení** - fibrinogen, imunoglobuliny, CRP a jiné proteiny akutní fáze, anémie
- **Zpomalení** - albumin, polycytémie
- Metoda Fahreus-Westergrenova (FW)
- **Norma:** 2-5 mm/h u mužů
3-8 mm/h u žen (↓ ery, ↑ fibrinogen)
- Nespecifické vyšetření – screening, sledování průběhu (dynamiky) nemoci

Zhodnocení morfologických změn erytrocytů



- softwarové vybavení analyzátoru -
dovede v reálném čase vyhodnotit velké množství naměřených parametrů a z jejich kombinací a respektování známých morfologických parametrů podává informace o atypiích hodnocených buněčných populací (anizocytóza, makrocytóza, hypochromie...)
- z krevního nátěru

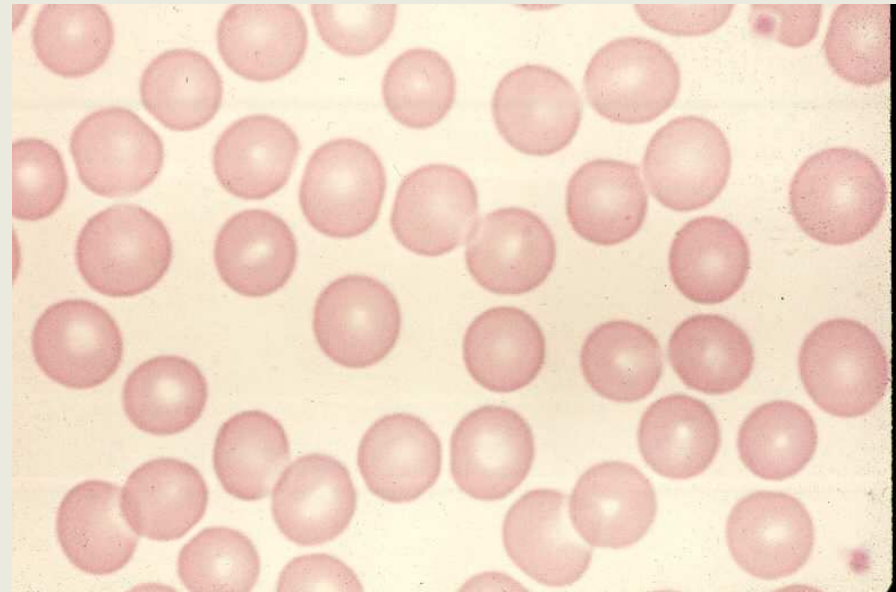
Variace velikosti (anizocytóza) a tvaru (poikilocytosis) erytrocytů u různých typů anémie

Red cell abnormality	Causes	Red cell abnormality	Causes
 Normal		 Microspherocyte	Hereditary spherocytosis, autoimmune haemolytic anaemia, septicaemia
 Macrocyte	Liver disease, alcoholism. Oval in megaloblastic anaemia	 Fragments	DIC, microangiopathy, HUS, TTP, burns, cardiac valves
 Target cell	Iron deficiency, liver disease, haemoglobinopathies, post-splenectomy	 Elliptocyte	Hereditary elliptocytosis
 Stomatocyte	Liver disease, alcoholism	 Tear drop poikilocyte	Myelofibrosis, extramedullary haemopoiesis
 Pencil cell	Iron deficiency	 Basket cell	Oxidant damage—e.g. G6PD deficiency, unstable haemoglobin
 Ecchinocyte	Liver disease, post-splenectomy	 Sickle cell	Sickle cell anaemia
 Acanthocyte	Liver disease, abetalipoproteinaemia, renal failure	 Microcyte	Iron deficiency, haemoglobinopathy

Normocyty – diskocyty



- Velikost
 - referenční meze: 7 – 7,5 mikro
 - MCV: 84 – 96 fl
- Tvar
 - bikonkávní, diskoidní
 - s centrálním projasněním

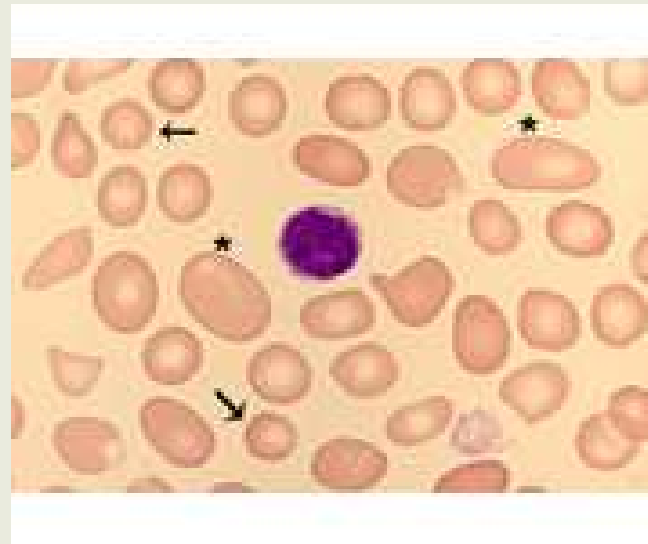


Zdroj: internetový vyhledavač: www.google.com- images,
<http://www.alhsa.com/forum/imgcache/288485.imgcache&imgrefurl>

Mikrocyty



- Velikost
 - $< 6,5$ mikro
 - $MCV < 84,0$ fl
- Klinický význam
 - talasémie
 - nedostatek železa
 - hemolytická anémie
 - anémie chronických onemocnění
 - sideroblastická anémie

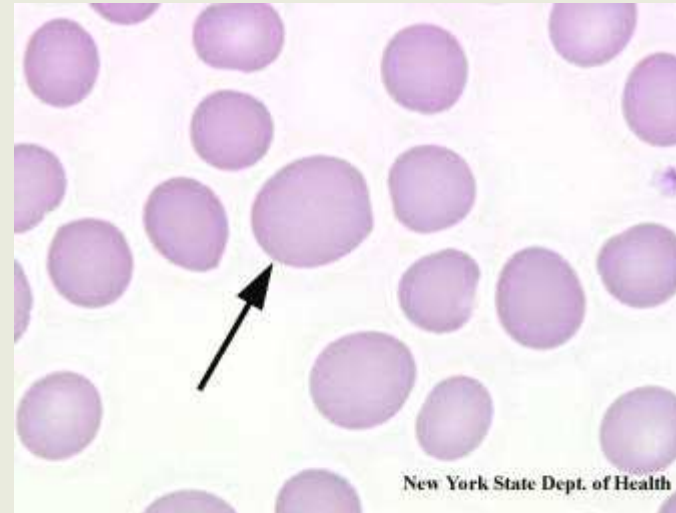


Zdroj: internetový vyhledavač: www.google.com- im, http://accessmedicine.net/loadBinary.aspx%3Ffname%3Ddicha%26filename%3Ddicha_I.A.009t.jpg&imgrefurl

Makrocyty



- Velikost
 - $> 7,8$ mikro
 - $MCV > 96,0$ fl
- Klinický význam
 - megaloblastová anémie
 - myelodysplastický syndrom
 - akutní ztráta krve
 - chemoterapie
 - onemocnění jater



Zdroj: internetový vyhledavač: www.google.com- images,
<http://www.wadsworth.org/chemheme/heme/glass/cytopix/slide001macro.jpg&imgrefurl>

Izocytóza

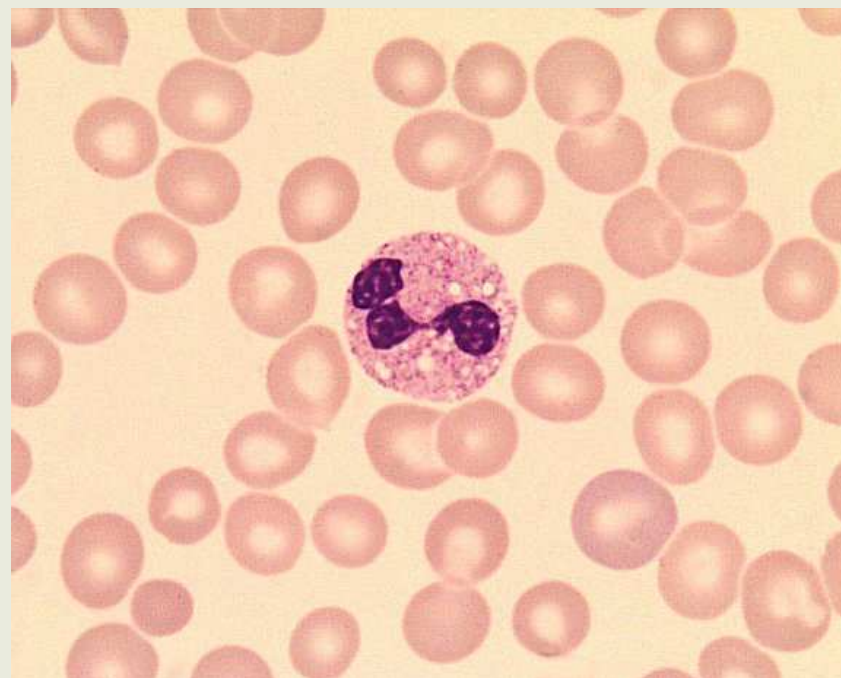


- RDW
 - < 15,2 %CV
 - méně často jako $SD < 54 \text{ fl}$
- ve vzorku přítomna homogenní populace erytrocytů
- normocytóza, mikrocytóza, makrocytóza

Anizocytóza



- RDW
 - $> 15,2 \%CV$
 - *méně často jako $SD > 54 fl$*
- ve vzorku přítomna heterogenní populace erytrocytů s různou velikostí buněk



Zdroj: internetový vyhledávač: www.google.com- images,
http://www.phasco.ir/phascoupfile/Slides/b_63037.jpg&imgrefurl=http://www.phasco.ir/SlideShow.aspx%3Fimg%3D63037&usg

Odchyłky barvitelnosti erytrocytů

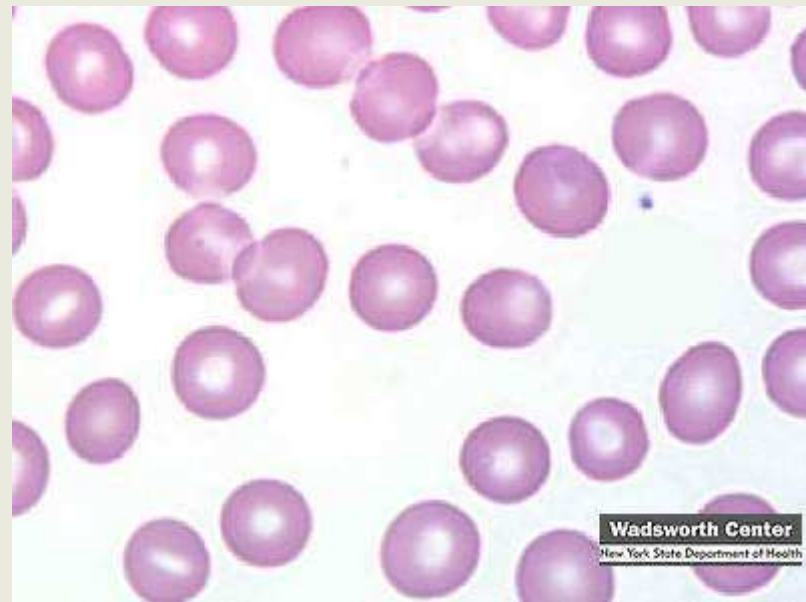


- normochromní
- hypochromní
- hyperchromní
- anizochromní
- polychromní

Normochromní erytrocyty



- MCHC: 310 – 370 g/l
- MCH: 28,0 – 34,0 pg
- erytrocyty s referenčním množstvím hemoglobinu v buňce

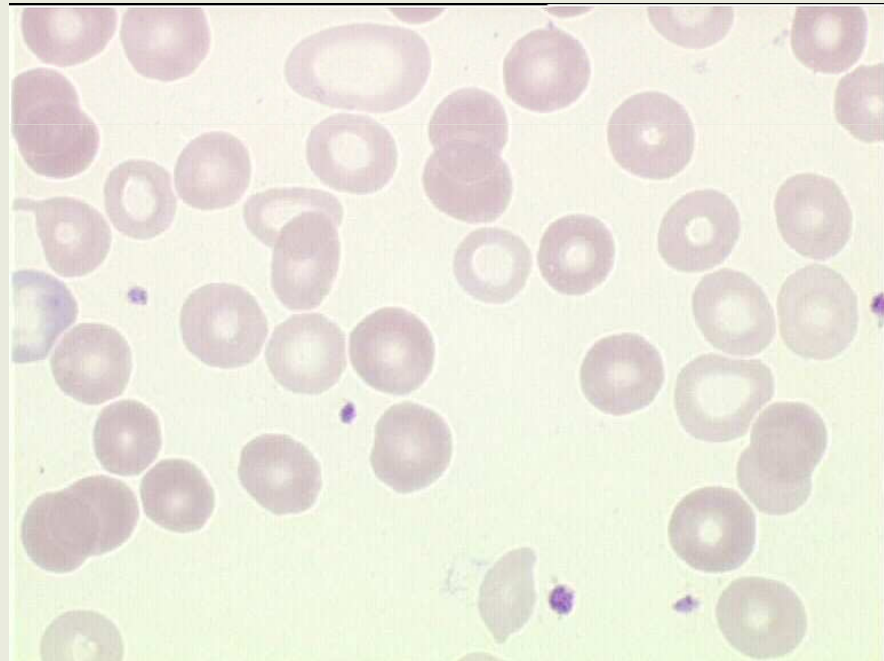


Zdroj: internetový vyhledavač: www.google.com-images,
<http://www.wadsworth.org/chemheme/heme/microscope/rbc.htm>

Hypochromní erytrocyty



- Velikost: $< 6,5$ mikro
- Popis
 - nižší množství Hb v buňce
 - projasnění tvoří více jak $1/3$ buňky



Zdroj: internetový vyhledavač: www.google.com- images,
http://www.google.cz/imgres?imgurl=http://www.med.univ-angers.fr/discipline/lab_hema/morphogrweb/10.jpg&imgrefurl

Hypochromní erytrocyty



Popis:

- anulocyt - velmi nízký Hb v buňce
- leptocyty – tenké, „placaté“ erytrocyty s velmi nízkým množstvím Hb v buňce
- *torocyty - artefakt, ostré rozhraní mezi nenabarveným středem a nabarveným prstencem (příčina: pomalé zasychání nátěru, voda ve fixačním roztoku)*

Hypochromní erytrocyty



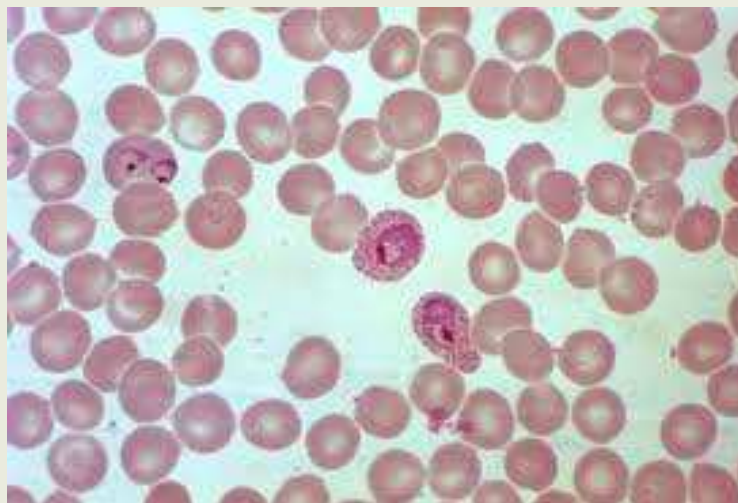
Klinický význam:

- talasémie
- nedostatek železa
- anémie chronických onemocnění
- sideroblastická anémie
- myelodysplastický
syndrom

Hyperchromní erytrocyty



- Popis
 - vyšší množství Hb v buňce
- Kinický význam
 - makrocytární anémie
 - dědičná sférocytóza

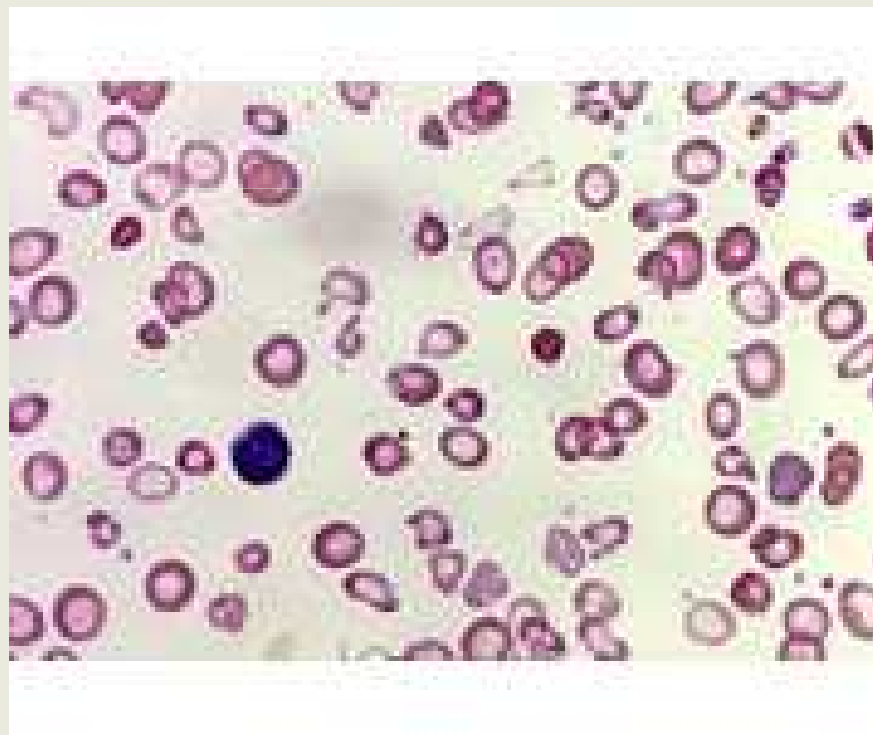


Zdroj: internetový vyhledavač: [www.google.com- images](http://www.google.com-images),
http://www.mc.edu/campus/users/huffoo/anemia_files/image012.jpg&imgrefurl

Anizochromní erytrocyty



- Popis
 - nestejné množství/koncentrace Hb v buňce
- Klinický význam
 - nedostatek železa
 - megaloblastová anémie
 - refrakterní anémie

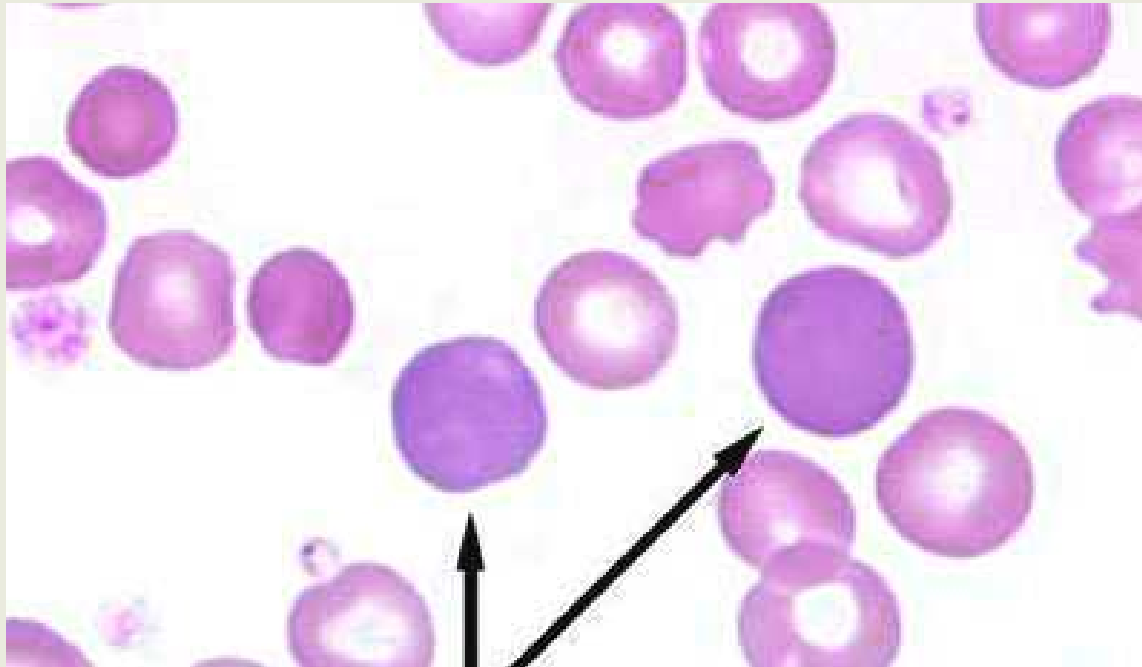


Polychromní erytrocyty



- Velikost: 8 – 11 mikro
- Popis
 - bazofilní zbarvení buněk (*rezidua RNA*)
- Klinický význam
 - hemolytické anémie
 - megaloblastová anémie
 - nedostatek železa
 - anémie chronických onemocnění
 - kongenitální dyserythropoetické anémie

Polychromní erytrocyty



Zdroj: internetový vyhledávač: [www.google.com- images](http://www.google.com-images),
http://3.bp.blogspot.com/_m7fiiV3WaEI/TC4NcHAi3-I/AAAAAAAAEDM/hlTn64RtNeM/s400/Polychromasia.jpg&imgrefurl

Poikilocyty- odchylky tvarů erytrocytů



- akantocyty
- echinocyty
- terčovité
- knizocyty
- stomatocyty
- sférocyty
- eliptocyty
- slzičkovité
- schistocyty
- keratocyty
- srpkovité

Akantocyty – *spur cells*



- Popis
 - ostny po obvodu buňky (*počet 2 – 20*)
 - většinou menší než normální erytrocyty
 - mívají až sférocytární tvar
- Příčina
 - poruchy lipidů v erytrocytární membráně
 - nevyvážená distribuce fosfolipidů mezi vnitřním a vnějším prostředím erytrocytu

Akantocyty



- Klinický význam
 - onemocnění jater
 - novorozenecká žloutenka
 - poruchy metabolismu lipidů
 - po splenektomii
 - po podávání heparinu



Zdroj: internetový vyhledávač:
http://www.google.cz/imgres?imgurl=http://www.wadsworth.org/c/hemheme/heme/microscope/pix/acanthocyte_nw.jpg&imgrefurl

Echinocyty – *crenated cells, burr cells*



- Popis
 - tupé výběžky po obvodu buňky (počet 10-30)
 - často artefakt
 - špatné zasychání nátěru
 - hyperosmolární prostředí
 - staré vzorky
 - *zastaralý název: morušovité erytrocyty*
- Příčina
 - poruchy lipidů v erytrocytární membráně
 - elektrolytická nevyváženost erytrocytu s vnějším prostředím
 - nepoměr povrchu vnitřní a vnější vrstvy membrány

Echinocyty



- Klinický význam
 - deficit pyruvátkinázy
 - efekt salicylátů a barbiturátů
 - novorozenci
 - urémie



Copyright FNOL

Terčovitě erytrocyty – *codocyty, target cells*

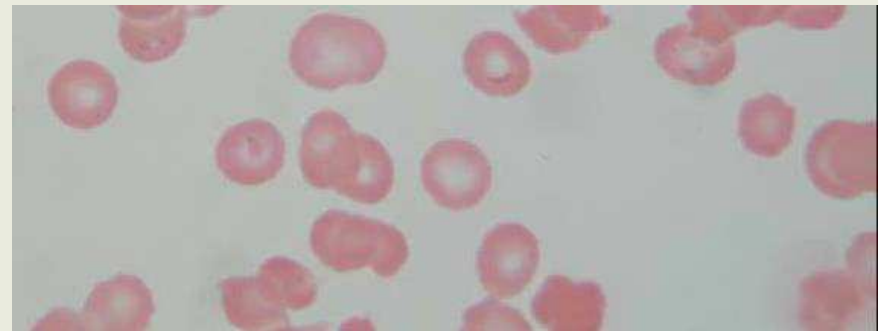


- Popis
 - centrálně zbarvený terč
 - kondenzace hemoglobinu s okolním projasněním
- Příčina
 - akumulace membránových fosfolipidů a cholesterolu
 - nepoměr zvětšeného povrchu buňky k objemu buňky

Terčovité erytrocyty



- Klinický význam
 - hypochromní anémie (talasémie, hemoglobinopatie, sideropenická anémie)
 - megaloblastová anémie
 - myelofibróza
 - po splenektomii
 - ledvinová onemocnění
 - onemocnění jater



Copyright FNOL

Knizocyty – *bridge cells, pinched cells*

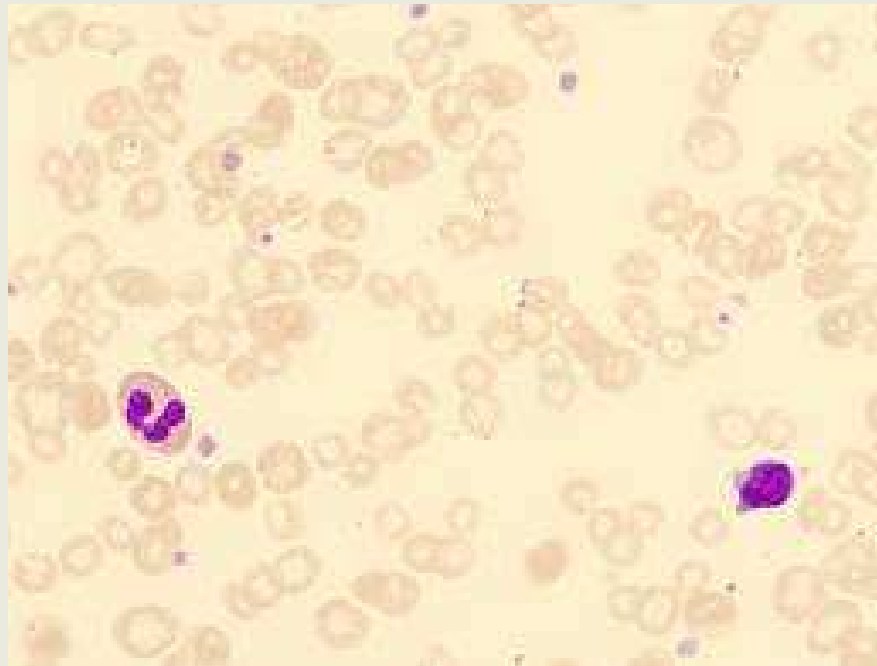


- Popis
 - „most“ z hemoglobinu přes světlé centrální pole erytrocytu
 - erytrocyt má dvě nebo více vpáčení membrány (*trikonkávní tvar*)
 - často mikrocyty
- Příčina
 - akumulace membránových fosfolipidů a cholesterolu
 - nepoměr zvětšeného povrchu buňky k objemu buňky

Knizocyty



- Klinický význam
 - hemolytické anémie
 - hemoglobinopatie
 - talasémie
 - sférocytóza
 - onemocnění jater
 - pankreatitida



Zdroj: internetový vyhledavač: www.google.com - images,
http://www.sekk.cz/EQA/2010/DIF310_A01.jpg&imgrefurl

Stomatocyty – *mouth cells*

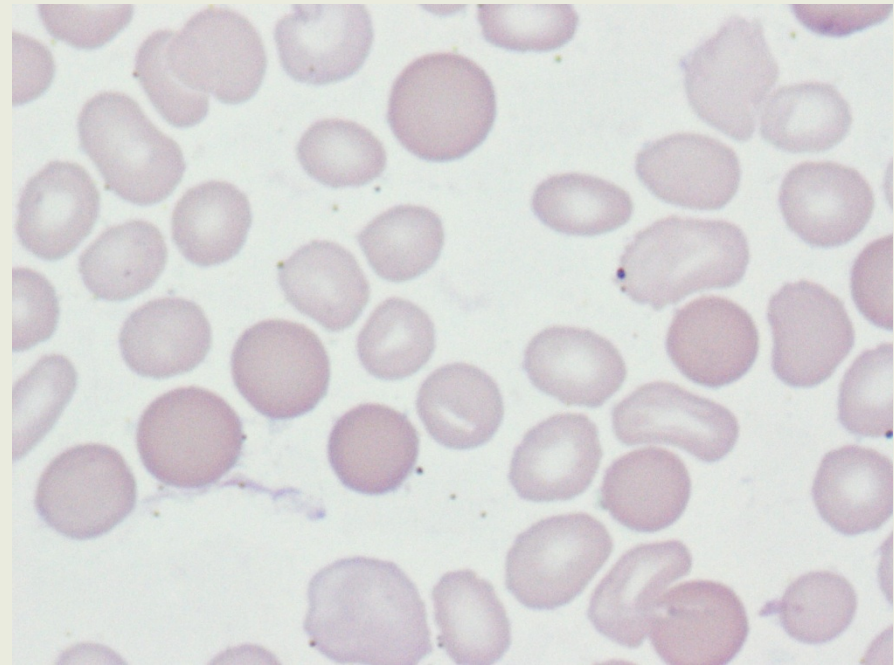


- Popis
 - prodloužená oblast projasnění přes střed erytrocytu
- Příčina
 - elektrolytická nerovnováha erytrocytu v hypotonickém prostředí
 - u tenkých nátěrů - arteficiálně

Stomatocyty



- Klinický význam
 - hemolytické onemocnění novorozenců při Rh inkompatibilitě
 - dědičná stomatocytóza
 - onemocnění jater
 - kardiovaskulární onemocnění
 - po otravách



Copyright FNOI

Sférocyty - *mikrosferocyty*

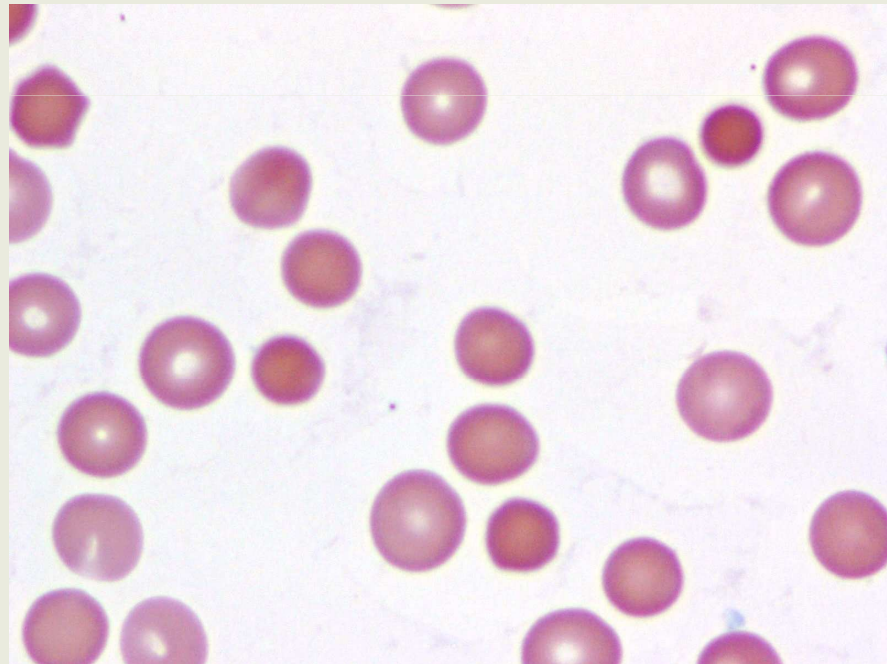


- Velikost: 6,1 – 7,0 mikro
- Popis
 - nemají bikonkávní tvar – kulovité
 - syté, kulaté, malé, tmavé erytrocyty
- Příčina
 - defekt fosfolipidů buněčné membrány
 - snížení poměru membránového povrchu k cytoplazmatickému objemu

Sférocyty



- Klinický význam
 - dědičná sférocytóza
 - některé hemolytické anémie (AIHA)
 - hypersplenismus



Copyright FNOI

Eliptocyty / ovalocyty



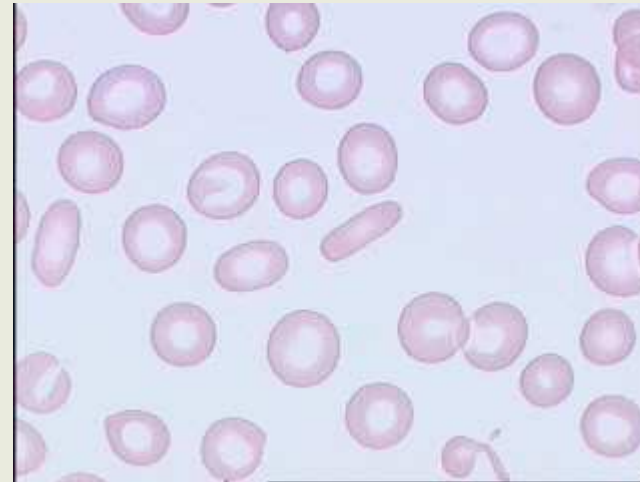
- Popis
 - oválný tvar (*eliptocyt více než ovalocyt*)
 - někdy až tvar doutníku
- Příčina
 - neúplná proteinová struktura membrány
 - ireverzibilní tvar vzniká po průchodu kapilárami

Eliptocyty



Klinický význam:

- dědičná eliptocytóza
- megaloblastová anémie
- talasémie
- sideroblastická anémie
- nedostatek železa
- vrozená dyserythropoetická anémie



Zdroj: internetový vyhledávač: www.google.com- images,
http://colleges.weber.edu/chp/cls/CLS_On_Campus/cls1123/rbc/images/ovalocyte.JPG&imgrefurl

Slzičkovité erytrocyty – *dakryocyty, teardrop*

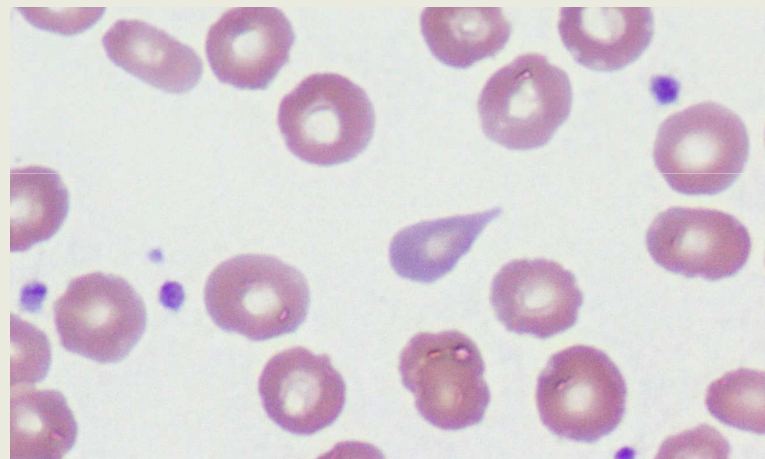


- Popis
 - kapkovitý tvar prodloužený k jednomu pólu
 - často mikrocyty
 - erytrocyty bývají hypochromní
- Příčina
 - mechanická – ireverzibilní deformace erytrocytů

Slzičkovité erytrocyty



- Klinický význam
 - myelofibróza
 - talasémie
 - perniciózní anémie
 - některé hemolytické anémie
 - tuberkulóza
 - metastázy do kostní dřeně



Copyright FNOI

Schistocyty

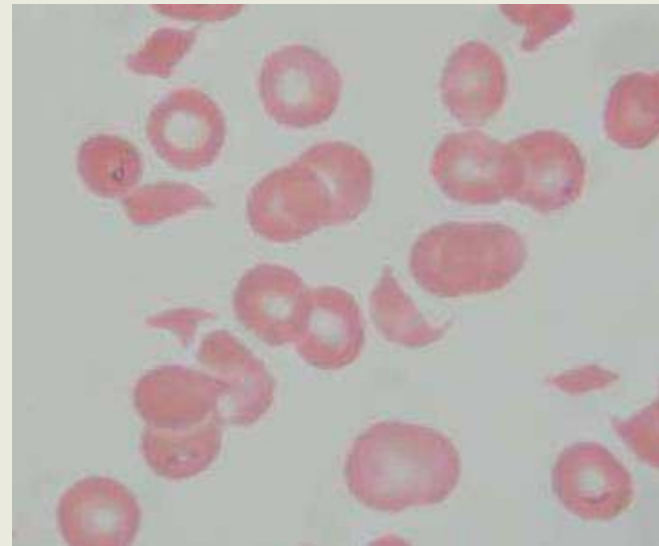


- Popis
 - fragmenty erytrocytů
- Příčina
 - mechanická – fragmentace erytrocytů
 - útlak fibrinovými vlákny

Schistocyty



- Klinický význam
 - mikroangiopatická hemolytická anémie
 - traumatická hemolytická anémie
 - hemolytická anémie
 - urémie



Copyright FNOI

Keratocyty -*blister cells, horn cells*

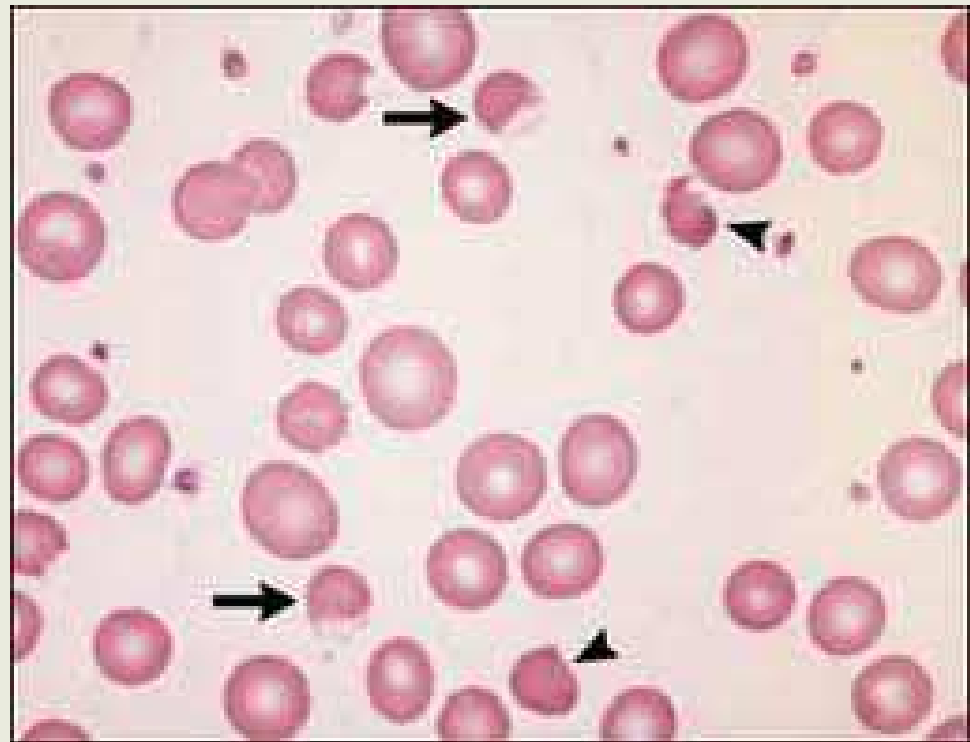


- Popis
 - ruptura nebo vpáčení membrány
 - jeví se jako: pseudo vakuola na okraji („*rohatý erytrocyt, po prasknutí „vakuoly“*“)
 - erytrocyty s menším vpáčením - degmacyty (*určitý druh schistocyt*)
- Příčina
 - precipitace hemoglobinu

Keratocyty



- Klinický význam
 - mikroangiopatická hemolytická anémie
 - akutní krvácivé stavy
 - deficit pyruvátkinázy
 - deficit G6PDH
 - nestabilní hemoglobiny
 - toxické vlivy



Srpkovité erytrocyty - *drepanocyty, sickle cells*

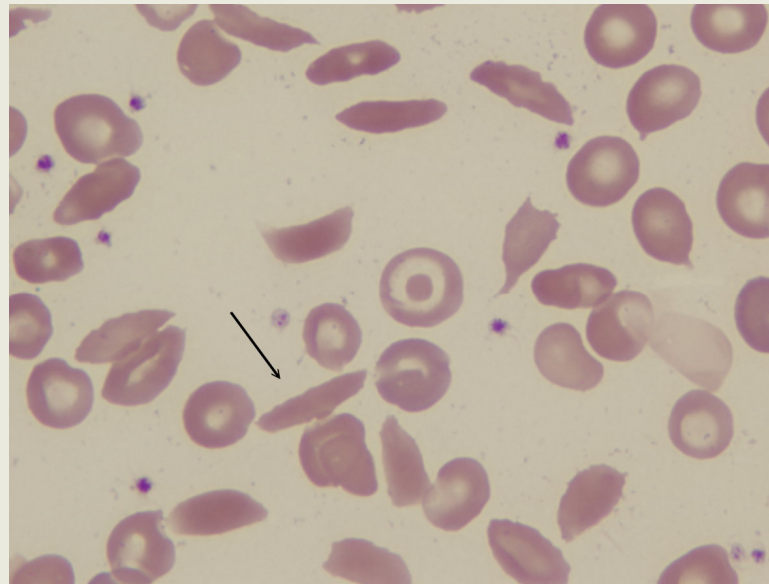


- Popis
 - srpkovitý tvar
- Příčina
 - polymerizace hemoglobinu S do dlouhých rigidních krystalů

Srpkovité erytrocyty



- Klinický význam
 - srpkovitá anémie
 - Hemoglobinopatie (hemoglobin SS, SC, SD, S- β talasémie)



Inkluze v erytrocytech



- bazofilní tečkování
- Howell-Jollyho tlíska
- Cabotovy prstence
- Pappenheimerova tělíška

Bazofilní tečkování



- Popis
 - tmavomodrá granula v erytrocytu
- Příčina
 - zbytky ribozomů,
mitochondrií,
siderozomů

Bazofilní tečkování

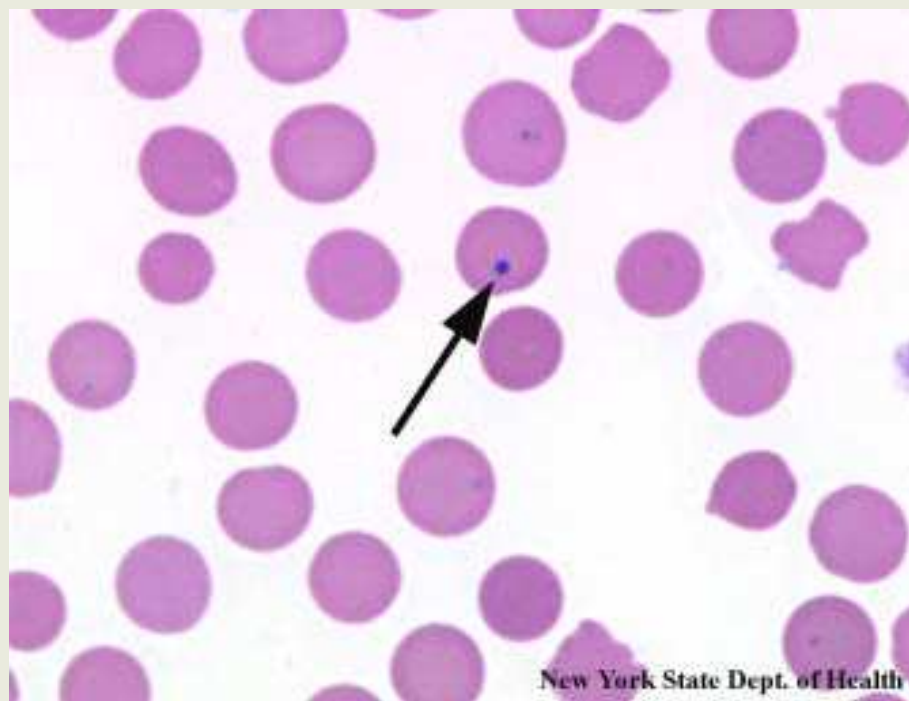


- Klinický význam
 - poruchy syntézy hemoglobinu
 - otrava olovem
 - talasémie
 - megaloblastová anémie
 - sideroblastická anémie
 - alkoholismus

Howell-Jollyho tělíska



- Popis
 - purpurově zbarvená kulatá tělíska v erythrocytech
- Příčina
 - jaderné fragmenty
(*obsahují DNA*)



Zdroj: internetový vyhledávač: www.google.com- images,
<http://www.wadsworth.org/chemheme/heme/glass/cytopix/slide005howell3.jpg&imgrefurl>

Howell- Jollyho tělíška

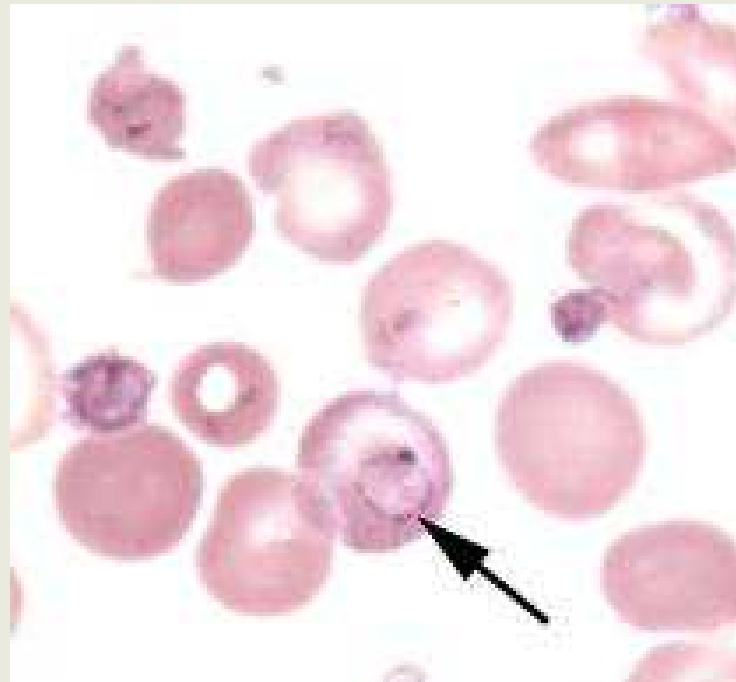


- Klinický význam
 - hemolytická anémie
 - splenektomie
 - srpkovitá anémie
 - megaloblastová anémie
 - obecně při poruchách vyzrávání jádra buňky
 - alkoholismus

Cabotovy prstence



- Popis
 - tenké vlákno (i stočené) uvnitř erytrocytu
 - purpurové zbarvení
- Příčina
 - pravděpodobně mikrotubuly z mitotického vřeténka nebo zbytky jaderné membrány



Zdroj: internetový vyhledávač: www.google.com- images,
http://www6.ufrgs.br/favet/imunovet/molecular_immunology/Cabot_ring.jpg&imgrefurl

Cabotovy prstence



- Klinický význam
 - těžká stádia anémií
 - megaloblastová anémie
 - dyserythropoéza

Pappenheimerova tělíska

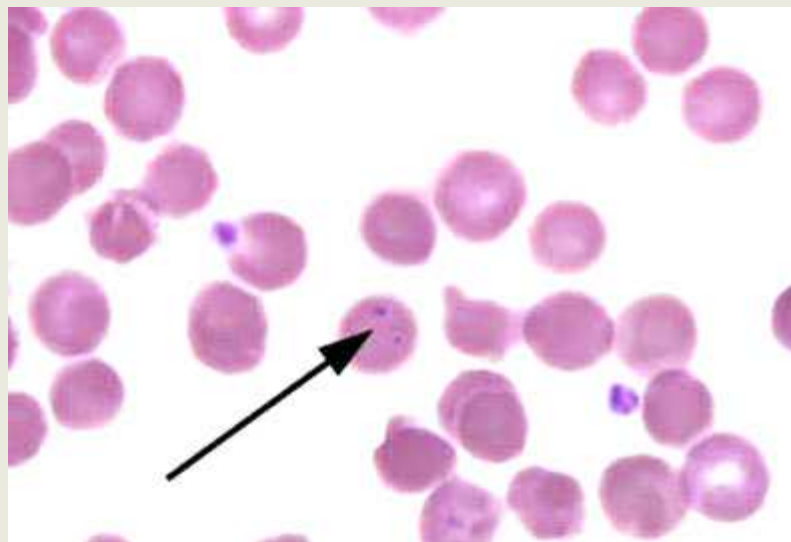


- Popis
 - červenovofialová jednotlivá nebo četnější tělíska v erythrocytech
- Příčina
 - granula obsahují zásobní železo, agregují s mitochondriemi a ribozomy

Pappenheimerova tělíska



- Klinický význam
 - dyserythropoéza
 - sideroblastická anémie
 - megaloblastová anémie
 - splenektomie
 - talasémie



Zdroj: internetový vyhledavač: www.google.co,
<http://www.medtech.mahidol.ac.th/mtthai/eLearning/AutomateReport/Pappenheimer-body.jpg&imgrefurl>

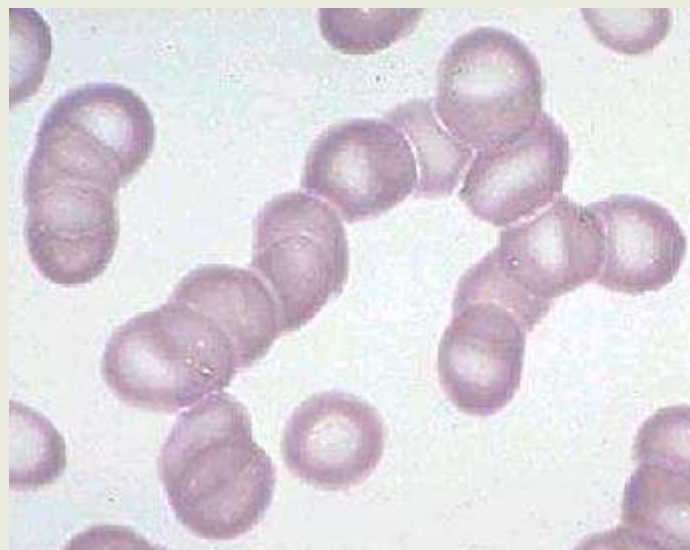
Penízkovatění erytrocytů - *rouleax*



- Popis
 - erytrocyty tvoří „řetízky“ (tři a více buněk)
- Příčina
 - zvýšené množství plazmatických proteinů navázaných na povrchu erytrocytů

Penízkovatění erytrocytů - *rouleaux*

- Klinický význam
 - mnohočetný myelom
 - monoklonální gamapatie
 - maligní lymfomy
 - chronická onemocnění jater
 - chronické infekce



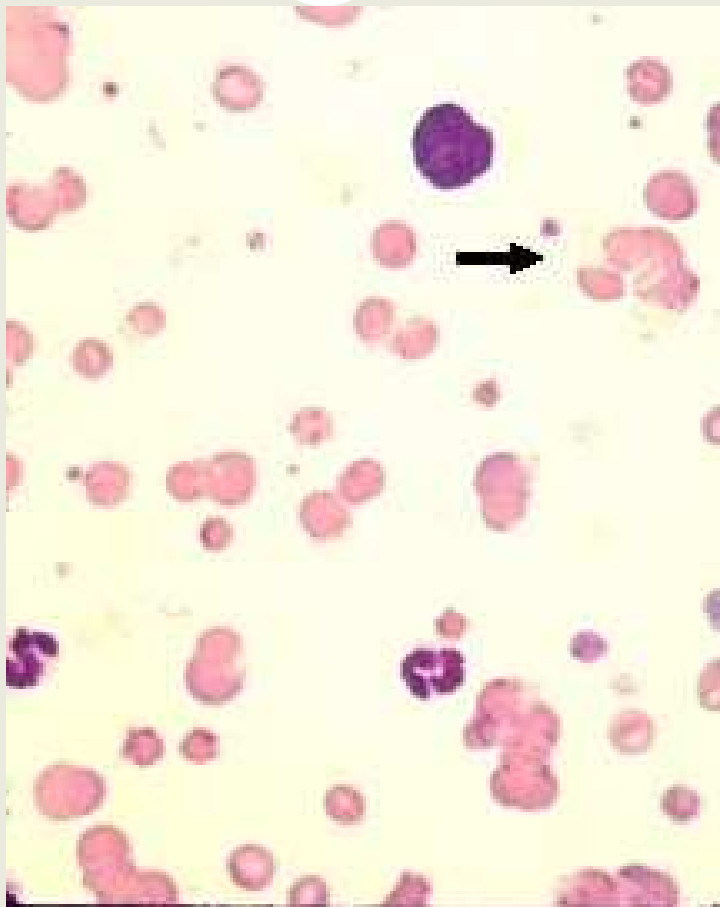
Zdroj: internetový vyhledávač: www.google.com- images,
http://www6.ufrgs.br/favet/imunovet/molecular_immunology/pathohomoti/ssueblood_RBC.html&usg

Aglutinace erytrocytů



- Popis
 - seskupené erytrocyty do větších, i menších shluků
- Příčina
 - přítomnost protilátek (*nejčastěji chladové*)
- Klinický význam
 - paroxysmální chladová hemoglobinurie
 - potransfuzní inkompatibilita

Aglutinace erytrocytů



Vyšetření kostní dřeně



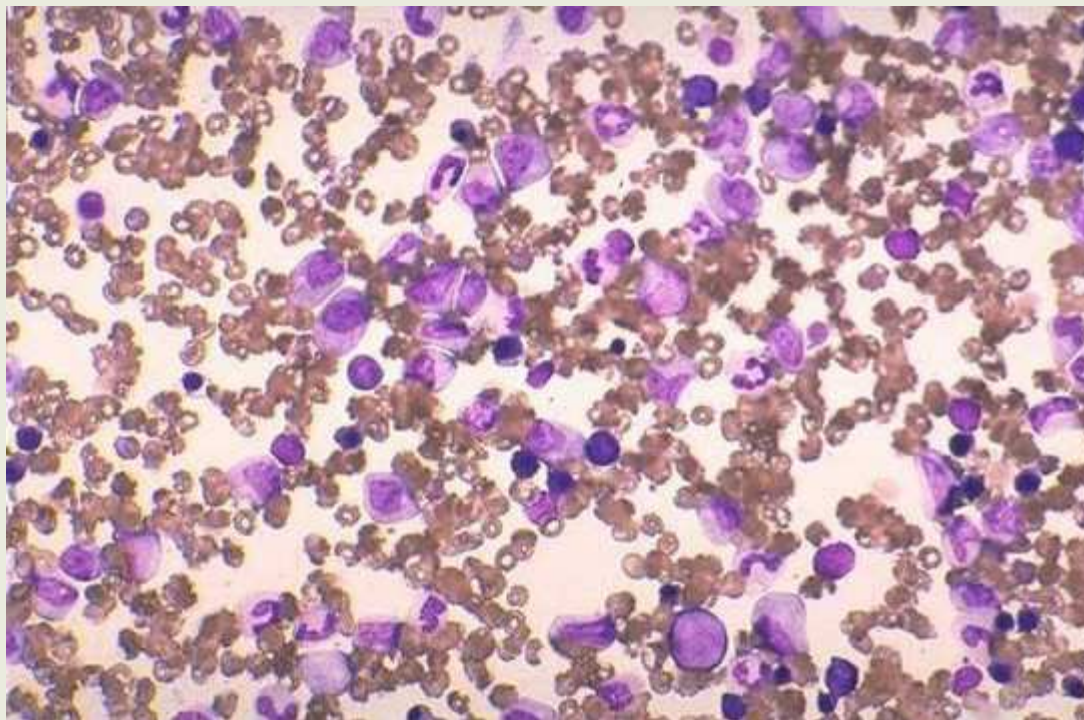
- **Sternální punkce:** z manubria sterni, spina/crista iliaca superior posterior
- aspirace dřeňové krve umožňuje pouze provést cytologický rozbor (např. cytogenetika, FACS, molekulární biologie)
- **Trepanobiopsie:** ze spina iliaca superior posterior
- umožňuje získat vzorek kostní tkáně- nezbytné pro provedení histologického rozboru kostní tkáně

Vyšetření kostní dřeně



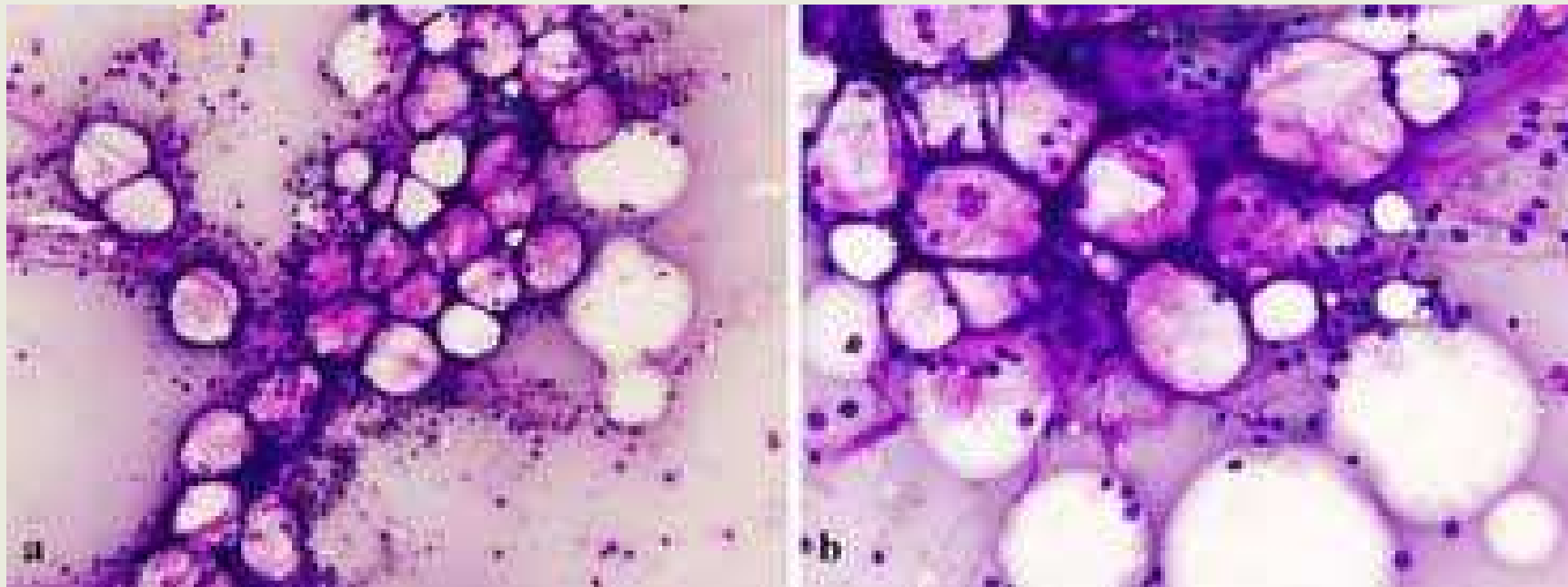
- normo-, hypo-, hypercelularita, dysplazie kostní dřeně
- množství blastů, normálních a patologických sideroblastů
- rozlišení mladých prekursorových buněk a leukemických blastů (průkaz enzymatických aktivit, chromozomových změn, membránových diferenciačních znaků, onkogenů a další)

Normocelulární dřeň



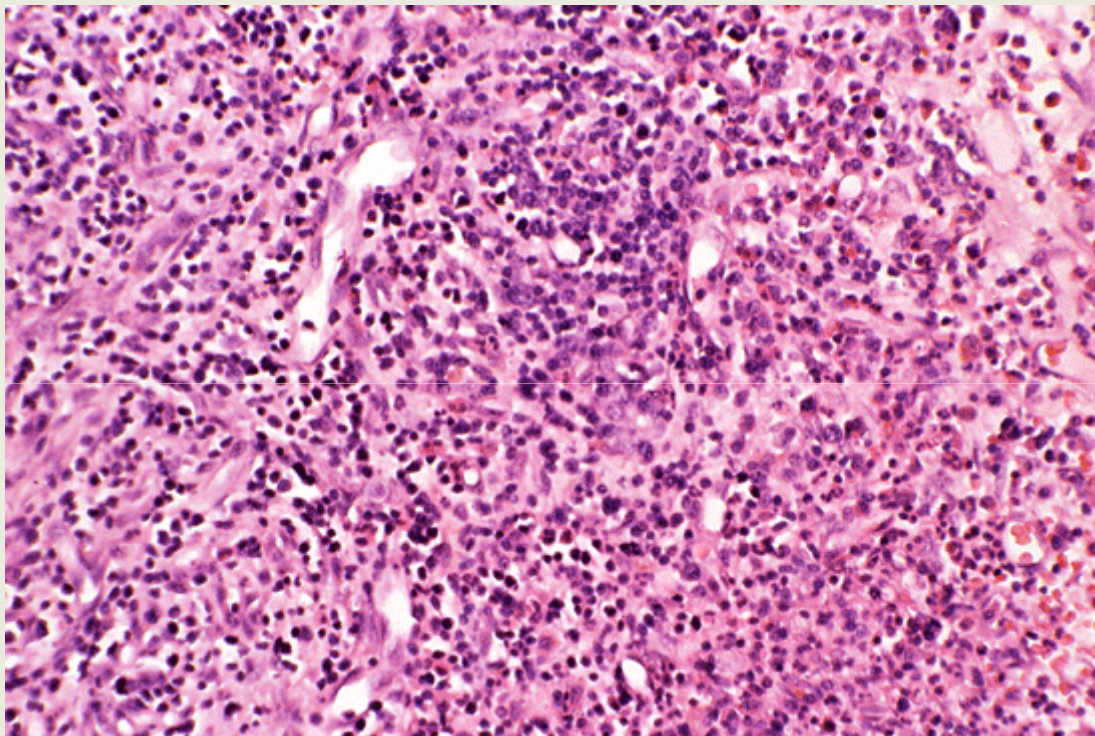
Zdroj: internetový vyhledávač: [www.google.com- images](http://www.google.com-images),
<http://bcl.med.harvard.edu/proteomics/proj/raspap/bm-normal.jpg&imgrefurl>

Hypocelulární dřev



Zdroj: internetový vyhledávač: [www.google.com- images](http://www.google.com-images),
<http://biomedcentral.inist.fr/images/1752-1947-3-27-2.jpg&imgrefurl>

Hypercelulární dřev



Zdroj: internetový vyhledavač: www.google.com- images,
<http://moon.ouhsc.edu/kfung/JTY1/Com04/Com04Image/Com401-1-B3.gif&imgrefurl>

Erythropoetin



- Určení: metodou ELISA nebo RIA v séru nebo v plazmě
- Fyziologické hodnoty: 0 až 19 (někde uváděno až 24) mU/ml – závisí na použité metodě
- **Snížená hladina (produkce):** onemocnění ledvin, anemie z nedostatku erythropoetinu, karence proteinů, zvýšení p_aO_2 , polycythaemia vera
- **Zvýšená hladina (produkce):** sekundární polycytémie, snížení p_aO_2 , sideropenické a některé hemolytické anemie

Železo



- Obsah železa v organismu = 50 – 70 mmolů, tj. 3 – 4 g.
- Hemoglobin - 65 – 75 %
- Myoglobin 3 – 5 %
- Enzymy s hemovou skupinou 0,2 %
- Plazma 0,1 % vázaného na transferin
- Feritinu a hemosiderin 15 – 20 %

Balance Fe



- **Množství železa v organismu zůstává během života konstantní, je udržováno rovnováhou mezi příjmem a ztrátami železa**
 - běžnou potravou přijímá člověk denně 10 - 20mg
 - do vnitřního prostředí se dostane pouze 5 – 10%
 - průměrné denní ztráty u mužů jsou 0,5 - 1mg a 1 - 2mg u žen
- **u člověka neexistuje fyziologický mechanismus exkrece nadbytečného železa**
 - deskvamací buněk sliznice GIT a u žen menstruační krvácení

Metabolismus Fe



- **příjem železa (anorganické a hemové)**
 - probíhá v duodenu a proximálním jejunu
 - absorpce do a z enterocytu je vysoce regulovaný proces
 - cirkulace železa a příjem železa buňkami
 - transferin - 2 vazebná místa pro Fe^{3+}
 - za normálních podmínek (saturace kolem 30%) je poměr diferického a monoferického transferinu 1:2

Metabolismus Fe



- receptor pro transferin (TfR1 a 2) na buněčné membráně buněk umožňuje transport železa do nitra buňky
- nejvíce se vyskytuje na membránách buněk tvořících hemoglobin (erytroblasty) nikoliv však na zralých erytrocytech

Metabolismus Fe



- příjem železa do buňky regulovaný jeho aktuální potřebou
- skladování a recyklace
 - hlavním místem skladování železa jsou játra (hepatocyty) a retikuloendoteliální systém (RES)
 - buněčný a sérový feritin (až 4000 atomů Fe)

Stanovení Fe v séru



Tranzitní pool Fe je stanovován jako **sérové železo** (veškeré železo je vázáno na transferin) a jako **TIBC** (celková vazebná kapacita železa).

Norma hladiny sérového Fe:

novorozenci	17,90 – 44,75 μmol / 1 litr
děti	8,95 – 21,48 μmol / 1 litr
ženy	7,16 – 26,85 μmol / 1 litr
muži	8,95 – 28,64 μmol / 1 litr

Celková vazebná kapacita železa-TIBC



- **Norma:** 44,75 – 71,60 μmol / 1 litr
- Zvýšené hodnoty TIBC jsou při sníženém Fe v séru (více neobsazeného transferinu)

Saturace transferinu



- někdy se udává jako % saturace transferinu Fe
- **Výpočet:** hladina sérového železa : TIBC
- **Norma:** 20 – 55 %

Snížené hodnoty při **deficitu Fe**

Snížení saturace transferinu spolu s nízkými hodnotami **TIBC**:
hemochromatóza, hemosideróza, onem. jater

Ferritin



- Hodnota slouží k posouzení stavu zásob železa v organismu
- Stanovení v séru
- Norma: $\mu\text{g} / 1 \text{ liter}$ nebo ng / ml

novorozenec	25 – 200
1. měsíc	200 – 600
6. měsíc – 15 let	7 – 140
ženy	12 – 150
muži	15 – 150
- **Snížení:** lze detekovat již v počátečních stadiích sideropenické anémie
- **Zvýšení:** u anémií chronických chorob či nádorů

Solubilní transferinový receptor



- Hladina je stanovována pomocí ELISA
- **Zvýšení:** deficit železa, intenzivní erytropoéza ,hemolytické anemie, β -thalasemie, polycytémie (zvýšená exprese TfR na buněčných membránách)
- **Snížení:** útlum kostní dřeně, chronické selhání ledvin

Folát



- kofaktor enzymů během různých metabolických procesů v buňkách (syntéza nukleových kyselin a mitochondriálních proteinů, metabolismus aminokyselin)
- úzce svázaný s vitaminem B12.
- **Klinické aplikace:**
Snížený přísun kyseliny listové má podobné účinky jako nedostatek vitaminu B12 a způsobuje nutriční anemii
- Nemusí být nutně spojeno jenom s nedostatkem folátů v potravě, -může souviset s alkoholismem, nebo strukturálním a funkčním poškozením trávicího traktu.

Folát



- Stálý nedostatek folátů vede k megaloblastické anémii
- Pro stanovení diagnózy a etiologie onemocnění je vhodné provést také stanovení vitamínu B12.
- Referenční hodnoty: 4.5 - 20.7 nmol/l (2.0 - 9.1 ng/ml)
- Snížené hodnoty: megaloblastická anémie, hemolytické anémie, malabsorpce, těhotenství, laktace, dlouhodobá léčba antiepileptiky, dlouhodobá dialýza, psoriáza

Hepcidin



- Peptidový hormon syntetizovaný v játrech
- Hlavním regulátorem metabolismu železa
- **Struktura**
- Hepcidin se skládá z 84, 60 nebo 25 aminokyselin
- V moči se vyskytuje hepcidin, který má 20 nebo 22 aminokyselin.
- **Funkce**
- Hormon hepcidin jako 25-AA protein je hlavní regulátor absorpce železa a jeho distribuce do tkání
- Syntéza probíhá především v hepatocytech, ale jeho nízká koncentrace v buňkách a tkáních, také v makrofázích, adipocytech a mozku

Hepcidin



- Hlavní regulátor homeostázy železa v metabolismu
- Porucha syntézy je příčinou mnoha chorob
- Nedostatek hepcidinu - přetížení železem to způsobuje hemochromatózu, anémii a hepatitidu C
- Přebytek způsobuje anémii chronické choroby ledvin
- Hepcidin přímo inhibuje protein ferroportin, který transportuje železo z buňky a skladuje ho
- **Regulace hepcidinu**
- Hepcidin je regulován koncentrací železa a mírou erythropoesy
- Přebytek železa stimuluje produkci hepcidinu a zvýšená produkce hormonu zamezí další absorpci železa

Vyšetřovací metody u hemolytických anémií



- vyšší hodnota nekonj. bilirubinu - následek zvýšeného rozpadu erytrocytů
- vyšší hladinou LDH
- zvýšená hemoglobinémie event. s hemoglobinurií
- při intravaskulární hemolýze
- snížené až nulové hodnoty haptoglobinu a hemopexinu
- průkaz zkráceného přežívání erytrocytů vyšetřením pomocí ^{51}Cr (u AIHA hodnoty nižší, než 25 dní).

Coombsův test



Antiglobulinový test (AGT) - užívá se v imuno hematologii

- Za určitých podmínek - krev jedince obsahuje IgG protilátky - mohou specificky vázat na antigeny přítomné na povrchové membráně erytrocytů

Přímý Coombsův test

- K detekci protilátek či proteinů komplementu, které jsou navázány na povrch červených krvinek
- Odebraný vzorek krve je zpracován tak, že přítomné červené krvinky jsou promyty a následně se inkubují s protilátkami proti lidským imunoglobulinům
- Pokud dojde k viditelné aglutinaci červených krvinek - test je považován za pozitivní

Coombsův test

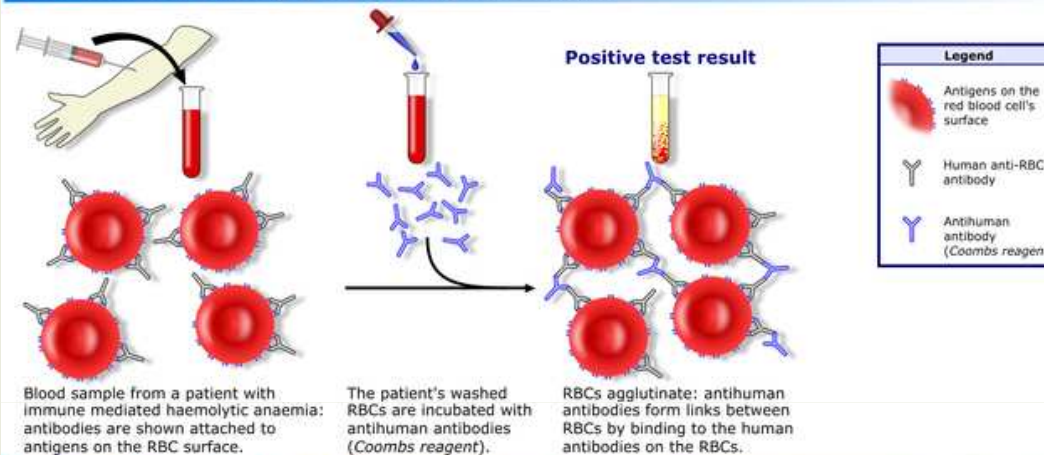


Nepřímý Coombsův test

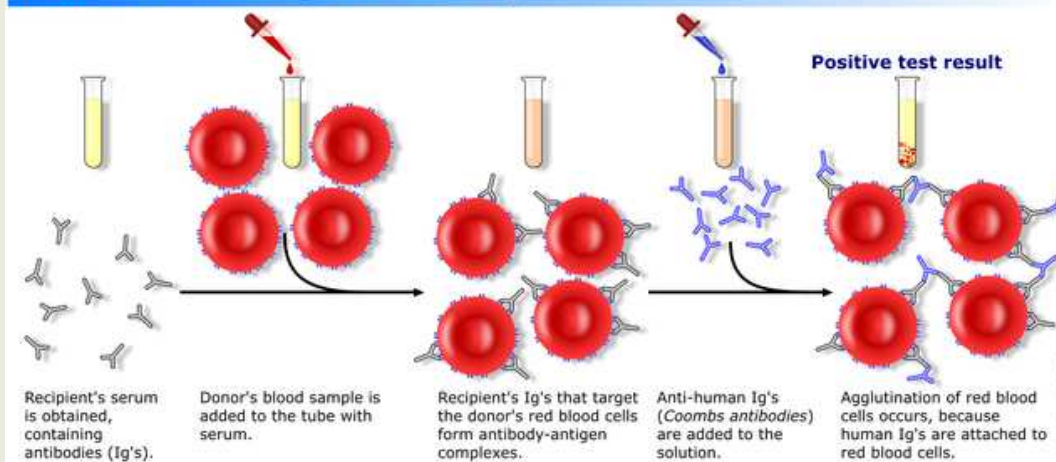
- K prenatálnímu testování těhotných žen a k testování krve před krevní transfúzí
- Slouží k detekci protilátek proti erytrocytům, které jsou přítomny volně nenavázané v séru
- Sérum je inkubováno s erytrocyty se známou antigenicitou. Pokud dojde k aglutinaci, je nepřímý Coombsův test pozitivní.

Coombsův test

Direct Coombs test / Direct antiglobulin test



Indirect Coombs test / Indirect antiglobulin test



Zdroj: internetový vyhledávač: www.google.com - i,

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/1c/Coombs_test_schematic.png/641px-Coombs_test_schematic.png&imgrefurl

Test osmotické rezistence



- Erytrocyty přežívají pouze v izotonickém prostředí, ale mají jistou toleranci ke změnám izotonie roztoku
- Erytrocyty u některých hemolytických stavů mají sníženou toleranci ke změnám osmotického tlaku

Test acidorezistence erytrocytů – Hamův test



- Diagnostický a screeningový test pro paroxysmální noční hemoglobinurii (PNH)
- Acidifikace krve HCl = kyselé prostředí aktivuje komplement – zvýšená hemolýza u osob s PNH
- PNH – snížená syntézy glykosylfosfatidylinositolu, který ukotvuje membránové proteiny regulující aktivitu komplementu
- Průtoková cytometrie zaměřená na vyhledávání snížení CD55 a CD59 potvrzuje dg.

Test kryohemolýzy



- Test je indikován jako laboratorní test při podezření na hereditární sférocytózu (HS)
- **Norma:** 0 -15%

Test kryohemolýzy - pracovní postup

1 ml periferní krve
odběr do K₃EDTA
čerstvá nebo jeden den stará

3x proplach Ery fyziologickým roztokem

příprava 50-70% suspenze Ery

50 µl suspenze Ery + 2 ml 0,7M sacharózy v 50 mM fosfátovém pufru pH = 7,4

inkubace při 37°C, 10 min

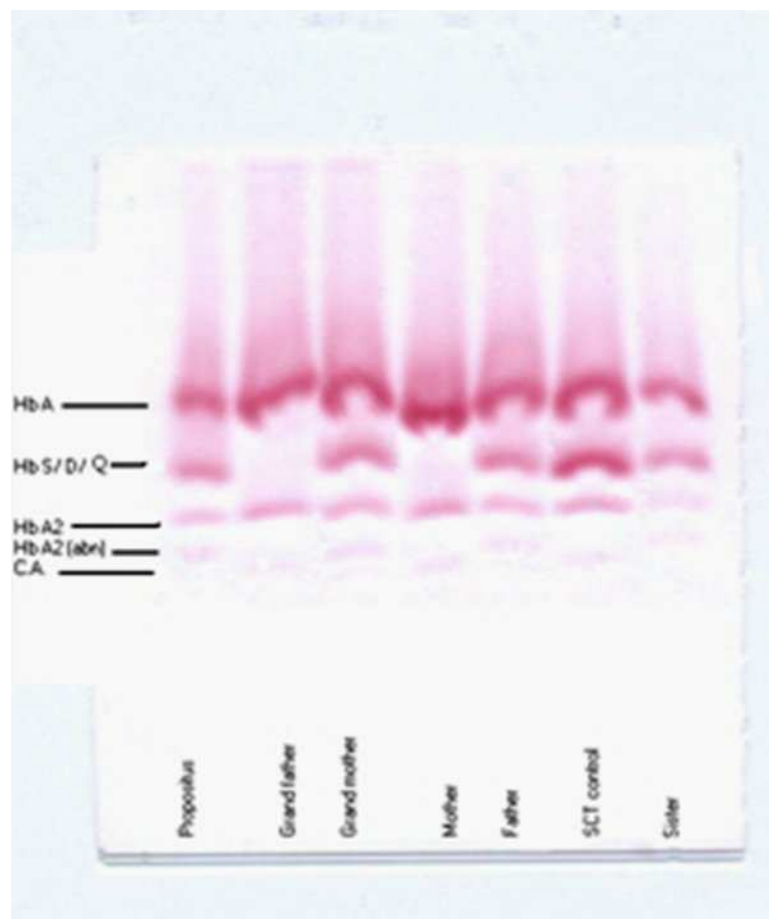
zchlazení na 0°C, 10 min

vortex, centrifugace

měření A při $\lambda=540$ nm

1-2 hod

Elektroforéza hemoglobinu na acetátu celulosy






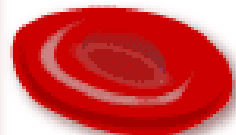
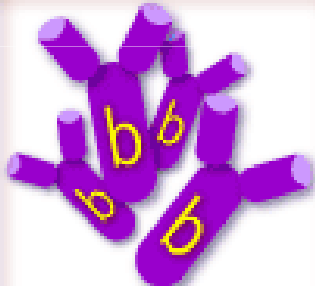

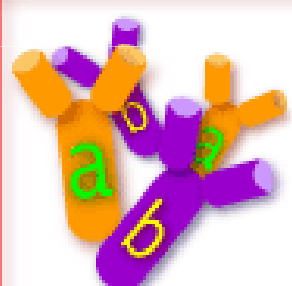
Zdroj: internetový vyhledavač: www.google.com- images,
http://www.ispub.com/ispub/ijhe/volume_3_number_1_24/a_rare_case_of_co_existent_hb_q_india_beta_thalassemia_trait/hbq-fig1.jpg&imgrefurl

Imunologická vyšetření



- Vyšetření krevních skupin
- Přímý antiglobulinový test – ABO
- Nepřímý antiglobulinový test Rh

The ABO Blood System

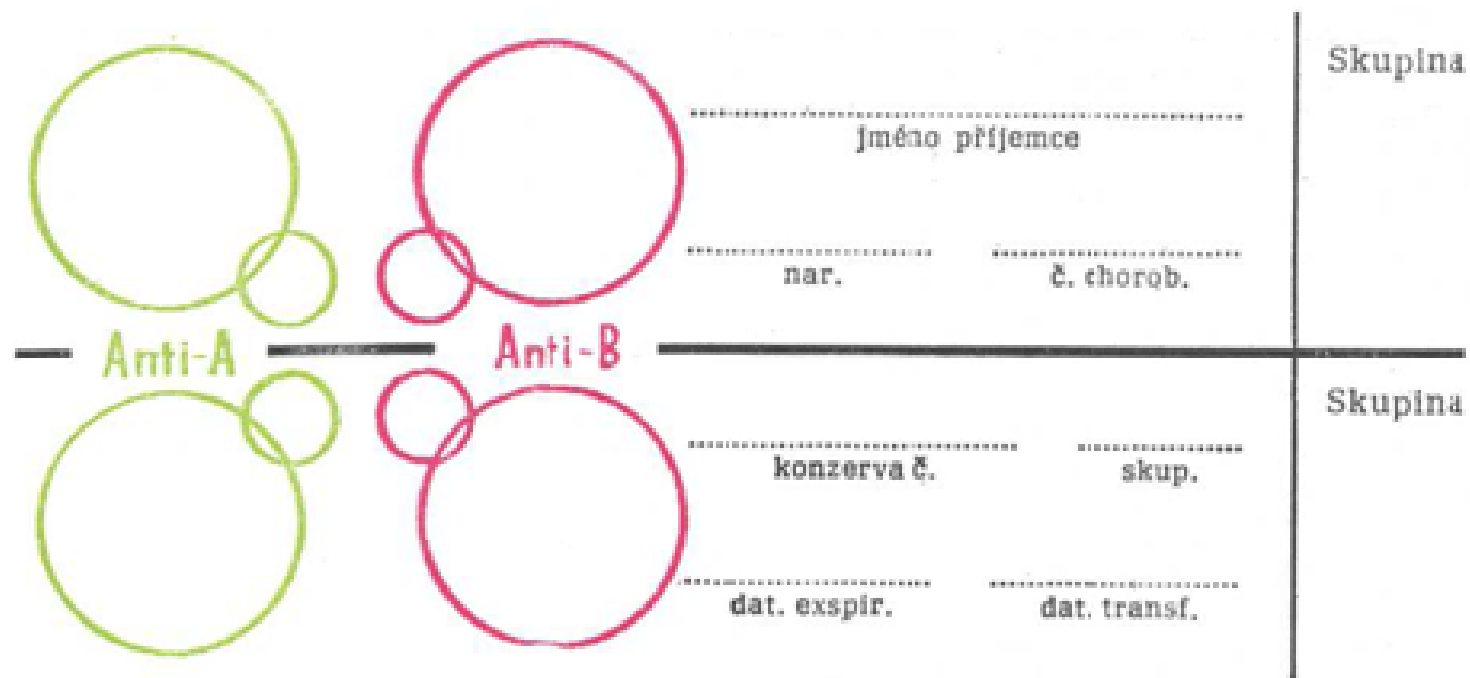
Blood Type (genotype)	Type A (AA, AO)	Type B (BB, BO)	Type AB (AB)	Type O (OO)
Red Blood Cell Surface Proteins (phenotype)	 <p>A agglutinogens only</p>	 <p>B agglutinogens only</p>	 <p>A and B agglutinogens</p>	 <p>No agglutinogens</p>
Plasma Antibodies (phenotype)	 <p>b agglutinin only</p>	 <p>a agglutinin only</p>	<p>NONE.</p> <p>No agglutinin</p>	 <p>a and b agglutinin</p>

Zdroj: internetový vyhledávač:www.google.com- images, <http://www.bloodlinkfoundation.org/Images/abo-blood-system.jpg&imgrefurl>

Vyšetření krevních skupin



- ABO systém
 - vyšetření ERY pomocí diagnostických sér anti-A a anti-B
 - vyšetření sérových aglutininů anti-A a anti-B pomocí typizovaných erytrocytů
- Rh(D) systém
 - vyšetření pomocí anti-Rh(D) séra



Zdroj: internetový vyhledávač:www.google.com- images, <http://www.zbynekmlcoch.cz/info/images/stories/texty/sangvittest.png&imgrefurl>

Cytochemické vyšetření



Průkaz látek v buňkách pomocí chemických reakcí,
hodnocení periferní krve i kostní dřeně

- Reakce na železo (Perlsova reakce)
 - průkaz železa v erytroblastech (sideroblasty), erytrocytech (siderocyty) a makrofázích (siderofágy)
- Vyšetření některých enzymů (ALP, NE)
 - dg. a dif. dg. hematologických malignit

Průtoková cytometrie (flow cytometry)



- technika umožňující kvantitativně i kvalitativně analyzovat částice – buňky – v suspenzi. Umožňuje cíleně separovat buňky na základě jejich fyzikálních a chemických vlastností
- **FACS** (Fluorescence-activated-cell-sorting) - třídění buněčné suspenze dle odlišného rozptylu světla a fluorescenční charakteristiky buňky