



EVROPSKÁ UNIE



evropský
sociální
fond v ČR



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



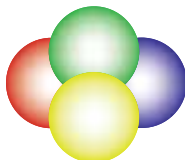
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Laboratorní hematologie



**Anna Lapčíková
Vladimír Divoký
Monika Horváthová
Ivana Fellnerová**

*Milý čtenáři,
publikace, kterou držíte v ruce je součástí olomouckého cyklu vzdělávacích materiálů vydávaných k projektu Od fyziologie k medicíně – integrace vědy, výzkumu odborného vzdělávání a praxe. Projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.*



Od fyziologie k medicíně

– integrace vědy, výzkumu odborného vzdělávání a praxe

CZ.1.07/2.3.00/09.0219
<http://cit.vfu.cz/fyziolmed>



Trvání projektu:

červen 2009 – květen 2012

Řešitelská pracoviště:

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Univerzita Palackého v Olomouci

Cíl projektu:

Umožnit nadstandardní vzdělávání v oblasti fyziologie a biomedicínských aplikací.

Projektová etapa 2011 region OLOMOUC



5. Téma

Laboratorní hematologie

Anna Lapčíková • Anna.Lapcikova@fnol.cz
Doc. RNDr. Vladimír Divoký, Ph.D. • divoky@lf.upol.cz
Mgr. Monika Horváthová, Ph.D. • privitzer@seznam.cz
RNDr. Ivana Fellnerová, Ph.D. • fellner@hotmail.com

Na přípravě podkladů pro publikaci dále spolupracovali:

RNDr. Martina Divoká • martina.divoka@fnol.cz
Mgr. Jana Kučerová • jan.kuc@gmail.com

Místo konání semináře:

Hemato-onkologická klinika LF UPOL a FN Olomouc
I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
http://www.fnol.cz/hemato-onkologicka-klinika_8.html

Ústav biologie LF UPOL

Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc
<http://biologie.upol.cz/>

Termíny konání semináře:

22. října 2011
29. října 2011

Autor designu obálky a grafických úprav:

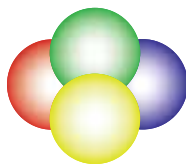
Vlastislav BÍČ, Katedra zoologie, PřF UP Olomouc

OBSAH:

| | |
|--|----|
| 1. ÚVOD..... | 5 |
| 1.1. Projekt od fyziologie k medicíně | 6 |
| 1.2. Projektové diskusní semináře | 7 |
| 1.3. Ohlédnutí za seminářem Imunologie a imunomodulační léčba | 8 |
| 2. TEORETICKÉ POZNÁMKY K LABORATORNÍ HEMATOLOGII..... | 11 |
| 2.1. Hematopoéza - úvod | 12 |
| 2.2. Signální transdukce v regulaci hematopoézy | 13 |
| 2.2.1. Transkripční regulace hematopoézy..... | 15 |
| 2.2.2. Poruchy regulace hematopoézy | 16 |
| 2.3. Červené krvinky a hemoglobin | 17 |
| 2.3.1. Hierarchie a regulace erytropoézy | 18 |
| 2.3.2. Hemoglobin | 19 |
| 2.3.3. Patologie červené krevní řady | 21 |
| 2.3.4. Diagnostika poruch červené krevní řady | 22 |
| 2.4. Molekulární podstata akutních leukemií | 23 |
| 2.4.1. Akutní myeloidní leukémie | 25 |
| 2.4.2. Akutní lymfoblastická leukémie | 27 |
| 2.5. Chronické leukémie | 28 |
| 2.6. Použité zdroje a poděkování | 29 |
| 3. PRAKTICKÁ ČÁST..... | 31 |
| 3.1. Organizace práce v hematologické laboratoři (HOK) | 32 |
| 3.1.1. Preanalytická fáze – příjem materiálu..... | 32 |
| 3.1.2. Stanovení základních parametrů krevního obrazu..... | 33 |
| 3.1.3. Pěti-populační diferenciální rozpočet a stanovení retikulocytů | 34 |
| 3.1.4. Zhodnocení nátěru periferní krve a manuální diferenciál krevního obrazu..... | 37 |
| 3.1.5. Obsluha nátěrového a barvicího automatu..... | 39 |
| 3.1.6. Využití automatu pro diferenciální rozpočet periferní krve | 39 |
| 3.1.7. Schvalování výsledků a jejich export..... | 40 |
| 3.2. Praktické úlohy semináře | 40 |
| 4. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA | 41 |

5. téma

Laboratorní hematologie



1. ÚVOD

Projekt Od fyziologie k medicíně
Projektové diskusní semináře
Ohlédnutí za seminářem Imunologie a imunomodulační terapie

OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ
Integrace vědy, výzkumu, odborného vzdělávání a praxe



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

1.1. Projekt Od fyziologie k medicíně

Projekt Od fyziologie k medicíně – integrace vědy, výzkumu, vzdělání a praxe je vzdělávací projekt, jehož cílem je nadstandardní vzdělávání v oblasti fyziologie a biomedicínských aplikací (<http://cit.vfu.cz/fyziolmed/>). Vzdělávání je vedeno jak v rovině teoretické (prezentace aktuálních poznatků v kontextu vzájemných souvislostí), tak v rovině praktické (experimentální praxe, metody efektivního zpracování dat, aplikace výsledků výzkumu, exkurze).

PRO KOHO je projekt určen?

- 1) **Akademické pracovníky VŠ** (školitele VŠ studentů na úrovni Bc., Mgr. a Ph.D.)
 - 2) **Studenty VŠ** (Bc., Mgr. a Ph.D.)
 - 3) **Studenty a pedagogy SŠ** (s hlubším zájmem o fyziologii a medicínu)
- Podmínkou účasti v projektu byla registrace prostřednictvím projektových webových stránek. (registrace byla uzavřena 31.12.2010)

CO projekt nabízí?

- 1) Odborné vzdělávání formou **diskusních seminářů (viz dále)** se zaměřením na aktuální fyziologicko-lékařskou problematiku a témata oceněná Nobelovými cenami za Fyziologii a medicínu
- 2) **Exkurze** na pracoviště vědy a výzkumu, **aktivní zapojení do experimentů**
- 3) Získání zkušeností s **atraktivní prezentací vlastních výsledků na odborných akcích** (konferencích)
- 4) Seznámení s možnostmi **mezinárodních kontaktů a uplatnění na světovém vědecko-výzkumném fóru**
- 5) Tištěné a interaktivní **publikace** k jednotlivým seminářům



Obr. 1.1. - Časový harmonogram projektu Od fyziologie k medicíně

1.2. Projektové diskusní semináře

Jednotlivé semináře probíhají v neformální přátelské atmosféře. Skládají se z **části teoretické** a navazující **části praktické**, kdy mají účastníci možnost uplatnit získané teoretické poznatky přímo v praxi.

První etapa projektových seminářů již úspěšně proběhla v regionu Brno v průběhu roku 2010. Byla garantována Veterinární a farmaceutickou univerzitou v Brně ve spolupráci s Ústavem živočišné fyziologie a genetiky AV ČR a řadou externích spolupracovníků.

V návaznosti na první cyklus projektových seminářů **realizovaných v roce 2010 v regionu Brno**, probíhá druhý cyklus seminářů v regionu Olomouc (únor-prosinec 2011). Podobně jako v brněnské etapě, probíhají olomoucké semináře ve dvou cyklech: **jarním** (4 semináře) a **podzimním** (3 semináře).

Olomoucké semináře jsou zaštiťovány odborníky z Přírodovědecké a Lékařské fakulty Uni-

verzity Palackého ve spolupráci s řadou externích spolupracovníků (vědci, lékaři, pedagogové i pracovníci biomedicínských institucí a provozů).

Všechny projektové materiály vydané pro účastníky k seminářům v regionu Brno, získají v tištěné podobě také účastníci seminářů v regionu Olomouc a naopak. Pro ostatní zájemce jsou materiály v elektronické podobě spolu s dalšími informacemi o projektu k dispozici na projektových webových stránkách: <http://cit.vfu.cz/fyziolmed/>

Časový harmonogram olomouckých seminářů je znázorněn na obrázku 1.2.a,b



Jaro 2012

Společná závěrečná konference všech účastníků projektu (brněnské i olomoucké skupiny registrovaných)

Obr. 1.2. - Časový harmonogram jarního (a) a podzimního (b) cyklu projektových seminářů v regionu Olomouc

1.3. Ohlédnutí za seminářem Imunologie a imunomodulační terapie

V dubnu 2011 proběhl třetí z jarního cyklu projektových seminářů v regionu Olomouc. Seminář proběhl ve spolupráci s farmaceutickou společností Teva v Opavě-Komárově, která působí na českém trhu od roku 1997. Spojením se společností IVAX Pharmaceuticals s.r.o., (dříve Galena a.s.), se v roce 2006 stala jednou z nejvýznamnějších domácích farmaceutických společností. Společnost Teva je globální farmaceutickou korporací se závody po celém světě.

Teoretická část semináře, kterou vedl RNDr. A. Vrána, vedoucí pracovník oddělení měkkých želatinových tobolek, byla zaměřena na imunologii T lymfocytů, transplantační imunologii, imunosupresivní léčbu, výrobu monoklonálních protilátek a jejich využití v rámci potransplantační imunosuprese. Druhá část teoretického semináře byla, pod vedením RNDr. Jarmily Vránové, věnována registraci léčivých přípravků a jejich klinickému hodnocení (*obr. 1.3.-1.4.*) V praktické části semináře měli studenti příležitost podívat se přímo do provozu výroby imunosupresivních přípravků (měkké želatinové tobolky a orální roztoky s cyklosporinem). V tzv. novém závodě NOSD byly představeny moderní výrobní technologie pevných lékových forem (*obr. 1.5. – 1.7.*)

Obr. 1.3. - Seminář Imunologie a imunomodulační terapie 15. 4. 2011



Titul doprovodné publikace (a); Účastníci semináře ve školícím středisku Teva (b); Příprava vystoupení RNDr. J. Vránové - legislativa spojená s registrací léků (c).

Obr. 1.4. - Seminář Imunologie a imunomodulační terapie

Názorný výklad dr. A. Vrány o monoklonálních protilávkách (a); Oživení teoretického výkladu- praktická demonstrace mezibuněčné komunikace mezi buňkami specifické imunity, vedoucí k „výronu cytokinů“ (dr. A. Vrána a doc. M. Fellner) (b).



Obr. 1.5. - Seminář Imunologie a imunomodulační terapie

Část účastníků semináře 15. 4. (dr. A. Vrána uprostřed) (a); Vstup do nového závodu NOSD Teva (b).



Obr. 1.6. - Seminář Imunologie a imunomodulační terapie

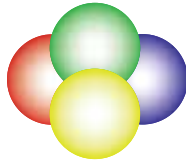
Společný oběd v prostorách nové jídelny závodu Teva.

Obr. 1.7 - Seminář Imunologie a imunomodulační terapie
Speciální ochranné prostředky pro vstup do výrobních prostorů (a); Nezbytná hygienická opatření před vstupem do prostoru výroby cytostatik (b); vstup do kontrolovaného pásma výroby cytostatik (c).



5. téma

Laboratorní hematologie



2. TEORETICKÁ ČÁST

Hematopoéza - úvod

Signální transdukce v regulaci hematopoézy

Červené krvinky a hemoglobin

Molekulární podstata akutních leukemií

Chronické leukémie

Použité zdroje a poděkování

OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ

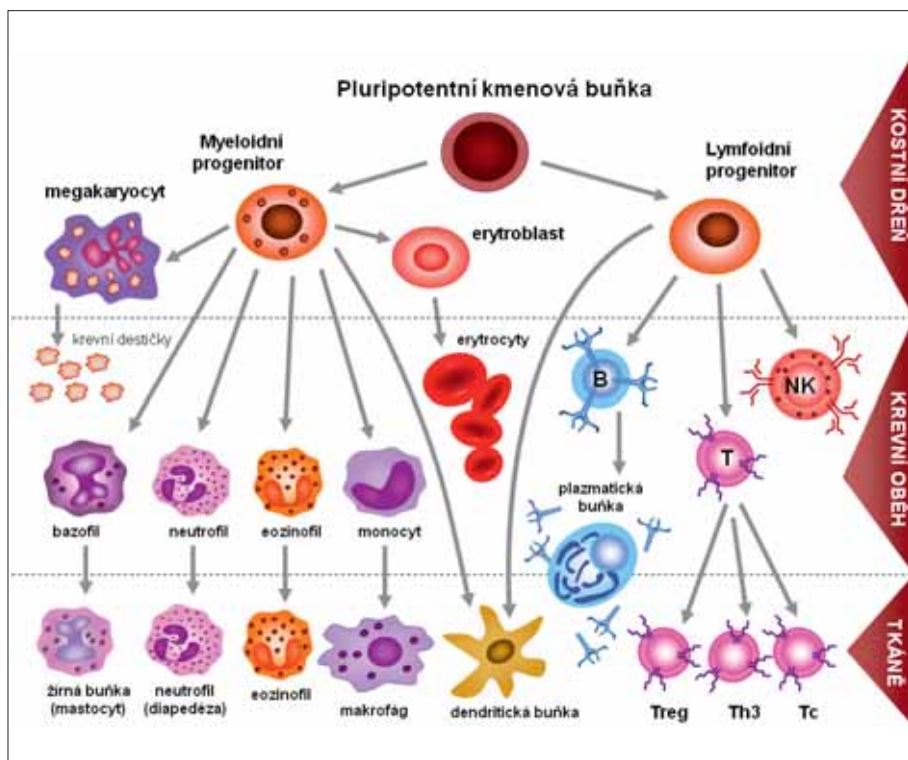
Integrace vědy, výzkumu, odborného vzdělávání a praxe



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

2.1. Hematopoéza - úvod

Hematopoéza (krvetvorba) je proces, během kterého hematopoetická kmenová buňka diferencuje do mnoha buněčných typů (*obr. 2.1.*). Základními vlastnostmi hematopoetické kmenové buňky jsou schopnost sebeobnovy a pluripotence. Sebeobnova je obecnou vlastností kmenových buněk (viz projektová publikace „Kmenové buňky – využití ve výzkumu a klinické praxi“ ISBN 978-80-244-2690-7). Pluripotence znamená široký diferenciální potenciál – hematopoetická kmenová buňka vytváří všechny buněčné populace krve po celý život organismu. Proliferace a diferenciace pluripotentní kmenové buňky vyžaduje kromě působení růstových faktorů (hormony a cytokiny) také jiné fyzikální interakce s podpůrnými stromálními buňkami a chemické interakce se sérovými faktory.¹



Obr. 2.1. - Hierarchie hematopoézy (upraveno podle Abbas a kol., 2000).²

¹ Weissman IL, Anderson DJ, Gage F: Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:387-403.

² Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS: Cytokines. In: *Cellular and molecular immunology*. 4th ed. W.B. Saunders, 2000, str. 235-269.

Krvetvorba je jediný vývojový proces, který probíhá po celý život člověka. Krvetvorba je v průběhu vývoje lidského organismu rozdělena na tři hlavní období. První hematopoetický systém vzniká extraembryonálně ve žloutkovém vaku, kde se diferencují ostrůvky mezenchymálních elementů – tzv. krevní ostrůvky – a rozlišují se v nich tři vrstvy – endodermální vrstva (podporuje růst), centrální vrstva hematopoetických buněk, které se nakonec vyvíjí v erytroblasty a endoteliální vrstva, která krevní ostrůvky obklopuje. Prvními detekovatelnými, liniově specifickými hematopoetickými buňkami jsou primitivní erytroblasty. Tomuto systému říkáme primitivní hematopoéza, resp. primitivní erytropoéza. Krvetvorba je totiž v tomto období téměř výhradně erytroidní.

Ve druhém, hepatolienálním období jsou hlavním místem krvetvorby játra (a v menší míře i slezina) a opět převažuje erytropoéza.

Od 10. týdne intrauterinního vývoje je zahájena hematopoéza v kostní dřeni. Krvetvorba ve fetálních játrech ustává v období těsně po narození, krvetvorným orgánem zůstává po celý život jedince pouze kostní dřeň. Primárními lymfopoetickými orgány jsou kostní dřeň a thymus, odkud lymfoidní buňky migrují do sekundárních lymfatických tkání a orgánů.³

V průběhu vytváření definitivní hematopoézy dochází k jejímu rozrůznění do všech hematopoetických řad. Rozrůznění hematopoézy, tzv. liniová specifikace, začíná diferenciací hematopoetické kmenové buňky na myeloidní a lymfoidní progenitor. Ze společného progenitoru myeloidní řady vznikají další diferenciací erytrocyty, trombocyty, granulocyty a monocyty. Lymfoidní progenitor dává vznik B a T lymfocytům a NK buňkám⁴ (viz obr. 2.1.).

Procesy, které řídí hematopoetickou liniovou specifikaci jsou předmětem intenzivního výzkumu; předpokládá se kombinovaný účinek různých vnitřních a vnějších faktorů. Vnitřními faktory rozumíme klíčové transkripční faktory, které vazbou na promotory nebo zesilovače transkripce iniciují nebo zvyšují genovou expresi liniově-specifických genových sad.⁵

2.2. Signální transdukce v regulaci hematopoézy

Ve svém přirozeném prostředí, tj. v krvetvorné tkáni, jsou hematopoetické buňky vystaveny působení celé řady biochemických, chemických a fyzikálních interakcí. Z nich nejdůležitější jsou hematopoetické růstové faktory. Patří sem jak některé hormony (jako erytropoetin), tak cytokiny jako např. interleukiny, interferony a jiné. Působení hematopoetických růstových faktorů lze shrnout do tří bodů:

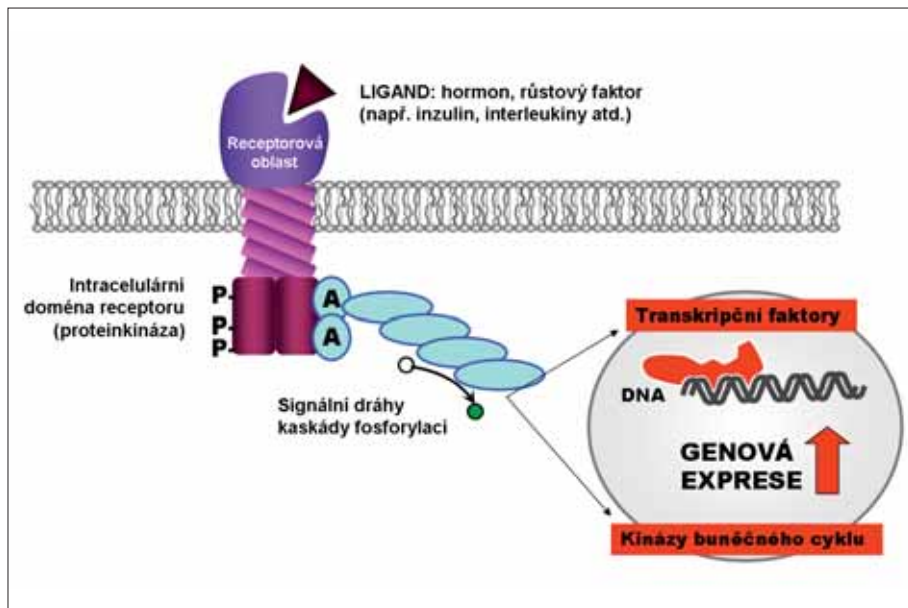
- 1) Regulují **přežívání buněk**, tj. zastavují buněčné děje, které by jinak spustily kaskádu procesů vedoucích k apoptóze.
- 2) **Stimulují buněčnou proliferaci**, tj. spouštějí ty buněčné děje, které vedou k progresi buněčného cyklu.
- 3) Spouštějí **signální dráhy diferenciaci**, tj. regulují expresi liniově-specifických transkripčních faktorů a jiných, pro určité stádium maturace specifických genů.

³ Nečas E a spolupracovníci: Patologická fyziologie orgánových systémů, Část I. Praha: UK v Praze, 2003, 379 stran.

⁴ Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL: A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. Nature. 2000;404(6774):193-197.

⁵ Orkin SH, Zon LI: Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. Nat Immunol. 2002;3(4):323-328.

Na začátku signálních drah hematopoetických růstových faktorů jsou specifické membránové receptory, které se aktivují vazbou hematopoetického růstového faktoru a zahajují aktivaci signální dráhy (obr. 2.2.).



Obr. 2.2. - Princip buněčné signalizace tyrozin kinázovým receptorem. K aktivaci receptoru dochází skrze jeho dimerizaci (nebo oligomerizaci) a následnou autofosforylaci, která vede k aktivaci celé kaskády fosforylaci přes vnitrobuněčné přenašeče signálu až ke konečným akceptorům signálu – transkripčním faktorům. Ty spouštějí v jádře expresi cílových genů, jejichž proteinové produkty ovlivňují osud buňky. Při liniové specifikaci, stejně jako při diferenciaci hematopoetických progenitorů, hrají důležitou roli interakce liniově specifických transkripčních faktorů (upraveno podle z Divoký, 2002).⁶

Buněčné receptory mohou mít samy kinázovou aktivitu (např. PDGFR, receptor pro destičkový růstový faktor), nebo ji nemají (jako GM-CSF receptor, receptor pro granulocytární a makrofágové kolonie stimulující faktor nebo EPOR, erythropoetinový receptor), ale v tom případě jsou asociovány s kinázami (jako Src, Jak), jejichž aktivace po navázání cytokinu představuje rozhodující krok pro přenos signálu.

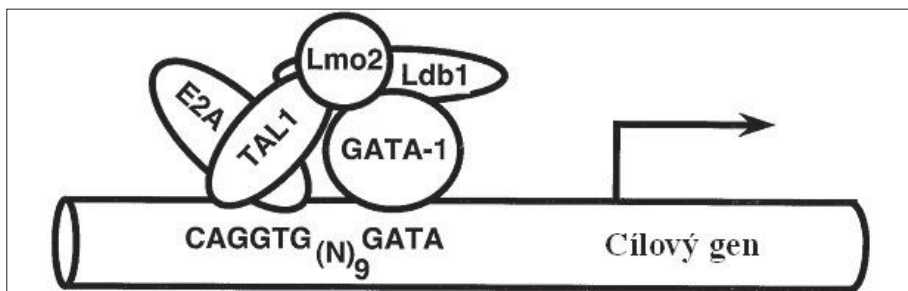
Z biochemického hlediska jsou kinázy definovány jako početná skupina enzymů ze třídy transferáz, které katalyzují přenos fosfátových zbytků z ATP na substrát. Nejčastěji fosforylovanými aminokyselinami signálních molekul jsou tyrozin, serin a threonin. Cytoplasmatické domény receptorů nebo s receptory asociované kinázy se fosforylují (tj. aktivují) a interagují s dalšími proteiny, které jsou součástí následné

⁶ Divoký V: Molekulární patofyziologie vybraných dědičných poruch erytropoézy. Habilitační práce. Olomouc: LF UP v Olomouci, 2002, 81 stran komentáře a soubor publikovaných prací.

kaskády proteinů přenášejících signál. Signál přenášený **kinázovou kaskádou** (jejíž součástí bývá řada nereceptorových tyrozinových kináz) se nakonec realizuje fosforylací cílových proteinů (transkripčních faktorů), které se přemístí do jádra a spouštějí expresi cílových genů (*obr. 2.2.*). Na proteinové úrovni se pak produkty těchto genů účastní regulace sebeobnovy, proliferace, přežití nebo diferenciacie hematopoetických buněk.⁷

2.2.1. Transkripční regulace hematopoézy

V průběhu vytváření definitivní hematopoézy dochází k jejímu rozrůznění do všech hematopoetických řad. Hematopoetická liniová specifikace a diferenciacie je výsledkem kombinovaného účinku různých transkripčních faktorů (TF). TF jsou regulační proteiny, které vazbou na promotory nebo zesilovače transkripce zahajují nebo zvyšují genovou expresi (*obr. 2.3.*).

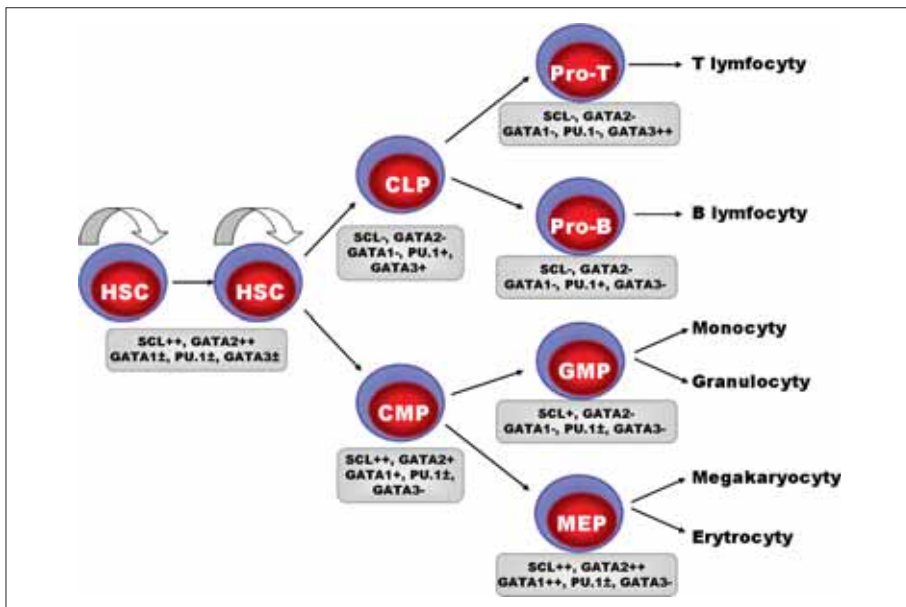


Obr. 2.3. - Model transkripčních komplexů nasedajících na promotory erytroidně-specifických genů. Komplex může mít funkci pozitivního i represivního regulátoru transkripce, podle stupně hematopoetické specifikace a diferenciacie buňky, ve které se komplex vytváří (upraveno podle Wadmana a spol., 1997).⁸

Fyziologické dynamické změny exprese TF v hematopoetických prekurzorech vedou k zesílení nebo potlačení genové exprese tak, že výsledkem je transkripce skupin genů specifických pro danou hematopoetickou linii, resp. určujících fenotyp dané hematopoetické linie (*obr. 2.4.*). Abnormální exprese řady TF, způsobená mutacemi genů kódujících TF, vede k poruchám v hematopoetické liniové specifikaci a v diferenciaci jednotlivých krevních řad a je asociována se vznikem řady chorob, jako různých typů akutních leukémií (viz dále). Mezi tyto TF patří např. SCL/TAL-1, LMO-2, PU.1, GATA-2 a další.

⁷ Divoký V., Veselovská J., Piterková L. (2010): Etiologie a patogeneze. In: Faber E. a Indrák K. (editoři): Chronická myeloidní leukémie, pp. 17-29, Galén, Praha.

⁸ Wadman IA, et al: The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. EMBO J. 1997;16(11):3145-57.



Obr. 2.4. - Hematopoetická liniová specifikace a diferenciace je řízená působením transkripčních faktorů (TF). Kromě TF zmíněných v textu jsou za liniovou specifikaci zodpovědné i další TF, jako GATA-1 a GATA-3. HSC = hematopoetická kmenová buňka; CLP = společný lymfoidní progenitor; CMP = společný myeloidní progenitor; GMP = progenitor granulocytů a makrofágů; MEP = progenitor megakaryocytů a erytrocytů. Upraveno podle Akashiho a spol. (2000).⁹

Transkripční faktory jsou zodpovědné za to, které sady genů v daném buněčném typu (tj. v dané buňce v daném čase na daném místě) „pracují“ (obr. 2.3.). Např. exprese erytroidně-specifického transkripčního faktoru **GATA-1** je důležitá nejen pro iniciaci liniově-specifické transkripce v erytroidních buňkách, ale i pro vlastní erytroidní diferenciaci a maturaci. V samotných erytroidních buňkách se GATA-1 váže ke specifické sekvenci (T/A)GATA(A/G), která se nachází v regulačních oblastech všech erytroidně-specifických genů, včetně genů kódujících globiny, erytroidní membránové proteiny, genu, který kóduje erythropoetický receptor, atd.

2.2.2. Poruchy regulace hematopoézy

Proces krvetvorby v průběhu života je velmi dynamický a je úzce propojen s reakcí organismu na hypoxii (především prostřednictvím tvorby červených krvinek), a s imunitní odpovědí organismu, především s bílými krvinkami jako složkami imunitního systému.

⁹ Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL: A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. Nature. 2000;404(6774):193-197.

Krvetvorba reaguje na řadu podnětů, jako jsou krevní ztráty, infekce, systémové choroby atd. Poruchy krvetvorby, ať už vrozené nebo získané, ovlivňují celý organismus a musí být dobře a včas diagnostikovány a léčeny.

Mezi **vrozené poruchy regulace krvetvorby** patří např. některé vrozené anémie, vrozené polycytémie (stavy s patologicky zvýšeným objemem červené krevní masy), některé vrozené imunitní poruchy, vrozené poruchy srážení krve atd. K **získaným poruchám** regulace krvetvorby patří krevní nádorová onemocnění, jako jsou **leukémie**.

V případě leukemické transformace kumuluje hematopoetická kmenová buňka, případně liniový progenitor genetické změny, které a) znemožní normální diferenciální program, b) znemožní odstranění mutované buňky programovanou buněčnou smrtí – apoptózou a c) podporují sebeobnovu a proliferaci.^{10,11} Některé leukemické buňky mají charakter tzv. leukemické kmenové buňky s vysokou schopností proliferace, sebeobnovy a přežití a případně i omezené diferenciace. Leukemické kmenové buňky jsou zodpovědné za perzistenci minimální reziduální choroby a za rozvoj leukemického klonu při relapsu leukémie (viz publikace „Kmenové buňky – využití ve výzkumu a klinické praxi“ ISBN 978-80-244-2690-7).

Leukemická transformace je založena na stejných principech jako nádorová transformace u solidních tumorů; dochází zde ke akumulaci řady genetických změn. Kromě jiného jde o aktivaci protoonkogenů na onkogeny a o inaktivaci nádorových supresorových genů. Onkogeny se účastní regulace proliferace a diferenciace buněk a jako nemutované protoonkogeny řídí tyto procesy ve zdravých buňkách. Charakter protoonkogenů mají např. **geny pro signální molekuly s tyrozinkinázovou aktivitou a geny pro transkripční faktory**, tj. geny, jejichž proteinové produkty tvoří složky signálních drah (viz 2.2.). Aktivací protoonkogenu např. důsledkem mutace dochází ke zvýšené a nekontrolované proliferaci buněk nebo k zablokování diferenciace krevní řady (viz 2.2.1.). Nádorové supresorové geny za fyziologických stavů naopak tlumí proliferaci buněk; kódují většinou proteiny regulující progresi buněčného cyklu nebo apoptózy nebo proteiny udržující stabilitu genomu. Pro vznik leukémie jsou pravděpodobně zapotřebí mutace v obou typech genů. Pro aktivaci onkogenu stačí mutace pouze v jedné alele (dominantní mutace), pro vyřazení z funkce tumor-supresorového genu jsou potřebné mutace dvě – v obou alelách (recesivní mutace).

2.3. Červené krvinky a hemoglobin

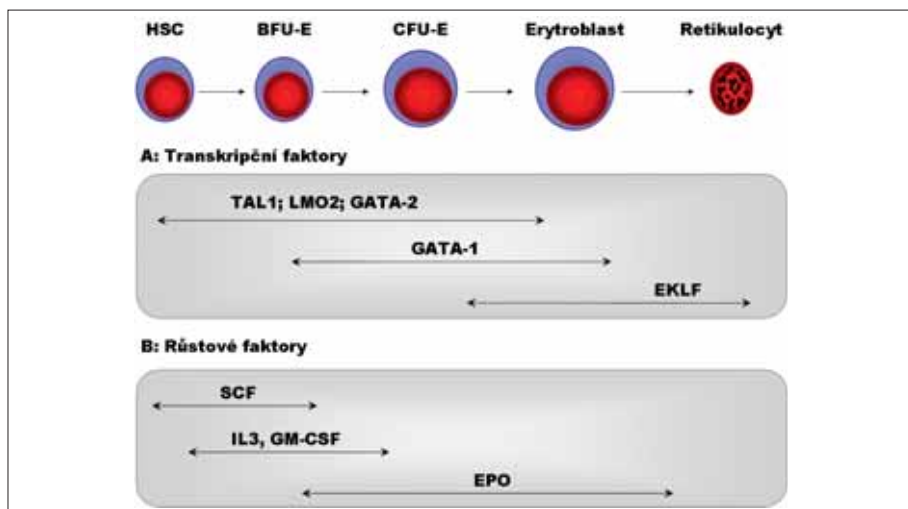
Erytropoéza je vysoce regulovaný, několikastupňový **proces tvorby a obnovy červených krvinek**. Erytropoéza představuje první diferencovanou hematopoetickou linii, která se objevuje během ontogeneze v krevních ostrůvcích žloutkového váčku. Vzhledem k funkční důležitosti produkce červených krvinek je to pochopitelné - erytropoéza je úzce spjata s produkcí hemoglobinu a její hlavní funkcí je dopravit do tkání organismu kyslík.

¹⁰ **Look AT:** Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. Science. 1997;278(5340):1059-1064.

¹¹ **Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL:** Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature. 2001;414(6859):105-111.

2.3.1. Hierarchie a regulace erythropoézy

Během nitroděložního vývoje jsou žlutkový váček a fetální játra především erythropoetickými orgány. Hematopoetické růstové faktory (tj. vnější, „extrinsic“ faktory), produkované buňkami v mikroprostředí těchto orgánů, v kombinaci s transkripčními faktory (tj. vnitřními, „intrinsic“ faktory) zaručují proliferaci a paralelně také diferenciaci hematopoetické kmenové buňky do erytroidního liniově determinovaného progenitoru (tzv. časný erytroidní progenitor, **BFU-E**, burst-forming unit-erythroid). Tzv. pozdní hematopoetické cytokiny následně řídí procesy terminální diferenciace a paralelní maturace do pozdního erytroidního progenitoru (**CFU-E**, colony forming unit-erythroid), do erytroblastu, retikulocyty a do červené krvinky (*obr. 2.5.*).



Obr. 2.5. - Vybrané vnitřní a vnější faktory nezbytné pro optimální proliferaci a/nebo diferenciaci jednotlivých erytroidních stádií v procesu erythropoézy. HSC = hematopoetická kmenová buňka; BFU-E a CFU-E – viz vysvětlení v textu. Erytroblasty jsou jaderné prekurzory červených krvinek se schopností dělit se, které se nacházejí v kostní dřeni. Retikulycyty jsou přechodné formy buněk mezi jadernými erytroblasty a zralými (bezjadernými) erytrocyty, tj. mladé erythrocyty po vypuzení jádra, se zbytky barvitelné RNA a ribozomů. TAL1, LMO2, GATA-2, GATA-1 a EKLF jsou transkripční faktory (TF). SCF (stem-cell factor), IL3 interleukin 3, GM-CSF (granulocyto-makrofágový kolonie-stimulující faktor), EPO (erythropoetin) jsou hematopoetické růstové faktory. Upraveno podle Divoký, 2002.¹²

Hlavním fyziologickým humorálním regulátorem erythropoézy je hormon erythropoetin (EPO). Je to glykoprotein v dospělosti produkovaný v ledvinách a v minimálním množství také v játrech. Za normálních okolností je produkce EPO aktivována buď sníženým objemem erythrocytární masy (anémie) nebo sníženou kyslíkovou saturací červených krvinek (hypoxemie), které vedou ke zvýšení tkáňové hypoxie. Efekt EPO na erytroidní pro-

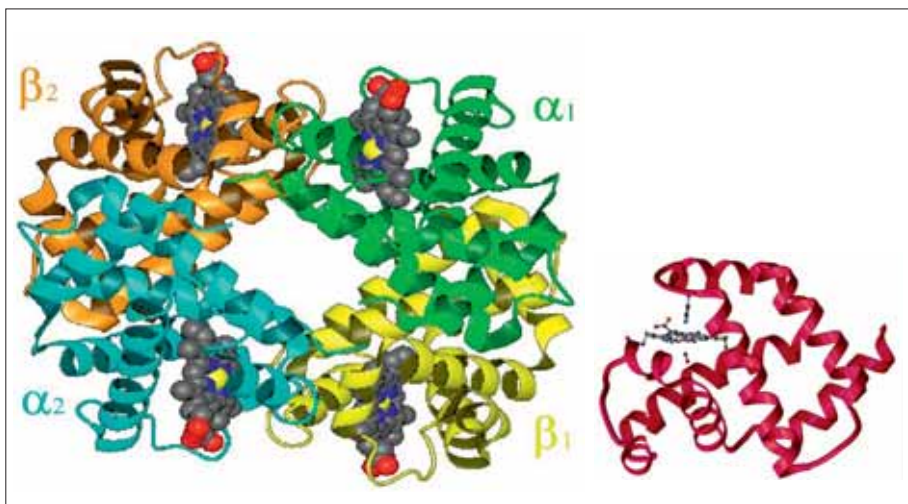
¹² **Divoký V:** Molekulární patofyziologie vybraných dědičných poruch erythropoézy. Habilitační práce. Olomouc: LF UP v Olomouci, 2002, 81 stran komentáře a soubor publikovaných prací.

genitory je zprostředkován specifickým **erythropoetinovým receptorem (EPOR)**. EPOR je exprimován převážně na CFU-E a v menší míře i na BFU-E a proerythroblastech.

2.3.2. Hemoglobin

Hemoglobin, červené krevní barvivo, je z funkčního hlediska nejdůležitější bílkovina obsažená v červených krvinkách. Jeho hlavní funkcí je přenos kyslíku (O_2) z plic do tkání, podíl na přenosu oxidu uhličitého (CO_2) z tkání zpět do plic a podíl na transportu signálního plynu oxidu dusnatého (NO). Střední hmotnost hemoglobinu v erythrocytu (MCH, mean corpuscular hemoglobin) kolísá mezi 27–34 pg. Hemoglobin (Hb) je tvořen bílkovinou – globinem – a prostetickou skupinou, hemem, který obsahuje iont železa. Na syntéze Hb se tedy podílejí tři různé buněčné procesy: syntéza globinů, syntéza protoporphyrinu (hemového prekursoru) a příjem iontů železa.

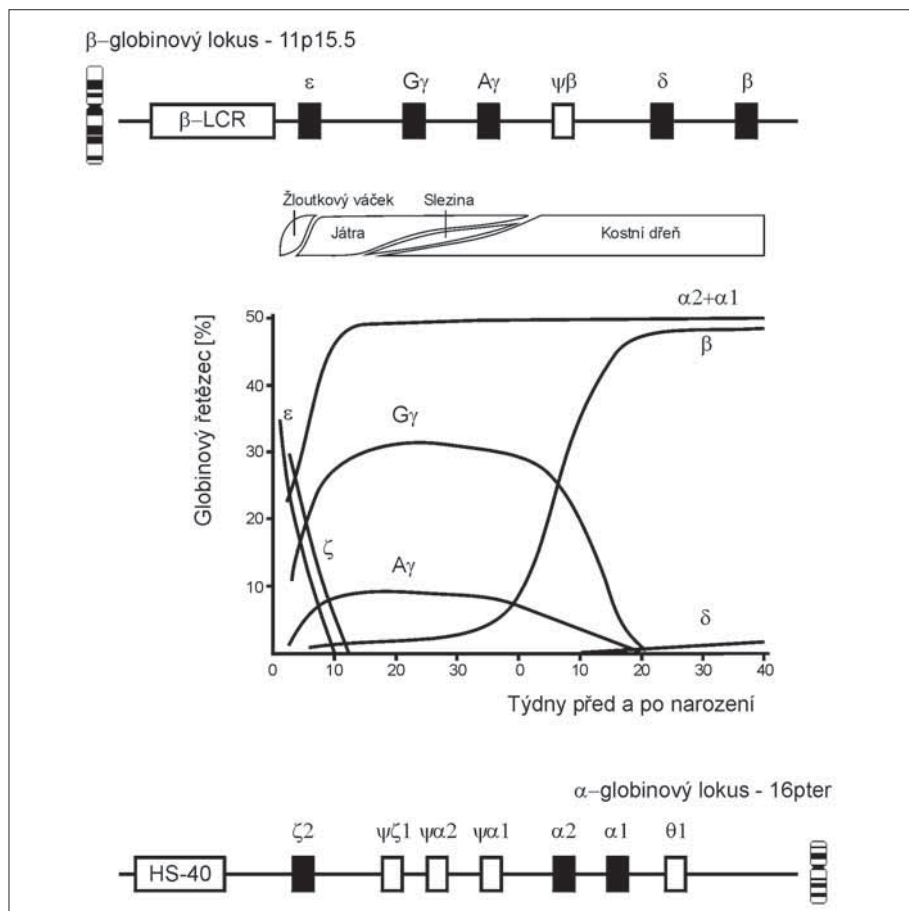
Všechny lidské Hb molekuly jsou tetramery sestávající ze dvou různých párů globinových řetězců (*obr. 2.6.*). Jeden pár globinových řetězců je produkován geny β -globinového lokusu a druhý pár řetězců je produkován geny α -globinového lokusu (*obr. 2.7.*). Bílkovinná složka Hb dospělého typu, označovaného jako HbA, se skládá ze dvou řetězců alfa a dvou řetězců beta (*obr. 2.6.*). Každý řetězec váže jednu hemovou skupinu uloženou v kapsových dutinách (*obr. 2.6.*). Hem je protoporphyrin, jehož základem je čtveřice pyrolových jader (tetrapyrrol). Ve středu tetrapyrrolového jádra je šestivazný a dvojmocný iont železa. Čtyřmi vazbami je iont železa vázán v tetrapyrrolovém kruhu, jednu na globinový řetězec a zbylá



Obr. 2.6. - Schéma molekuly Hb dospělého typu, HbA (vlevo). Každý globinový řetězec váže jednu prostetickou skupinu – hem (v šedé barvě). Detail hemové kapsy jednoho globinového řetězce (vpravo). Částečně převzato a upraveno, Steinberg a spol. (2001).¹³

¹³ Steinberg MH, Forget BG, Higgs D, Nagel RL (editoři): Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management. Cambridge University Press, 1268 stran, 2001.

vazba je určena pro kovalentní interakci s molekulou kyslíku. Jedna molekula Hb tedy může vázat čtyři kyslíkové molekuly. Krystalografické studie odhalily, že se hem nachází v hydrofobní hemové kapse, kterou vytváří každý ze čtyř globinových řetězců a která brání průniku vody a chrání ionty železa před autooxidací.



Obr. 2.7 - Struktura globinových lokusů a syntéza globinů. Schematické znázornění beta-globinového lokusu na chromozomu 11 a alfa-globinového lokusu na chromozomu 16. Beta-LCR a HS-40 jsou regulační oblasti globinových genových rodin. Funkční geny na lokusech jsou vyznačeny černě, nevybarvené obdélníky jsou pseudogeny (ψ). Jednotlivé globinové řetězce syntetizované ve žloutkovém váčku, játrech, slezině a kostní dřeni během ontogenetického vývoje jsou vyjádřené v procentu celkového Hb. Přepnutí z embryonálních Hb na Hb fetální (HbF) je ukončeno v 10. týdnu; přepnutí z HbF na Hb dospělého typu probíhá v období těsně po narození. Upraveno podle Weatherall D.J., 2001.¹⁴

¹⁴ **Weatherall DJ:** Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. Nat Rev Genet. 2001;2(4):245-255.

Hemoglobinové přepínání (anglicky „hemoglobin switching“) je postupná kvalitativní náhrada červených krvinek v krevním řečišti, kdy červené krvinky obsahující převážně jeden typ hemoglobinu jsou nahrazeny červenými krvinkami obsahujícími jiný typ hemoglobinu.¹⁵ Přehled lidských Hb syntetizovaných v průběhu vývoje jedince uvádí tab. 1. Jednotlivé globinové řetězce syntetizované ve žlutkovém vřáku, játrech, slezině a kostní dřeni během ontogenetického vývoje, vyjádřené v procentu celkového globinu, jsou znázorněny na **obr. 2.7**. Přepnutí z embryonálních hemoglobinů žlutkového vřáku na Hb fetálních jater (HbF) je ukončeno v 10. týdnu; přepnutí z HbF na Hb dospělého typu probíhá v období těsně po narození. V dospělosti jsou v kostní dřeni produkovány dva typy Hb: HbA (tvoří asi 98 %) a minoritně zastoupený HbA2 (tvoří jen 1–3 %). Zbytkový HbF bývá u normálního dospělého člověka zastoupen méně než v 1 % celkového Hb.

Tabulka 1: Lidské hemoglobiny syntetizované v průběhu vývoje jedince

| Erythropoetický orgán | Globinové řetězce | Označení hemoglobinu |
|-----------------------|-------------------------|----------------------|
| Žlutkový vřáček | $\zeta 2\varepsilon 2$ | Hb Gower-1 |
| | $\zeta 2\gamma 2$ | Hb Portland |
| | $\alpha 2\varepsilon 2$ | Hb Gower-2 |
| Fetální játra | $\alpha 2\gamma 2$ | HbF |
| Kostní dřeň | $\alpha 2\delta 2$ | Hb A2 |
| | $\alpha 2\beta 2$ | Hb A |

2.3.3. Patologie červené krevní řady

Patologické stavy červené krevní řady jsou velmi rozmanité, a mají povahu monogenických chorob i komplexních nemocí. Zmíníme jen některé.

Anémie jsou charakterizovány sníženým množstvím Hb a/nebo sníženým počtem erytrocytů. Funkčně vedou anémie ke snížené kapacitě krve transportovat kyslík. Anémie mohou být získané nebo vrozené. Nejčastější příčinou **získané anémie** je nedostatečný příjem železa do organismu (tzv. **sideropenická anémie**) nebo nedostatek vitamínu B12 a kyseliny listové (tzv. megaloblastová anémie). Časté jsou i anemické stavy doprovázející jiné nemoci (jako anémie chronických zánětlivých chorob, anémie maligní). Běžné jsou i získané poruchy dynamické struktury hemoglobinové molekuly, jako je kojenecká methemoglobinémie nebo karboxyhemoglobinémie u kuřáků. Methemoglobinémie mají zvýšený **methemoglobin** (Met-Hb) neboli „ferrihemoglobin“, ve kterém je dvojmocné železo obsažené v hemu oxidováno na trojmocné železo (Fe³⁺). Met-Hb nemůže vázat kyslík. Erytrocyty mají enzymatický systém (s methemoglobin reduktázou),

¹⁵ Nienhuis AW, Stamatoyannopoulos G: Hemoglobin switching. Cell. 1978;1:307-15.

kteřý redukuje Met-Hb na deoxyHb. Novorozenci mají nízkou aktivitu methemoglobin reduktázy. Kojenecká methemoglobinémie, spouštěná vysokým obsahem dusičnanů ve vodě, je způsobená tím, že dusičnany jsou v zažívacím traktu redukovány na dusitany, které reagují s oxyhemoglobinem za vzniku Met-Hb. Vysokou afinitou k Hb se vyznačuje oxid uhelnatý (CO). Oxid uhelnatý je poután mnohem pevněji než kyslík. Vzniká **karboxyhemoglobin**, kteřý tvořří u kuřáků 5 až 10 % celkového Hb.

Z vrozených (kongenitálních) anemických poruch jsou běžné membránové poruchy erytrocytů (vedoucí např. k tzv. eliptycýtóze, viz kapitola 4., obr. 4.2.), enzymatické poruchy erytrocytárních enzymů, poruchy globinové syntézy (hemoglobinopatie) a některé poruchy metabolismu železa.

Hemoglobinopatie jsou nejrozšířenější monogenní dědičné nemoci na světě. Postihují asi 7 % světové populace. Jsou způsobeny buď poruchou syntézy některého z globinů, jejímž důsledkem je nerovnováha v poměru α - a β -globinových řetězců v erytrocytech (kvantitativní globinové poruchy, **talasemie**) a nebo syntézou strukturálně abnormálních globinových řetězců (kvalitativní globinové defekty, **hemoglobinové varianty**). Další klasifikace hemoglobinopatií je založená na typu postiženého globinového genu, resp. jeho peptidového produktu. Rozlišujeme tak α - nebo β -talasemie, α - nebo β -globinové varianty ap. Mutantní alely α - nebo β -globinového genu jsou recesivně dědičné; heterozygoti jsou většinou bez klinických příznaků, postižení (nemocní) jsou homozygoti nebo dvojíti heterozygoti, kteří trpí tzv. inefektivní (neúčinnou) erythropoézou a hemolytickou anémií (předčasný rozpad červených krvinek). Hemoglobinopatie se vyskytují převážně v malarických oblastech. Globinové mutace poskytují heterozygotním nosičům ochranu před malárií. To v průběhu evoluce převážilo nad cenou, kterou platí homozygoti, jejichž postižení je letální. Do české populace byly mutované alely importovány z oblasti Středomoří, ale také z Mongolska a jiných oblastí Asie – v historických obdobích, ale import mutantních alel probíhá i dnes. Naštěstí se u nás setkáváme většinou jen s heterozygoty, nosiči mutované globinové alely. Homozygoti nebo dvojíti heterozygoti mutantních talasemických alel nebo alel hemoglobinových variant se u nás vyskytují ojediněle. Mívají těžkou chudokrevnost, počet retikulocytů bývá zvýšen, v krevním nátěru jsou nápadné různé abnormality v morfologii červených krvinek (viz kapitola 4., obr. 4.4.), přítomny bývají i erytroblasty. Nemocní jsou většinou trvale závislí na transfúzní léčbě.

2.3.4. Diagnostika poruch červené krevní řady

V základním laboratorním vyšetření vycházíme z množství hemoglobinu (v gramech/litr), počtu erytrocytů, hematokritu (hodnoty vyjadřující poměr buněčné a plazmatické části krve) a z odvozených hodnot, kterými jsou střední objem erytrocytu (MCV¹⁶, ve femtolitrech), průměrné množství hemoglobinu v erytrocytu (MCH¹⁷, v pikogramech) a střední koncentrace Hb v erytrocytech (MCHC¹⁸, v gramech na decilitr). Normální parametry zdravého dospělého člověka (muže) jsou uvedeny v kapitole 3. na obr. 3.4. Při snížených hodnotách MCV a MCH potom hovoříme o mikrocýtární (kapitola 4, obr. 4.3.) resp. hypochromní (kapitola 4., obr. 4.5.) anémii.

¹⁶ MCV - mean corpuscular volume

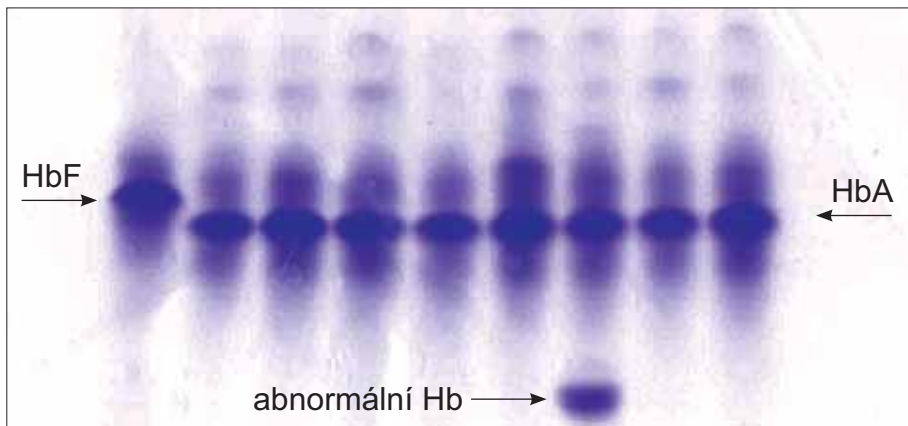
¹⁷ MCH - mean corpuscular hemoglobin

¹⁸ MCHC - mean corpuscular hemoglobin concentration

Řada poruch pak může být odhalena pomocí dalších biochemických testů (jako jsou parametry metabolismu iontů železa), morfologických změn červených krvinek, a jiných, často specializovaných laboratorních vyšetření.

Abnormální hemoglobinové varianty jsou často nestabilní a způsobují nápadnou hemolýzu, projevující se retikulocytózou (viz praktické stanovení počtu retikulocytů, *kapitola 3.2.*). Běžným vyšetřením u těchto pacientů je elektroforéza hemoglobinového lyzátu na gelu. Abnormální hemoglobinová varianta se záměnou jedné aminokyseliny vede ke změně náboje Hb molekuly a tím i ke změně mobility v elektrickém poli (*obr. 2.8.*). Také přetrvání (třeba i mírné) fetálního hemoglobinu (HbF) v dospělosti má diagnostickou výpovědní hodnotu.

Na molekulárně-genetické úrovni pak provádíme sekvenační analýzu kandidátních genů s cílem najít konkrétní mutaci zodpovědnou za daný fenotyp.



Obr. 2.8. - Nativní elektroforéza hemoglobinového lyzátu.

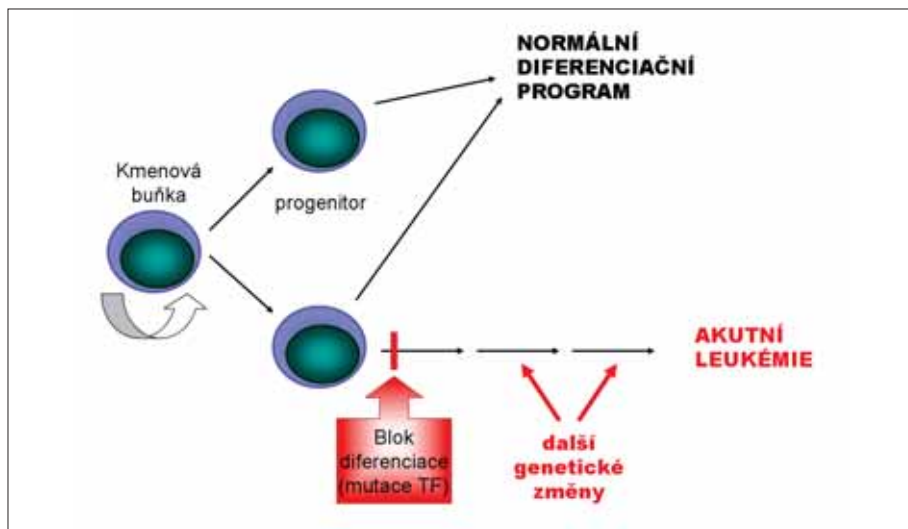
Základní metodou detekce proteinů je separační metoda – elektroforéza, která využívá rozdílné mobility proteinů v gelu v elektrickém poli na základě velikosti, náboje nebo konformace proteinu. V nativní elektroforéze se studují proteiny v nativním (přirozeném stavu). Na gelu je lyzát novorozence s pruhem zodpovídajícím HbF, několik zdravých dospělých osob s pruhem pro HbA, a jeden heterozygot pro abnormální hemoglobinovou variantu, která putuje v gelu odlišně od HbA i HbF. HOK FN Olomouc.

2.4. Molekulární podstata akutních leukemií

Hematologické malignity jsou různorodou skupinou onemocnění, protože téměř každé z vývojových stádií krvetvorné buňky může být postiženo nádorem. Akutní leukémie (AL) je neoplastická (nádorová) proliferace krvetvorných buněk, která vzniká jako následek genetických změn v hematopoetické kmenové buňce nebo v hematopoetickém progenitoru. Důsledkem těchto změn je vznik leukemického klonu. Dosud se neví, které všechny faktory u člověka leukemií spouštějí, předpokládá se pouze, že se jedná o multifaktoriální původ.

AL mohou být primární nebo sekundární. Primární (*de novo*) AL vznikají jako přímý důsledek kumulace řady genetických změn v hematopoetické kmenové buňce (*obr. 2.9.*). Sekundární AL

vznikají jako důsledek a pokračování předchozího hematologického nebo jiného nádorového onemocnění, které bylo u nemocného „primární“. Touto primární chorobou bývá nejčastěji myelodysplastický syndrom (MDS), příp. chronický myeloproliferativní syndrom (MPS) typu chronické myeloidní leukémie (CML) nebo polycytemia vera (PV). Vznik AL na pozadí MDS či MPS je jen dovršením plné nádorové transformace leukemického klonu. Sekundární AL mohou vznikat i jako důsledek chemoterapie a/nebo radioterapie jiné primární malignity (tzv. „therapy-related“ AL).¹⁹



Obr. 2.9. - Schéma vzniku leukemického klonu u akutní leukémie. Buňka, která dává vzniknout leukémii, je buď kmenová buňka nebo částečně diferencovaná buňka, tzv. hematopoetický progenitor. Mutace transkripčního faktoru (TF) vede k (částečnému) bloku diferenciacie příslušné krevní řady. Další akumulované genetické změny dávají buňce výhodu přežití, proliferační výhodu, příp. další vlastnosti leukemické buňky.

Vznik AL je většinou asociován s mutacemi onkogenních transkripčních faktorů, které hrají roli v diferenciaci hematopoetických buněk.²⁰ Transkripční deregulace vede k poruchám či zástavě diferenciacie hematopoetických buněk a společně s dalšími mutacemi (které mohou postihovat kinázy buněčného cyklu, apoptotické proteiny, receptorové kinázy atd.) iniciují nástup agresivních leukemií.²¹ V dvoustupňovém modelu leukemogeneze, který je testován na myších modelech, způsobují onkogenní transkripční faktory zástavu diferenciacie přeprogramování vývoje, což je nezbytné, ale ne dostatečné pro vznik leukémie. Teprve následující (druhá) mutace vybaví buňky schopností proliferovat a obstát v konkurenci, což je znakem kompletní leukemogenní transformace (*viz také kapitola 2.2.2.*).

¹⁹ **Larson RA:** Is secondary leukemia an independent poor prognostic factor in acute myeloid leukemia? Best Pract Clin Haematol. 2007;20(1):29-37.

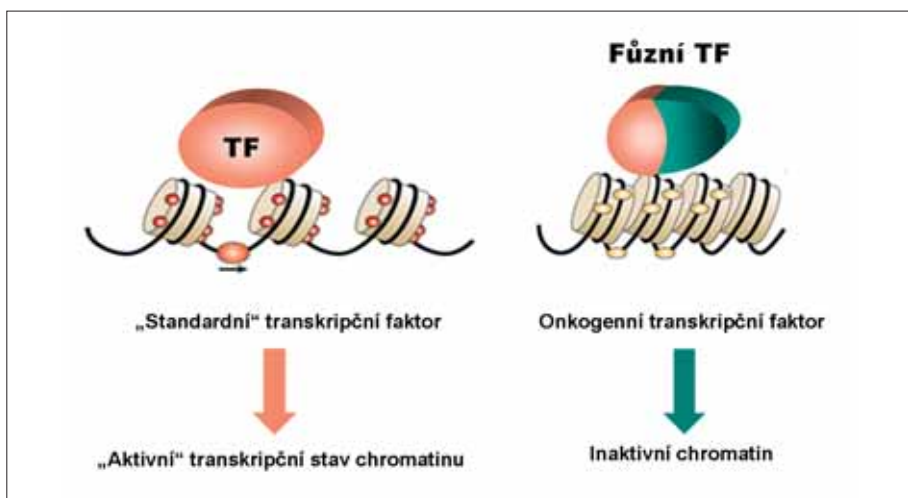
²⁰ **Look AT:** Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. Science. 1997;278(5340):1059-1064.

²¹ **Deguchi K, Gilliland DG:** Cooperativity between mutations in tyrosine kinases and in hematopoietic transcription factors in AML. Leukemia. 2002;16(4):740-744.

Aktivace genů transkripčních faktorů u AL má dvě hlavní formy, obě formy jsou větší-
nou výsledkem **chromozomové translokace**:

- A. V **T-lymfoidních progenitorech** se geny kódující transkripční faktory často dostávají translokací do blízkosti genů kódujících řetězce T-buněčných receptorů (TCR) nebo, u **B-lymfoidních buněk**, do blízkosti genů pro imunoglobuliny. Výsledkem je abnormální, **trvale zvýšená exprese** translokovaných genů kódujících transkripční faktory.
- B. Častěji však dochází k tomu, že se reciprokou translokací (výměnou částí dvou nehomologických chromozomů), vytvoří **nový fúzní gen**, který kóduje **nový chimerický protein**.

Translokace, které zahrnují geny transkripčních faktorů u akutní lymfoblastické leukémie (ALL) a akutní myeloidní leukémie (AML) jsou často specifické pro daný typ leukémie. Znamená to, že nové (chimerické) transkripční faktory narušují expresi genů tak, že změní-
ňují normální program buněčné diferenciaci, příp. i proliferace a apoptózy (*obr. 2.10.*).



Obr. 2.10. - Mutace genu, který kóduje transkripční faktor (TF) má většinou povahu chromozomální translokace, kterou vzniká kvalitativně nový fúzní gen, kódující onkogenní transkripční faktor. „Standardní“ transkripční faktor udržoval expresi „svých“ cílových genů. Onkogenní transkripční faktor modifikuje chromatin na inaktivní formu a exprese původních cílových genů transkripčního faktoru je zastavena.

Geny, které kódují hematopoetické transkripční faktory, se tedy často chovají jako protoonkogeny, jejichž mutací vznikají dominantní onkogeny. Abnormální protein pocházející z mutované alely potlačí pak i funkci proteinu, který pochází ze standardní alely.

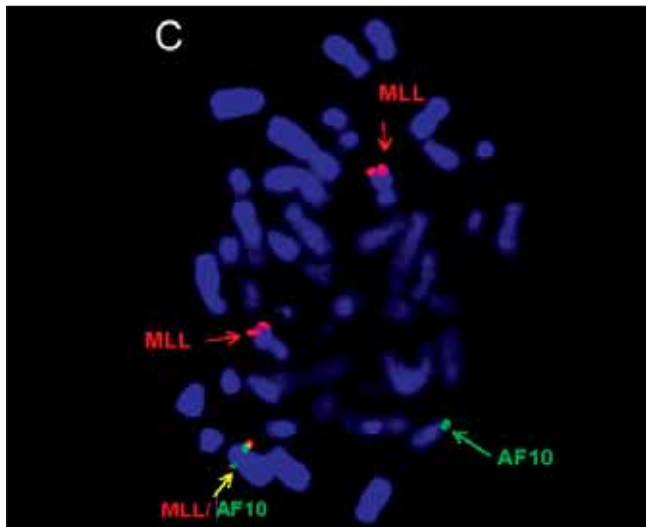
2.4.1. Akutní myeloidní leukémie

Akutní myeloidní leukémie (AML) je klinicky a geneticky heterogenní skupina onemocnění. Až 60 % nemocných má v nádorových buňkách získané chromozomové změny, které mají diagnostický a prognostický význam. Některé z těchto změn jsou zcela specifické pro daný typ leukémie a jsou spojené se špatnou nebo s dobrou prognózou.

AML vychází z myeloidních buněk kostní dřeně. Starší (ale stále v praxi používaná) tzv. **FAB klasifikace**²² dělila AML do 7 typů podle vyzrávání:²³

- M0** - akutní myeloblastická leukémie minimálně diferencovaná
- M1** - akutní myeloblastická leukémie bez vyzrávání
- M2** - akutní myeloblastická leukémie s vyzráváním
- M3** - akutní promyelocytární leukémie
- M4** - akutní monomyelocytární leukémie
- M5a** - akutní monoblastická leukémie
- M5b** - akutní monocytární leukémie
- M6a** - erytroleukémie
- M6b** - čistě erytroidní leukémie
- M7** - akutní megakaryoblastová leukémie

Při diagnóze se zjišťuje procento tzv. blastů (myeloidních buněk se zablokovanou diferenciací) ve dřeni, ale i jejich morfologie (např. azurofilní granulace, které tvoří tzv. Auerovy tyčky, *viz kapitola 4., obr. 4.11.*). Nezastupitelná je cytogenetická analýza odhalující chromozomovou přestavbu asociovanou s daným typem AML. Například nález translokace zahrnující chromozom 11q23 s genem *MLL* (mixed lineage leukemia, někdy označovaný *ALL1*) s následným vznikem fúzního genu kódujícího nový (chimérický) transkripční faktor (*obr. 2.11.*) je spojen se vznikem AML-M5b s nepříznivou prognózou.



Obr. 2.11. - Tzv. FISH (Fluorescent in situ hybridisation) analýza chromozomů leukemické buňky (zastavené v metafázi buněčného dělení) za použití dvou specifických sond, z nichž jedna hybridizuje ke genu *MLL* (sonda značená zelenou fluorescencí) a druhá ke genu *AF10* (gen nacházející se na chromozomu 10, sonda značená červenou fluorescencí). V buňce došlo k duplikaci genu *MLL* a jedna *MLL* kopie se dostala translokací do fúze s genem *AF10*, za vzniku fúzního onkogenního transkripčního faktoru *MLL/AF10*. Převzato z Jarošová a spol., 2005.²⁴

²² francouzsko-americko-britská klasifikace akutních leukemií

²³ **Penka M, Krahulcová E, Matýšková M:** Hematologie. Učební text. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 1994, 110 stran.

²⁴ **Jarosova M, Takacova S, Holzerova M, Priwitzerova M, Divoka M, Lakoma I, Mihal V, Indrak K, Divoky V:** Cryptic *MLL-AF10* fusion caused by insertion of duplicated 5' part of *MLL* into 10p12 in acute leukemia: a case report. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005;162 (2):179-182.

2.4.2. Akutní lymfoblastická leukémie

Akutní lymfoblastická leukémie (ALL) je nejčastějším maligním nádorovým onemocněním dětského věku. Tvoří až ¼ dětských nádorů. Vyskytuje se častěji u dětí z hospodářsky vyspělých zemí. Děti s chromozomálními poruchami (jako je např. Downův syndrom, Bloomův syndrom aj.) jsou 10x více ohroženy leukémií v prvních 10 letech svého života.

ALL vzniká maligní transformací progenitoru, který se diferencuje do lymfoblastů. Nekontrolovatelným množением těchto lymfoblastů dochází k potlačení růstu ostatních krevních buněk (trombocytů, erytrocytů a leukocytů), což způsobuje různé krvácivé projevy, anémii a zvýšenou náchylnost k infekcím. Onemocnění začíná v kostní dřeni, která je velmi dobře zásobena cévami, proto se blasty mohou šířit do ostatních tkání a orgánů. Také se ukládají v těchto orgánech (lymfatické uzliny, slezina a játra), ty se pak zvětšují a dochází k poruše jejich funkce. Lymfoblasty mají velmi omezenou nebo žádnou funkční schopnost, proto bývá potlačena humorální i buněčná imunita.

ALL patří mezi heterogenní onemocnění, s rozdílnými klinickými příznaky, laboratorními nálezy, morfologií nádorových buněk a jejich rozdílným fenotypem a genotypem.

Dle **FAB klasifikace** se ALL morfologicky dělí do tří skupin: L1, L2 a L3:

L1 - malé nádorové buňky- uniformní populace

L2 - malé i velké nádorové buňky- heterogenní populace (*viz kapitola 4., obr. 4.12.*)

L3 - velké nádorové buňky s basofilní cytoplazmou a vakuolizací

Toto dělení je však poněkud zastaralé a není příliš přínosné pro stanovení prognózy a léčby, proto se dnes používá klasifikace akutních lymfoblastických leukémií dle WHO²⁵ a EGIL.²⁶

WHO klasifikuje ALL podle toho, jaké buněčné znaky nesou:

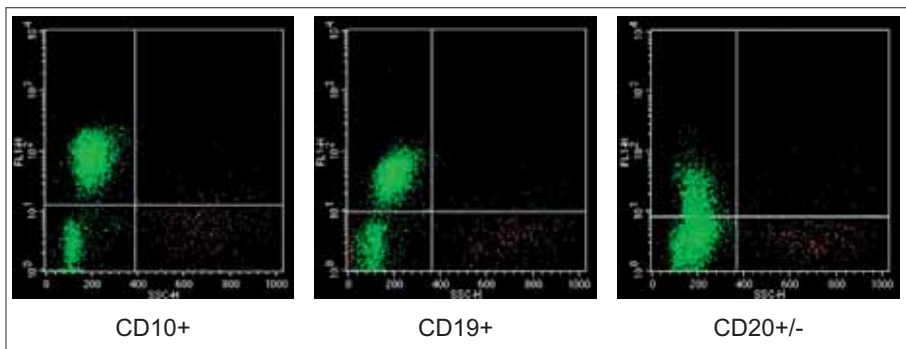
B- lymfoblastické leukémie/lymfomy jsou častější a nesou znaky prekurzorů B lymfocytů (tvoří asi 75% ze všech ALL).

T- lymfoblastické leukémie/lymfomy jsou vzácné, nesou znaky prekurzorů T lymfocytů (tvoří 25% ALL dospělého věku).

Evropská skupina pro **imunologickou klasifikaci leukémií (EGIL)** dělí leukémie na základě jejich imunofenotypu. V klinické praxi se imunofenotyp ALL určuje průtokovou cytometrií. Jednotlivé leukocytární populace lze rozlišit na základě tzv. CD („cluster of differentiation“) antigenů přítomných na povrchu buněk. Na **obr. 2.12.** je příklad imunofenotypizace nemocného s ALL, s převahou lymfoblastů pozitivních pro antigen CD-10 (77 %) a CD-19 (70 %) a s nižším zastoupením lymfoblastů s antigenem CD-20 (31 %). Tato charakteristika, spolu s detekcí dalších povrchových nebo intracelulárních antigenů, umožnila diagnostikovat tento typ ALL jako tzv. „Common B-ALL“. Tato charakteristika může specifikovat formu zvolené léčby u daného pacienta.

²⁵ World Health Organization

²⁶ European Group for the Immunological Characterization of Leukemias



Obr. 2.12. - Imunofenotypizace kostní dřeně nemocného s ALL. Suspenze mononukleárních buněk byla inkubována se specifickými protilátkami proti příslušným antigenům, které určují imunofenotyp leukemických lymfocytů. Pozitivní buňky pro daný antigen se nacházejí v levém horním poli. HOK FN Olomouc.

2.5. Chronické leukémie

Chronické leukémie narozdíl od akutních leukémií probíhají relativně pomalu, nejsou tak agresivní, leukemické buňky chronických leukémií mohou diferencovat (tj. nemají blok diferenciace), ale mají zvýšenou proliferaci a přežití (poruchu apoptózy). Tzv. **myeloproliferativní neoplazie** (MPN) jsou myeloidní hematologické malignity vycházející z postižené kmenové buňky. Současná klasifikace MPN podle Světové zdravotnické organizace (WHO) z roku 2008 uvádí osm odlišných jednotek: chronická myeloidní leukémie (CML) (*viz kapitola 4., obr. 4.10.*), polycythemia vera (PV), esenciální trombocytémie (ET) (*viz kapitola 4., obr. 4.7.*), primární myelofibróza (PMF), systémová mastocytóza, chronická eozinofilní leukémie, chronická neutrofilní leukémie a myeloproliferativní neoplazie jinak nezařazené.

Chronická lymfatická leukémie (CLL) vychází z lymfocytů a bývá řazena k **maligním lymfomům** (nádory lymfatických tkání). CLL postihuje většinou starší osoby a často bývá zjištěna náhodně při zvětšení uzlin. Laboratorně je charakteristická dominance zralých lymfocytů v krevním obraze a nález tzv. Gumprechtových stínů (*viz kapitola 4., obr. 4.6.*).

2.6. Použité zdroje a poděkování

Kromě zdrojů, které jsou uvedeny přímo v textu, byly pro sepsání této publikace použity diplomové a bakalářské práce studentů, kteří svoji práci vykonávali na Hemato-onkologické klinice LF UP a na Ústavu biologie LF UP. Jim, a především jejich školitelům, patří poděkování za pomoc při sestavení tohoto textu. Dalším zdrojem informací byly závěrečné zprávy grantů řešených na těchto dvou pracovištích.

Jsou to zvláště:

Divoká Martina: Molekulární biologie vybraných hematologických malignit. Diplomová práce, Olomouc, 2008, 53 stran.

Vedoucí práce: prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošová, CSc.

Hlobilová Marta: Molekulárně genetická analýza vybraných hematologických chorob. Diplomová práce, Olomouc, 2011, 52 stran.

Školitel: RNDr. Martina Divoká

Ruszová Veronika: Laboratorní diagnostika ALL. Absolventská práce, Olomouc, 2011, 82 stran.

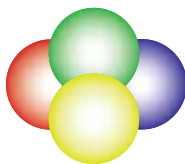
Vedoucí práce: Anna Lapčíková

Divoký Vladimír (Řešitel): Molekulárně-biologické mechanismy dědičných poruch tvorby . Závěrečná zpráva IGA MZ ČR N/6739-3. UP Olomouc, 55 stran a přílohy, 2004.

Spoluřešitel: prof. MUDr. Karel Indrák, DrSc.

5. téma

Laboratorní hematologie



3. PRAKTICKÁ ČÁST

Organizace práce v hematologické laboratoři (HOK)
Praktické úlohy semináře

OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ

Integrace vědy, výzkumu, odborného vzdělávání a praxe



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

3.1. Organizace práce v hematologické laboratoři (HOK)

3.1.1. Preanalytická fáze – příjem materiálu

Vyšetřovaný materiál – žilní krev – odebraná do zkumavky s protisrážlivým roztokem (K3EDTA) je dopravována ke zpracování na příjmovou laboratoř HOK FN Olomouc. V rámci příjmu probíhá:

- kontrola údajů na žádance a kontrola požadavků k vyšetření;
- kontrola řádného označení odebraného materiálu;
- vizuální kontrola odebraného vzorku (předepsané množství);
- třídění dodaného materiálu podle požadavků k vyšetření (krevní obraz - KO, KO + diferenciální rozpočet leukocytů, atd., viz obr. 3.1.);
- třídění materiálu podle preferencí na vyšetření
 - o „vitální indikace“
 - o „statim“
 - o „rutinní vyšetření“
- zadání požadavků na vyšetření do laboratorního informačního systému = přidělení čísla vyšetření;
- označení žádanky i vzorku identifikačním číselným kódem.

Dokument č.: Fim-L009-035-HOK-004, str. 1/1, Verze č.: 2

FAKULTNÍ NEMOCNICE OLOMOUČ
I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
Tel: 588 441 111, E-mail: info@fnol.cz
IC: 00000000

ŽÁDANKA NA KREVNÍ OBRAZ
Hemato-onkologická klinika
hematologie@fnol.cz
přijem materiálu tel.: 588 443 288

PACIENT (unifikovaný štítek) *není-li zaškrtnuto, jde o RUTINU

| | |
|--|--|
| Rodné číslo - číslo pojistného: (není-li kč, pak datum narození) | STATIM * |
| Jméno a příjmení: | VITÁLNÍ INDIKACE * |
| Adresa: | |
| <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> Z Kód zdravotní pojistovny (přílože) | Diagnóza <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |
| | Diagnóza II. <input type="checkbox"/> |

ŽADATEL

| | |
|---|--------------------------------|
| Razítko pracoviště: (adresa, IČP, oborové) | Razítko, iČÚ, a podpis lékaře: |
| | Tel/fax: <input type="text"/> |
| | Oddělení: <input type="text"/> |

** uveďte skutečné datum odběru (nikoliv datum vystavení žádanky)

| | |
|-----------------------|----------------------|
| <input type="text"/> | <input type="text"/> |
| Datum a čas odběru ** | Datum a čas příjmu |

SDĚLENÍ PRO LABORATOŘ – označe B

| | | | |
|---|--|---------------------------------|-----------------------------|
| <input type="checkbox"/> po operaci | <input type="checkbox"/> EM | <input type="checkbox"/> Tr | <input type="checkbox"/> MP |
| <input type="checkbox"/> odběr z žilní | <input type="checkbox"/> cytotatika | <input type="checkbox"/> infuze | <input type="checkbox"/> RF |
| <input type="checkbox"/> odběr z kanyly | <input type="checkbox"/> jiné (vyplňte): | | |

POŽADOVANÉ VYŠETŘENÍ – označe B

| | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> krevní obraz (Le, Ery, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, Tr) | <input type="checkbox"/> jiné (vyplňte): |
| <input type="checkbox"/> krevní obraz + 5-ti populační diferenciální analyzátorový | |
| <input type="checkbox"/> krevní obraz + retikulocyty | |
| <input type="checkbox"/> krevní obraz + 5-ti populační diferenciální analyzátorový + retikulocyty | |

VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ

| | | | | | |
|---|-----------|------------|--------------------------|------------|--------------------------|
| Hemoglobin | _____ g/l | Erytrocyty | _____ 10 ⁹ /l | Hematokrit | _____ ratio |
| MCV | _____ fl | Leukocyty | _____ 10 ⁹ /l | Trombocyty | _____ 10 ⁹ /l |
| Hlášeno v _____ hod., komu: _____ hlásil: _____ | | | | | |

Spektrum prováděných vyšetření a pokyny k odběru biologického materiálu jsou uvedeny na adrese www.fnol.cz, sekce „Pro odborníky“ menu: Laboratorní vyšetření

Obr. 3.1. - Foto žádanky FN Olomouc.

3.1.2. Stanovení základních parametrů krevního obrazu (HOK)

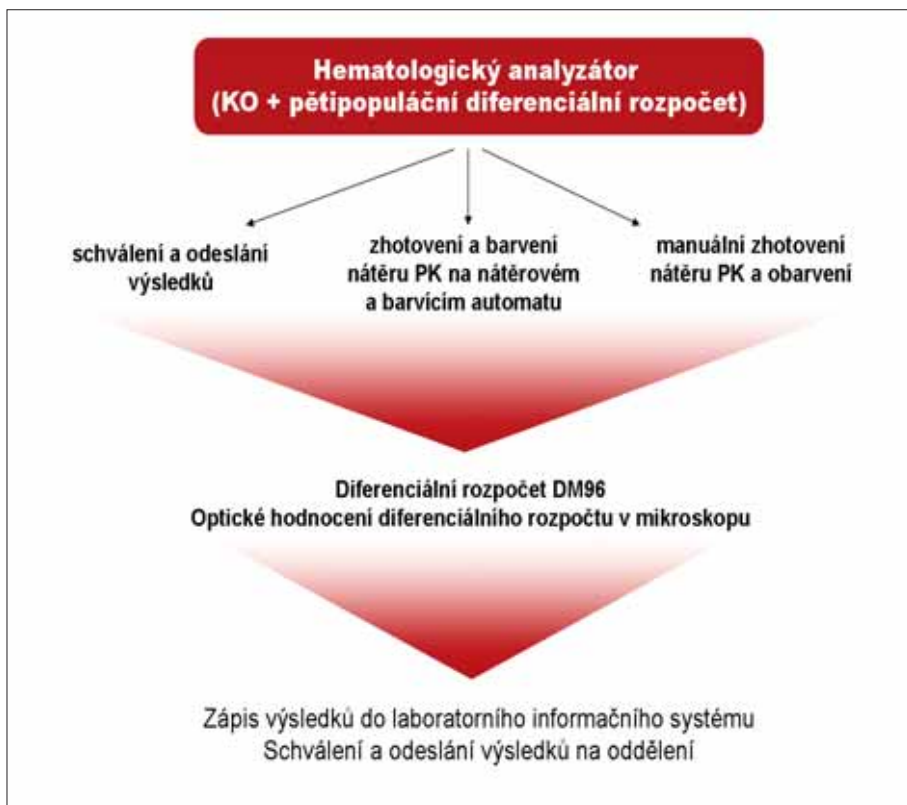
Stanovení parametrů krevního obrazu (KO) patří mezi základní vyšetření každého nemocného. Mezi hlavní parametry KO patří počet červených krvinek (erytrocytů), počet bílých krvinek (leukocytů) a počet krevních destiček (trombocytů) v periferní krvi. Počty krvinek v litru krve se u každého jedince vztahují k tzv. referenčním hodnotám (stanoveným ze skupiny zdravých lidí). Uvádějí se různé referenční hodnoty pro novorozence, děti a dospělé i pro muže a ženy. KO se na HOK stanovuje na automatických hematologických analyzátoch (*obr. 3.2.*). Tyto analyzátory však současně (kromě základního počtu krevních elementů) měří také další parametry erytrocytů, parametry trombocytů a diferenciální rozpočet leukocytů (viz dále).



Obr. 3.2. - Automatický analyzátor Sysmex XE-5000, generující kromě základních parametrů KO i parametry erytrocytů, trombocytů a pěti-populační diferenciaci. Jedná se o technologii průtokového cytometru, využívající k analýze kombinace laseru a cytochemického barvení. Některé parametry jsou stanoveny pomocí lýzy buněk za specifických podmínek. HOK LF UP a FN Olomouc.

Vlastní měření na hematologických analyzátoch zahrnuje následující kroky:

- důkladné promíchání vzorků před vlastním měřením;
- měření vzorků v kazetovém módu podle preferencí;
- měření v netypických odběrových nádobkách v manuálním módu;
- zhodnocení naměřených parametrů, zvážení nutnosti dalšího zpracování a zhotovení nátěru periferní krve pro stanovení manuálního diferenciálního rozpočtu leukocytů (*viz obr. 3.3.*).



Obr. 3.3. - Schéma základních kroků práce v laboroři rutinního provozu HOK FN Olomouc.

3.1.3. Pěti-populační diferenciální rozpočet a stanovení retikulocytů

Jedná se o procentuální stanovení jednotlivých typů leukocytů a příp. i stanovení retikulocytů metodou průtokové cytometrie v kombinaci s cytochemickým barvením a lýzou buněk na automatických analyzátoch (*obr. 3.2.*).

Fyziologické hodnoty diferenciálního rozpočtu krve dospělého člověka:

Segmenty neutrofilní 50-75 %

Eozinofily 1-5 %

Bazofily do 1 %

Lymfocyty 15-40 %

Monocyty 3-10 %

Referenční meze retikulocytů na HOK FN Olomouc: 5-25 %

Odchytky v diferenciálním rozpočtu leukocytů vypovídají o výskytu infekcí, zánětů, o poruchách imunitního systému i o možné přítomnosti nádorového onemocnění. Stanovení retikulocytů umožňuje posoudit dynamiku vzniku a zániku erytrocytů. Na obrázcích 3.4. až 3.6. jsou ukázky výstupů z automatického analyzátoru Sysmex XE-5000 u zdravého jedince (*obr. 3.4.*) a u nemocného s mikrocytární anémií (*obr. 3.5.*) a s chronickou lymfatickou leukémií (*obr. 3.6.*).

| 1/1 | | | | |
|---|----------|----------------------|--|-----------|
| Laboratoře Hemato-onkolog. kliniky HOK FN Olomouc I. P. Pavlova 6 77500 Olomouc | | Telefon: 585 853 288 | e-mail: hematologie@fnol.cz www.fnol.cz OpenLIMS STAPRO s. r. o. | |
| Název metody | Výsledek | Jednotky | Meze | Hodnocení |
| KREVNÍ OBRAZ | | | | |
| Leukocyty | 4,89 | 10 ⁹ /l | 4,00 - 10,00 | (*) |
| Erytrocyty | 4,62 | 10 ¹² /l | 4,00 - 5,80 | (*) |
| Hemoglobin | 146 | g/l | 135 - 175 | (*) |
| Hematokrit | 0,43 | . | 0,40 - 0,50 | (*) |
| Stř.objem ERY | 92,0 | fl | 82,0 - 98,0 | (*) |
| Hemoglobin ERY | 31,6 | pg | 28,0 - 34,0 | (*) |
| Stř.bar.konc.ERY | 34,4 | g/dl | 32,0 - 36,0 | (*) |
| Šíře distr. ERY | 13,2 | % | 10,0 - 15,2 | (*) |
| Trombocyty | 168 | 10 ⁹ /l | 150 - 400 | (*) |
| Stř.objem tromb. | 10,5 | fl | 7,8 - 11,0 | (*) |
| Diferenciál z analyzátoru | | | | |
| Lymfocyty % | 31,9 | % | 20,0 - 45,0 | (*) |
| Monocyty % | 11,9 | % | 2,0 - 12,0 | (*) |
| Neutrofilly % | 54,4 | % | 45,0 - 70,0 | (*) |
| Eozinofily % | 1,4 | % | 0,0 - 5,0 | (*) |
| Bazofily % | 0,4 | % | 0,0 - 2,0 | (*) |
| Lymfocyty # | 1,56 | 10 ⁹ /l | 0,80 - 4,00 | (*) |
| Monocyty # | 0,58 | 10 ⁹ /l | 0,08 - 1,20 | (*) |
| Neutrofilly # | 2,66 | 10 ⁹ /l | 2,00 - 7,00 | (*) |
| Eozinofily # | 0,07 | 10 ⁹ /l | 0,00 - 0,50 | (*) |
| Basofily # | 0,02 | 10 ⁹ /l | 0,00 - 0,20 | (*) |

Obr. 3.4. - Příklad výstupu z automatického analyzátoru Sysmex XE-5000 se základními parametry KO, s parametry erytrocytů, trombocytů a s pěti-populačním diferenciálem leukocytů. Jedná se o zdravého jedince, hodnocení všech parametrů () je vždy uprostřed referenčních mezí.*

Laboratoře Hemato-onkolog. kliniky
HOK FN Olomouc
I. P. Pavlova 6 77500 Olomouc

Telefon: 585 853 288

e-mail: hematologie@fnol.cz
www.fnol.cz

OpenLIMS STAPRO s.r.o.

| Název metody | Výsledek | Jednotky | Meze | Hodnocení |
|----------------------------------|----------|---------------------|---------------|---------------|
| KREVNÍ OBRAZ | | | | |
| Leukocyty | 4,75 | 10 ⁹ /l | 4,00 - 10,00 | [(*)] [] |
| Erytrocyty | 4,03 | 10 ¹² /l | 3,80 - 5,20 | [] [*] [] |
| Hemoglobin | 75 | g/l | 120 - 160 | * [] [] [] |
| Hematokrit | 0,26 | | 0,35 - 0,47 | * [] [] [] |
| Stř.objem ERY | 65,3 | fl | 82,0 - 98,0 | * [] [] [] |
| Hemoglobin ERY | 18,6 | pg | 28,0 - 34,0 | * [] [] [] |
| Stř.bar.konc.ERY | 28,5 | g/dl | 32,0 - 36,0 | * [] [] [] |
| Šíře distr. ERY | 17,2 | % | 10,0 - 15,2 | [] [] [*] |
| Trombocyty | 212 | 10 ⁹ /l | 150 - 400 | [] [*] [] |
| Stř.objem tromb. | 9,0 | fl | 7,8 - 11,0 | [] [*] [] |
| Diferenciál z analyzátoru | | | | |
| Lymfocyty % | 32,2 | % | 20,0 - 45,0 | [] [*] [] |
| Monocyty % | 10,5 | % | 2,0 - 12,0 | [] [*] [] |
| Neutrofilly % | 56,7 | % | 45,0 - 70,0 | [] [*] [] |
| Eozinofily % | 0,2 | % | 0,0 - 5,0 | [] [*] [] |
| Bazofily % | 0,4 | % | 0,0 - 2,0 | [] [*] [] |
| Lymfocyty # | 1,53 | 10 ⁹ /l | 0,80 - 4,00 | [] [*] [] |
| Monocyty # | 0,50 | 10 ⁹ /l | 0,08 - 1,20 | [] [*] [] |
| Neutrofilly # | 2,69 | 10 ⁹ /l | 2,00 - 7,00 | [] [*] [] |
| Eozinofily # | 0,01 | 10 ⁹ /l | 0,00 - 0,50 | [] [*] [] |
| Basofily # | 0,02 | 10 ⁹ /l | 0,00 - 0,20 | [] [*] [] |
| Diferenciál manuální | | | | |
| Manuální DIF | dodáme | | | |
| Provedl | ... | | | |
| Retikulocyty | | | | |
| Retikulocyty | 0,008 | ratio | 0,005 - 0,025 | [] [*] [] |

Obr. 3.5. - Příklad výstupu z automatického analyzátoru Sysmex XE-5000 se základními parametry KO, s parametry erytrocytů, trombocytů a s pěti-populačním diferenciálem leukocytů. Jedná se o nemocného s **hypochromní mikrocytární anémií**. Základní počet erytrocytů na litr krve je u nemocného sice v normě, ale abnormálně sníženy jsou hodnoty hemoglobinu, hematokritu, a některé další parametry erytrocytu (viz také kap. 4. – Obrazová příloha, Obr. 4.3.). Diferenciální rozpočet leukocytů je normální.

Laboratoř Hemato-onkolog. kliniky
HOK FN Olomouc
I. P. Pavlova 6 77500 Olomouc

Telefon: 585 853 289

e-mail: hematologie@fnol.cz
www.fnol.cz

OpenLIMS STAPRO s. r. o.

| Název metody | Výsledek | Jednotky | Meze | Hodnocení |
|----------------------------------|----------|---------------------|--------------|-----------|
| KREVNÍ OBRAZ | | | | |
| Leukocyty | 212,45 | 10 ⁹ /l | 4,00 - 10,00 | * |
| Erytrocyty | 3,05 | 10 ¹² /l | 4,00 - 5,80 | * |
| Hemoglobin | 99 | g/l | 135 - 175 | * |
| Hematokrit | 0,34 | | 0,40 - 0,50 | * |
| Stř.objem ERY | 110,5 | fl | 82,0 - 98,0 | * |
| Hemoglobin ERY | 32,5 | pg | 28,0 - 34,0 | * |
| Stř.bar.konc.ERY | 29,4 | g/dl | 32,0 - 36,0 | * |
| Šíře distr. ERY | 17,9 | % | 10,0 - 15,2 | * |
| Trombocyty | 177 | 10 ⁹ /l | 150 - 400 | * |
| Stř.objem tromb. | 9,7 | fl | 7,8 - 11,0 | * |
| Diferenciál z analyzátoru | | | | |
| Lymfocyty % | 95,8 | % | 20,0 - 45,0 | * |
| Monocyty % | 2,2 | % | 2,0 - 12,0 | * |
| Neutrofilly % | 0,7 | % | 45,0 - 70,0 | * |
| Eozinofily % | 0,1 | % | 0,0 - 5,0 | * |
| Bazofily % | 1,2 | % | 0,0 - 2,0 | * |
| Lymfocyty # | 203,53 | 10 ⁹ /l | 0,80 - 4,00 | * |
| Monocyty # | 4,72 | 10 ⁹ /l | 0,08 - 1,20 | * |
| Neutrofilly # | 1,39 | 10 ⁹ /l | 2,00 - 7,00 | * |
| Eozinofily # | 0,24 | 10 ⁹ /l | 0,00 - 0,50 | * |
| Basofily # | 2,57 | 10 ⁹ /l | 0,00 - 0,20 | * |

Obr. 3.6. - Příklad výstupu z automatického analyzátoru Sysmex XE-5000 se základními parametry KO, s parametry erytrocytů, trombocytů a s pěti-populačním diferencíálem leukocytů. Jedná se o **nemocného s chronickou lymfatickou leukémií**. Základní počet leukocytů na litr krve je u nemocného výrazně zvýšen, a v diferenciálním rozpočtu dominují lymfocyty (viz také kap. 4. – Obrazová příloha, Obr. 4.6.).

3.1.4. Zhodnocení nátěru periferní krve a manuální diferenciál krevního obrazu

Jedná se o procentuální stanovení jednotlivých typů bílých krvinek mikroskopicky na speciálně obarveném mikroskopickém preparátu.

Zhotovení a barvení nátěrů periferní krve

- automatické zhotovení pomocí nátěrového a barvicího automatu
- manuální zhotovení nátěru, jeho fixace a obarvení panoptickým barvením (May-Grünwald, Giemsa-Romanowski).

Vyhodnocení manuálního diferenciálního rozpočtu v mikroskopu

- začínáme vždy přehledným zhodnocením nátěru PK při zvětšení 200x až 400x;
- vlastní hodnocení provádíme při zvětšení 1 000x imerzním objektivem:
 1. kvantitativní hodnocení, tj. diferenciální rozpočet leukocytů (na 100 elementů) (*obr. 3.7.*);
 2. kvalitativní hodnocení morfologických změn buněk všech vývojových řad;
- zápis výsledků do laboratorního informačního systému (*viz obr. 3.3.*)

| 1/2 | | | | |
|---|-----------|----------------------|--|-----------|
| Laboratoře Hemato-onkolog. kliniky HOK FN Olomouc I. P. Pavlova 6 77500 Olomouc. | | Telefon: 585 853 288 | e-mail: hematologie@fnol.cz www.fnol.cz OpenLIMS STAPRO s. r. o. | |
| Název metody | Výsledek | Jednotky | Meze | Hodnocení |
| KREVNÍ OBRAZ | | | | |
| Leukocyty | 82,55 | 10 ⁹ /l | 4,00 - 10,00 | * |
| Erytrocyty | 4,51 | 10 ¹² /l | 3,80 - 5,20 | * |
| Hemoglobin | 131 | g/l | 120 - 160 | * |
| Hematokrit | 0,41 | . | 0,35 - 0,47 | * |
| Stř. objem ERY | 90,2 | fl | 82,0 - 98,0 | * |
| Hemoglobin ERY | 29,0 | pg | 28,0 - 34,0 | * |
| Stř. bar. konc. ERY | 32,2 | g/dl | 32,0 - 36,0 | * |
| Šíře distr. ERY | 15,9 | % | 10,0 - 15,2 | * |
| Trombocyty | 887 | 10 ⁹ /l | 150 - 400 | * |
| Stř. objem tromb. | 11,8 | fl | 7,8 - 11,0 | * |
| Diferenciál z analyzátoru | | | | |
| Lymfocyty % | nelze h. | % | 20,0 - 45,0 | |
| Monocyty % | nelze h. | % | 2,0 - 12,0 | |
| Neutrofilů % | nelze h. | % | 45,0 - 70,0 | |
| Eozinofilů % | nelze h. | % | 0,0 - 5,0 | |
| Bazofilů % | nelze h. | % | 0,0 - 2,0 | |
| Lymfocyty # | nelze h. | 10 ⁹ /l | 0,80 - 4,00 | |
| Monocyty # | nelze h. | 10 ⁹ /l | 0,08 - 1,20 | |
| Neutrofilů # | nelze h. | 10 ⁹ /l | 2,00 - 7,00 | |
| Eozinofilů # | nelze h. | 10 ⁹ /l | 0,00 - 0,50 | |
| Basofilů # | nelze h. | 10 ⁹ /l | 0,00 - 0,20 | |
| Diferenciál manuální | | | | |
| Manuální DIF | proveden | . | . | . |
| Neutrofilní segment | 47 | % | 47 - 70 | * |
| Neutrofilní tyč | 19 | % | 0 - 4 | * |
| Eozinofilů | 1 | % | 0 - 5 | * |
| Bazofilů | 2 | % | 0 - 1 | * |
| Monocyt | 1 | % | 2 - 10 | * |
| Lymfocyt | 7 | % | 20 - 45 | * |
| Neutrof. metamyelocyt | 5 | % | 0 - 0 | * |
| Neutrofilní myelocyt | 18 | % | 0 - 0 | * |
| Anizocytóza | + | . | . | . |
| Toxická granulace | + | . | . | . |
| Provedl | Dvořáková | . | . | . |
| Retikulocyty | | | | |
| Retikulocyty | 0,020 | ratio | 0,005 - 0,025 | * |

Obr. 3.7. - Příklad výstupu z automatického analyzátoru Sysmex XE-5000 se základními parametry KO, s parametry erytrocytů, trombocytů. Počet leukocytů na litr krve je u nemocného výrazně zvýšen. Výrazně patologický diferenciální rozpočet musel být vyhodnocen manuálně. Diferenciální rozpočet leukocytů hodnocený na 100 elementů ukázal převahu granulocytární řady, s vyzrávajícími elementy, ale s posunem k mladším formám. Jednalo se o **nemocného s chronickou myeloidní leukémií**.

3.1.5. Obsluha nátěrového a barvicího automatu

Nátěrový a barvicí automat SP-1000i (*obr. 3.8.*) zhotoví na základě předem definovaných podmínek standardní nátěr periferní krve. Využívá výsledků naměřených hematologickým analyzátozem, např.hodnotu hematokritu tak, aby nátěr periferní krve byl vždy optimální pro další zpracování. Zhotovený nátěr označí identifikačním číslem, obarví panoptickým barvením a osuší. Tento preparát je připraven k hodnocení v mikroskopu, nebo pomocí hematologického analyzátoru DM96.



Obr. 3.8 - Hematologický analyzátor Sysmex XE-5000 a nátěrový a barvicí automat SP-1000i.

3.1.6. Využití automatu pro diferenciální rozpočet periferní krve

Hematologický analyzátor DM96 (*obr. 3.9.*) hodnotí nátěry periferní krve, zhotovené pomocí nátěrového a barvicího automatu (*viz příklady v Obrazové příloze, kap. 4.*). Můžeme jej využít i ke skenování nátěrů kostní dřeně a preparátů, zhotovených centrifugací likvoru a jiných biologických materiálů. V kazetovém systému pomocí mikroskopu probíhá skenování všech obarvených elementů v nátěru periferní krve. Naskenované obrazy jsou pomocí definovaných parametrů předklasifikované do jednotlivých buněčných subpopulací. Při vlastním hodnocení je třeba všechny naskenované elementy prohlédnout a zařadit, hodnotíme také morfologii leukocytů, erytrocytů a trombocytů. Výsledek je exportován do laboratorního informačního systému. Výhodou analyzátoru je i možnost uchování všech provedených analýz i jejich sdílení a zaslání na jiná pracoviště.



Obr. 3.9. - Hematologický analyzátor DM96 (HOK FN Olomouc).

3.1.7. Schvalování výsledků a jejich export

Před odesláním výsledků na jednotlivá oddělení proběhne vždy:

- kontrola naměřených hodnot;
- srovnání s předcházejícími vyšetřeními daného pacienta;
- vyhodnocení získaných parametrů KO;
- schválení, uvolnění výsledků a jejich export na jednotlivá oddělení (*viz obr. 3.3.*).

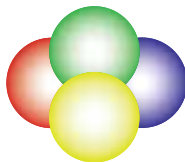
3.2. Praktické úlohy semináře

V rámci semináře budou demonstrovány výsledky laboratorních metod a ukázky interpretace vyšetření na Hemato-onkologické klinice (HOK) a na Ústavu biologie (ÚB):

- Zhotovení a barvení nátěrů periferní krve
- Hodnocení manuálního diferenciálního rozpočtu v mikroskopu
 - o přehledné zhodnocení nátěru PK při zvětšení 200x až 400x
 - o vlastní hodnocení při zvětšení 1 000x imerzním objektivem (kvantitativní hodnocení na 100 elementů a kvalitativní hodnocení morfologických změn buněk)
- stanovení počtu retikulocytů (*viz kapitola 4., obr. 4.13.*)
- Charakteristika vybraného hemato-onkologického onemocnění (chronická myeloidní leukémie) (HOK, ÚB)

5. téma

Laboratorní hematologie



4. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA

Fotogalerie nátěrů periferní krve a kostní dřeně

K focení byl použit fluorescenční mikroskop Olympus BX51, s digitální barevnou kamerou DP70 (Ústav biologie LF UP), případně Hematologický analyzátor DM96 (Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc).

Autor fotografií:

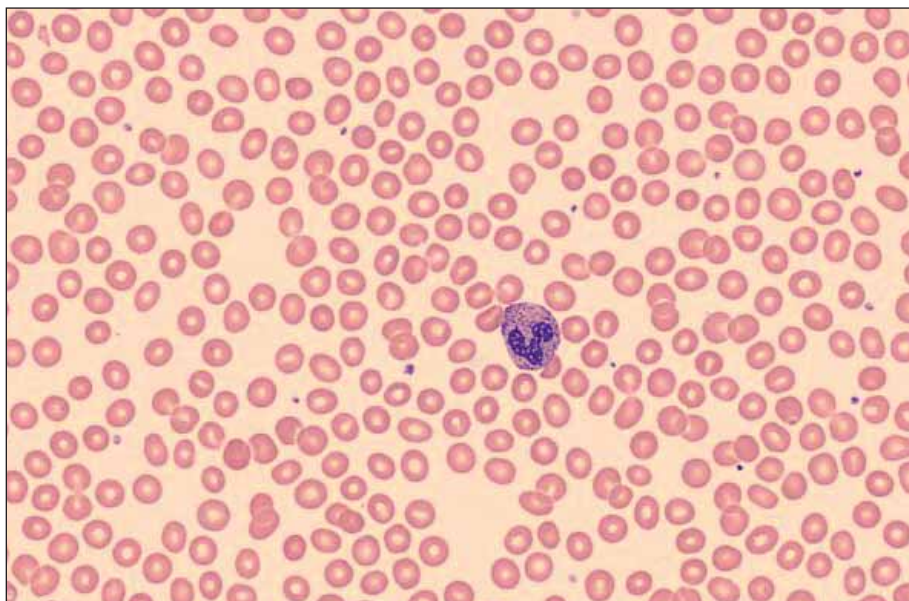
A. Lapčíková, Hemato-onkologická klinika LF UP Olomouc.
U jednotlivých fotografií je uvedeno původní zvětšení.

OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ

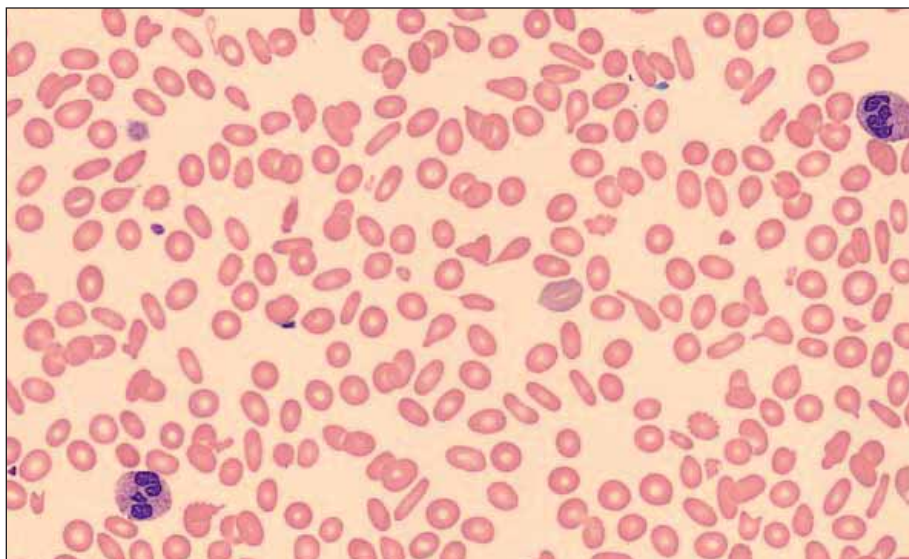
Integrace vědy, výzkumu, odborného vzdělávání a praxe



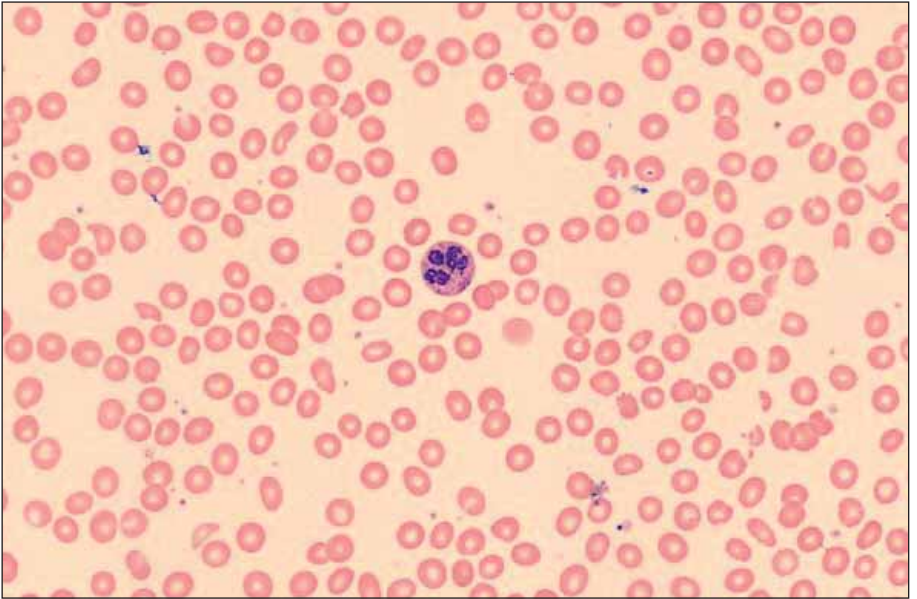
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



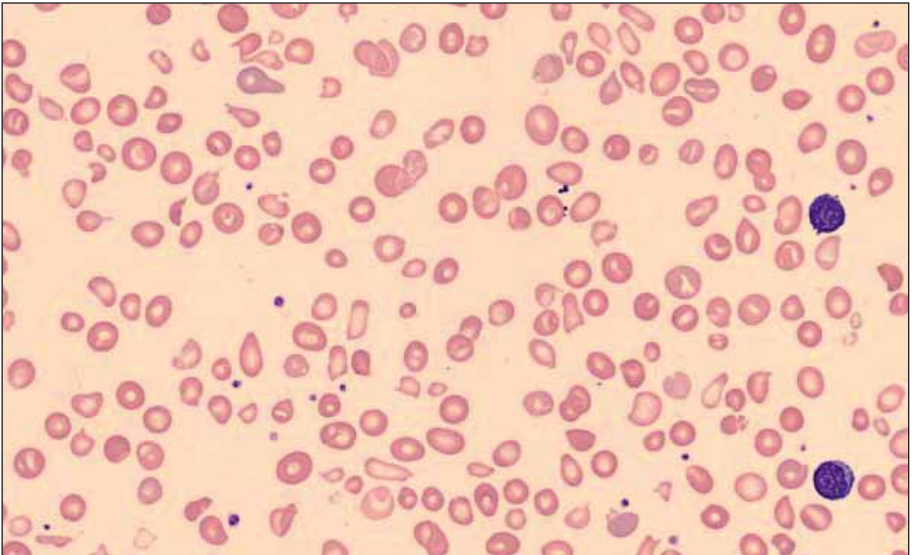
Obr. 4.1. - **Nátěr periferní krve zdravého člověka.** Hematologický analyzátor DM96, orig. zvětšení 1000x.



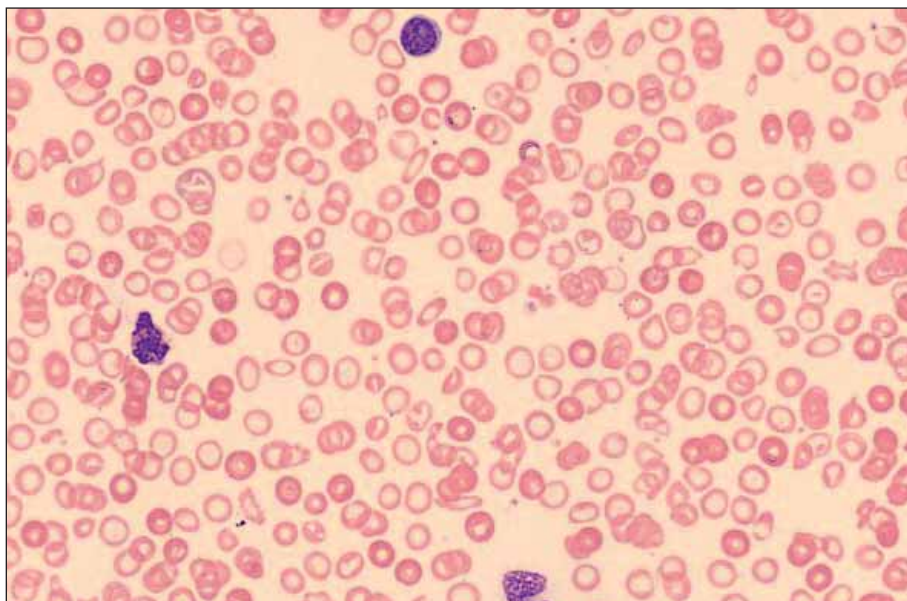
Obr. 4.2. - **Nátěr periferní krve pacienta s nápadnou eliptocytózou.** Pozorujeme i rozdílnou velikost červených krvinek (anizocytózu) a různé další odchylky tvaru erytrocytů (poikilocytózu). Hematologický analyzátor DM96, orig. zvětšení 1000x.



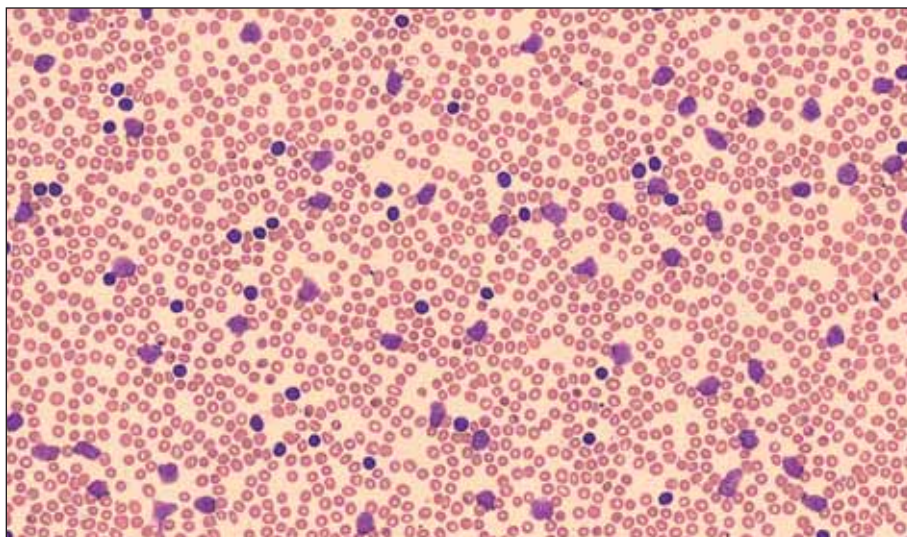
Obr. 4.3. - Nátěr periferní krve pacienta s mikrocytární anémií. Naměřená hodnota MCV (středního objemu erytrocytů) byla výrazně snížena. Hematologický analyzátor DM96, orig. zvětšení 1000x.



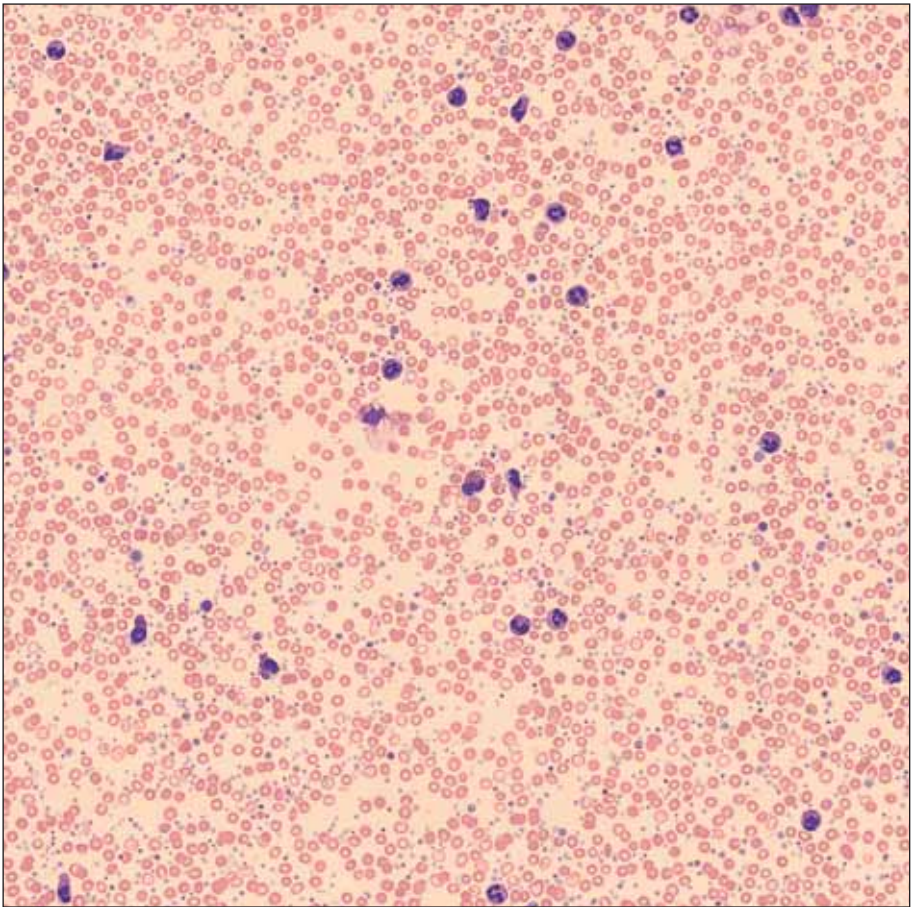
Obr. 4.4. - Nátěr periferní krve pacientky s velmi těžkou vrozenou anémií, konkrétně se jednalo o pacientku s talasemií major. Pozorujeme nápadnou anizocytózu, anisochromázií, terčovitě erytrocyty i různé tvarové odchylky červených krvinek. Hematologický analyzátor DM96, orig. zvětšení 1000x.



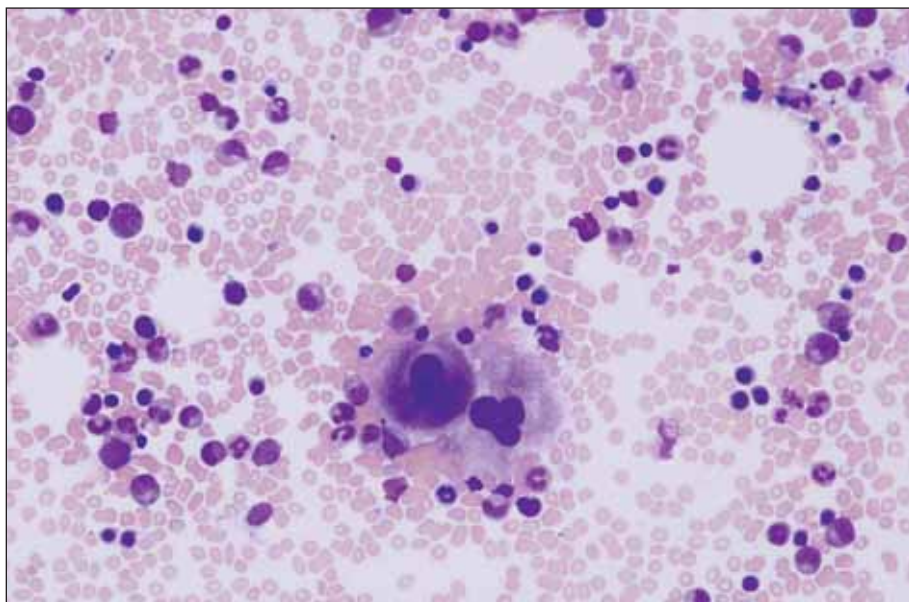
Obr. 4.5. - **Hypochromní erytrocyty v nátěru periferní krve** u nemocné s výrazně sníženou hladinou hemoglobinu. Hematologický analyzátor DM96, orig. zvětšení 1000x.



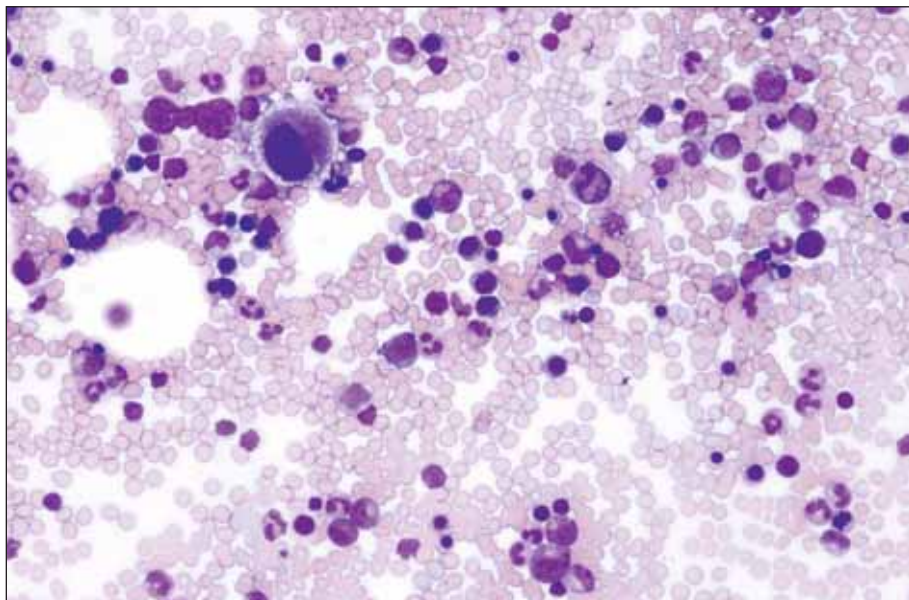
Obr. 4.6. - **Nátěr periferní krve nemocného s chronickou lymfatickou leukémií.** V krevním obraze je nápadná leukocytóza a lymfocytóza. V nátěru dominují zralé lymfocyty, velmi často nacházíme tyto lymfocyty rozetřené a popisujeme je jako tzv. buněčné (Gumprechtovy) stíny. Hematologický analyzátor DM96, orig. zvětšení 500x.



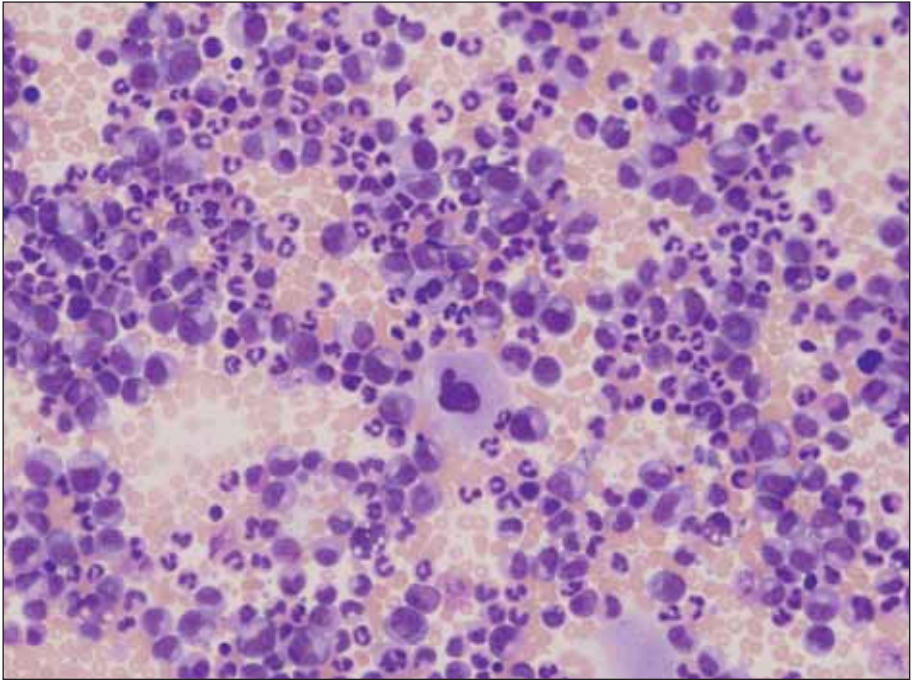
*Obr. 4.7. - **Obraz nátěru periferní krve nemocného s esenciální trombocytémií.** Jedná se o typ myeloproliferativní choroby s postižením myeloidních řad. V nátěru periferní krve je vidět zmožnění vyvrávajících myeloidních elementů (neutrofilů) a zvláště výrazné zmožnění různě velkých trombocytů. Hematologický analyzátor DM96, orig. zvětšení 500x.*



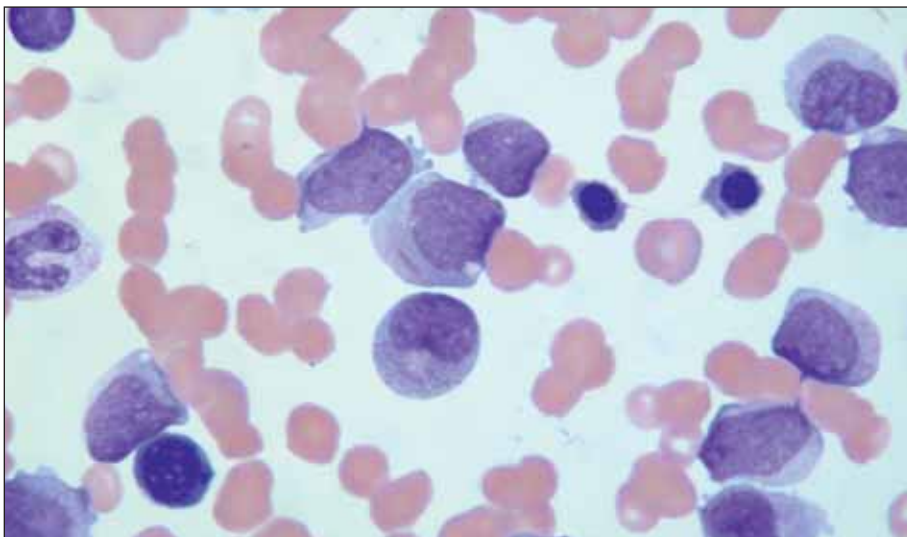
Obr. 4.8. - Nátěr kostní dřeně s přiměřeným zastoupením všech vyzárajících vývojových řad. Mikroskop Olympus BX51, orig. zvětšení 500x.



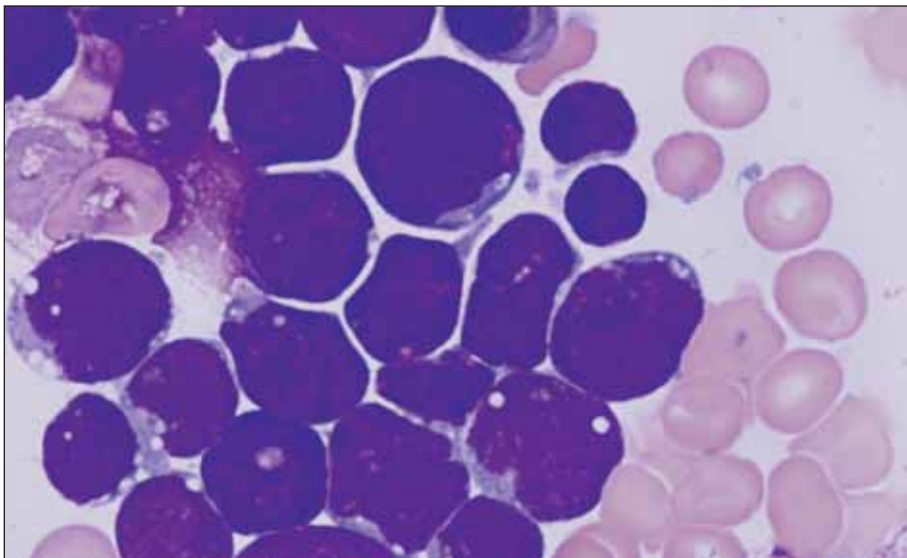
Obr. 4.9. - Normálně buněčný nátěr kostní dřeně. Granulopoéza, erytropoéza i megakaryopoéza jsou zastoupeny přiměřeně. Mikroskop Olympus BX51, orig. zvětšení 500x.



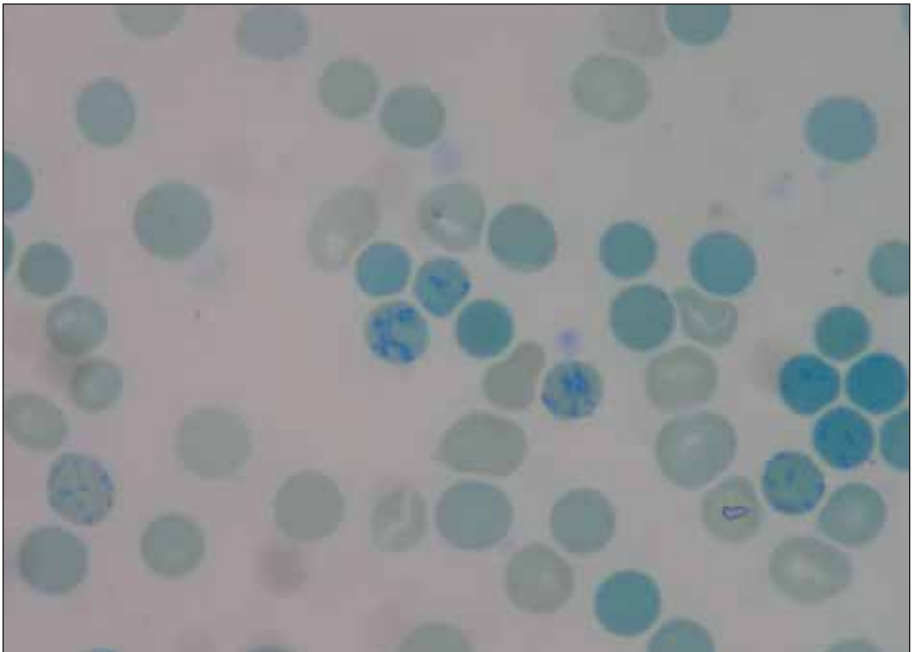
Obr. 4.10. - Nátěr kostní dřeně pacienta s chronickou myeloidní leukémií. Pro toto myeloproliferativní onemocnění je charakteristická výrazně hypercelulární kostní dřeň, dominují elementy vyzrávající granulocytární řady, pozorujeme vyšší zastoupení eosinofilních a basofilních polynukleárů. Mikroskop Olympus BX51, orig. zvětšení 500x.



Obr. 4.11. - Kostní dřeň pacienta s akutní myeloidní leukémií. V diferenciálním rozpočtu je více než 20 % blastických buněk s bohatší cytoplazmou a výraznými jadérky. V některých myeloblastech pozorujeme jemnou granulaci a také tzv. Auerovy tyčky (šípka), které jsou specifické pro akutní myeloidní leukémii. Mikroskop Olympus BX51, orig. zvětšení 1000x.



Obr. 4.12. - Kostní dřeň nemocného s akutní lymfoblastickou leukémií. Je vidět akumulace lymfoblastů s úzkým lemem basofilní cytoplazmy. V blastických buňkách pozorujeme vakuolizaci, jádra různě velkých lymfoblastů jsou často členěna zářezy. Mikroskop Olympus BX51, orig. zvětšení 1000x.



Obr. 4.13. - Průkaz retikulocytů po supravitálním barvení periferní krve brilantkresylovou modří. Vlastní hodnocení při zvětšení 1 000x imerzním objektivem (kvantitativní hodnocení na 100 bezjaderných buněk).

Anna Lapčíková
Doc. RNDr. Vladimír Divoký, Ph.D.
Mgr. Monika Horváthová, Ph.D.
RNDr. Ivana Fellnerová, Ph.D.

Laboratorní hematologie

Výkonný redaktor: Prof. RNDr. Tomáš Opatrný, Dr.
Odborný redaktor: RNDr. Ivana Fellnerová, Ph.D.
Odpovědná redaktorka: Mgr. Jana Kreiselová
Technický redaktor: Books print s.r.o., I.P.Pavlova 69, Olomouc 772 00
www.booksprint.cz

Návrh obálky: Vlastislav Bič

Publikace je určena jako vzdělávací materiál pro účastníky projektu Od fyziologie k medicíně – integrace vědy, výzkumu odborného vzdělávání a praxe (CZ.1.07/2.3.00/09.0219)

© Univerzita Palackého v Olomouci, 2011
Křížkovského 8, 771 47 Olomouc
www.upol.cz/vup
e-mail: vup@upol.cz
Olomouc 2011

Neoprávněné užití tohoto díla je porušením autorských práv a může zakládat občanskoprávní, popř. trestněprávní odpovědnost.

Tato publikace neprošla redakční jazykovou úpravou.

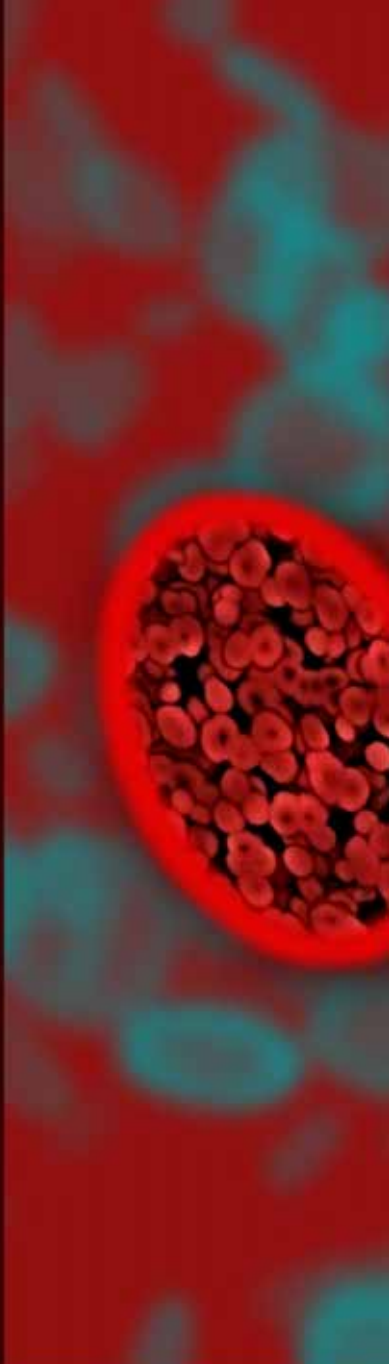
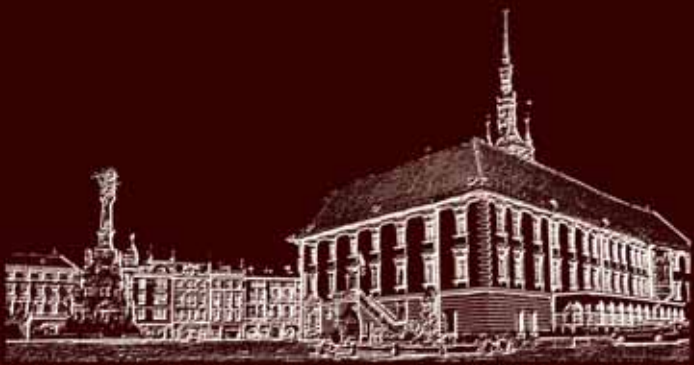
© Anna Lapčíková, Vladimír Divoký, Monika Horváthová, Ivana Fellnerová 2011

1. vydání

ISBN 978-80-244-2876-5

Neprodejné

Katedra zoologie, Přírodovědecká
fakulta UP Olomouc



VYDALA UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI 2011
ISBN 978-80-244-2876-5