

## Speciální barvicí metody

Speciální barvicí metody slouží ke znázornění takových struktur a součástí krvinek, které se neznázorňují při panoptickém barvení.

Důkaz enzymů probíhá ve dvou stupních:

- 1) přímá enzymová reakce, při níž vzniká primární reakční produkt
- 2) vycytávací reakce, při níž přechází primární reakční produkt do špatně rozpustného barviva.

### Důkaz alkalické fosfatázy v leukocytech

#### *Teorie*

Alkalická fosfatáza je lysozomální enzym přítomný v sekundárních granulích neutrofilů. Fosfatázy, přesněji fosfomonoesterázy jsou enzymy, které uvolňují kyselinu ortho-fosforečnou z vazby na alkohol nebo aromatický monoester. Existuje pravděpodobně větší spektrum fosfomonoesteráz v buněčné struktuře a nebo tekutině. Zaměříme-li se pouze na pH, rozlišují se 2 typy enzymů: alkalická fosfatáza (ALP) a kyselá fosfatáza (KP), které se vzájemně liší v některých vlastnostech. ALP na rozdíl od KP jsou aktivovány  $Mg^{2+}$ , méně  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ .  $F^-$  inhibují pouze KP, ne ALP. Jsou známy nejméně 2 typy ALP, jedna se aktivuje  $Zn^{2+}$ , druhá  $Mn^{2+}$ .

#### *Princip*

Leukocytární alkalická fosfatáza rozštěpí substrát  $\alpha$ -naftyl fosforečnan sodný, v zásaditém prostředí (pH = 9,2 – 9,4), na  $\alpha$ -naftol a fosforečnan sodný. Kopulací se z  $\alpha$ -naftolu a diazoniové soli (Fast Blue BB) vytváří nerozpustná barevná sraženina lokalizovaná nitrobuněčně v místě enzymatické aktivity.

Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství tohoto enzymu v buněčné cytoplazmě.

#### *Hodnocení*

- Hodnocení aktivity ALP provedeme pod mikroskopem s použitím imerzního objektivu počítáme běžně na 100 neutrofilních segmentů.
- Pozitivita se hodnotí ve zralých neutrofilních segmentech a tyčích.
- Podle intenzity nálezu v cytoplazmě se buňky řadí do pěti tříd 0 – 4:
  - 0: negativní nález – bez zbarvení
  - 1: jemná difúzní pozitivita nebo naznačená granula (ojedinělá zrna)
  - 2: difúzní pozitivita s jemnými granuly
  - 3: výrazná pozitivita s hrubšími granuly (zrna vyplňující celou buňku)
  - 4: velmi výrazná pozitivita s hrubými granuly (sraženina překrývá i buněčné jádro)
- Počet buněk v jednotlivých třídách (a – e) se vynásobí číslem třídy a jednotlivé hodnoty se sečtou a výsledek se dělí 100.

$$(0 \cdot a) + (1 \cdot b) + (2 \cdot c) + (3 \cdot d) + (4 \cdot e)$$

-----  
100



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

### Formát výsledků:

- skóre alkalické fosfatázy

### Referenční a varovná rozmezí

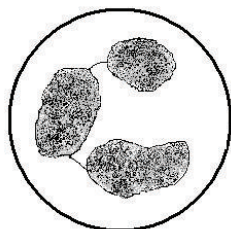
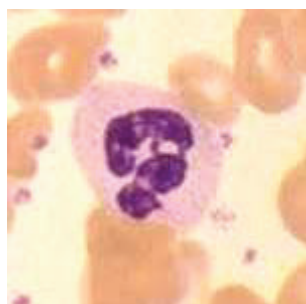
Analyt	Zkratka metody	Pohlaví	Referenční hodnoty	Jednotky výsledků
Alkalická fosfatáza v neutrofilech	ODAF	Muži	0,70 – 1,60	skóre
		Ženy	0,90 – 1,80	skóre

### Interpretace výsledků

Vyšetření slouží k upřesnění diagnózy některých hematologických a hematoonkologických onemocnění (nejčastěji k rozlišení chronické myeloidní leukémie a myelofibrózy, je jedním z rozlišujících znaků mezi chronickou a akutní myeloidní leukémií).

**Snížená aktivita ALP**- chronická myeloidní leukémie, infekční mononukleóza, paroxysmální noční hemoglobinurie, některé anémie (sférocytární a sideroblastická).

**Zvýšená aktivita ALP** - těhotenství, stres, záněty, po podání kortikoidů, polycytémia vera, aplastická anémie, MDS, myelofibróza, mnohočetný myelom, aktivní stádium M. Hodgkin.

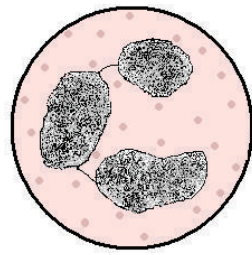
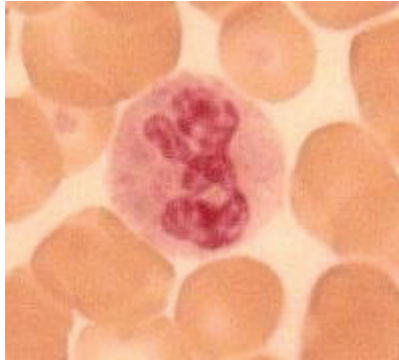


ALP 0: Negativní nález, bez zbarvení, bez granulace

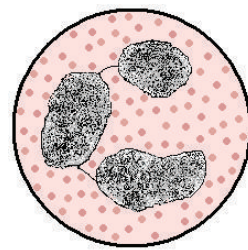
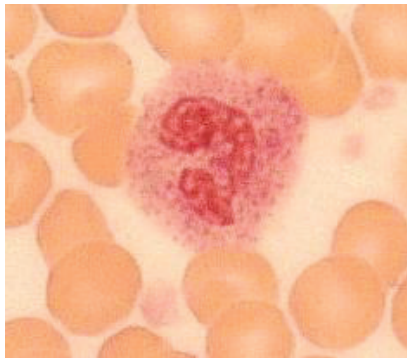


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

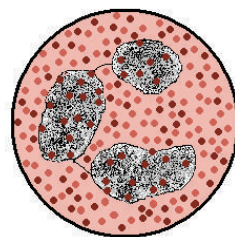
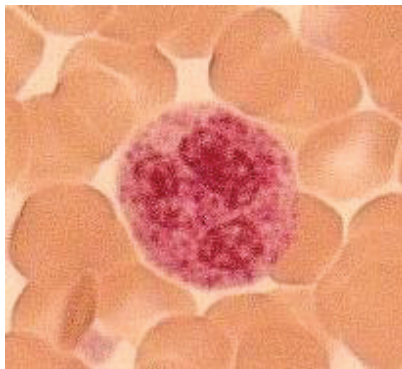
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



ALP 1: jemná difúzní pozitivita nebo naznačená granula

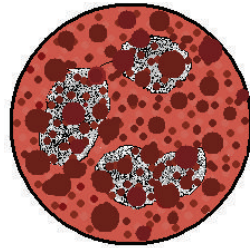
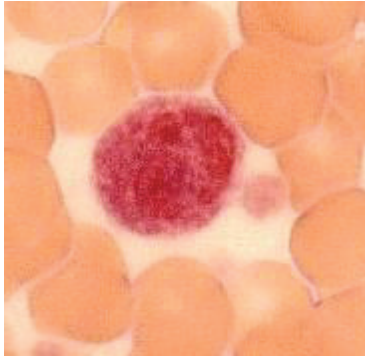


ALP 2: difúzní pozitivita s jemnými granuly



ALP 3: výrazná pozitivita s hrubšími granuly





ALP 4: velmi výrazná pozitivita s hrubými granuly

### Literatura

Marková M.: *Standardní operační postup OKH – SOPV – 062*, 2008; Pardubická krajská nemocnice

Löffler, H., Rastetter, J.: *Atlas of Clinical Hematology*, Springer, 1999; str. 68, obr. 18d.

Kaplow, L. S.: *Cytochemistry of leukocyte alkaline phosphatase. Use of complex naphthol AS phosphates in azo dye-coupling technics*. *Am. J. Clin. Path.* 39, 1963; str. 439.

Pecka M.: *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*, Finidr, s.r.o., 2006.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

## Cytochemické vyšetření železa v nátěrech kostní dřene

### **Princip**

Ferrokyanid draselný v kyselém prostředí reaguje s  $\text{Fe}^{3+}$  (zásobní železo) a vytváří tzv. berlínskou (pruskou) modř – ferrokyanid železnatoželezitý  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ . Nehemové železo je takto viditelné prostřednictvím modrých nebo zelených zrněk v cytoplazmě buněk nebo extracelulárně.

### **Teorie**

Mimo železo, které je zabudováno v molekule hemoglobinu se v buňce nachází ještě zásobní železo ve formě zrn. Jde o zásoby volného trojmocného železa (siderozómy), které se prokazuje tvorbou berlínské modři.

Železo v plazmě erytroblastů je přítomno ve formě agregátů ferritinu vytvářejících tzv. siderozómy (siderofilní zrna), nebo je za patologických stavů nakupeno v mitochondriích. Siderozómy jsou přítomny již v proerytroblastech, ale nejlépe viditelné jsou v ortochromních normoblastech v období tvorby hemoglobinu. Takovýmto ortochromním normoblastům říkáme sideroblasty. Za normálních okolností jsou siderozómy velmi jemné, sotva patrné útvary v počtu 1 – 3.

Železo v mitochondriích není v normálních erytroblastech nikdy přítomno. Zralé červené krvinky nikdy siderozómy neobsahují. Siderocyty jsou ve skutečnosti sideroretikulocyty.

Siderofágy jsou buňky fagocytujícího retikula (retikulární buňky) obsahující ferritin a hemosiderin. Představují zásobárny železa. Dále lze železo v nátěrech najít ve formě granul, nebo ve formě fragmentů cytoplazmy siderofágů. Počet siderofágů a množství železa v nich je výrazem zásob železa.

Hodnocení je semikvantitativní.

Vyšetření slouží k upřesnění diagnózy některých hematoonkologických onemocnění.

### **Odběr primárního vzorku a transport**

- Odběr kostní dřene se provádí speciální punkční jehlou o světlosti 1 – 2 mm. Při punkci se nejprve kůže očistí dezinfekčním prostředkem, potom se provede tenkou jehlou místní znecitlivění kůže a podkoží až po okostici. Po 5 – 10 min. se na znecitlivěném místě punkční jehlou s mandrénem propíchnou skrze kůži, podkoží a okostici hrudní kost. Hrot jehly se tak dostává do dřevňového prostoru, odkud se prudce nasaje malé množství (několik kapek) kostní dřene. Ta se ze stříkačky hned vystříkne na podložní sklíčko a zhotoví se kvalitní nátěry, které se ponechají volně uschnout na vzduchu.
- Matnou část podložního sklíčka s nátěrem označit.

### **Příprava k činnosti**

- Nátěr kostní dřene je označen číslem vzorku sternální punkce/trepanobiopsie, příjmením pacienta a poznámkou „Fe“.
- Příprava reakčního roztoku:
  - do 100 ml odměrného válce odměříme 99 ml destilované vody
  - napipetujeme 1 ml 25 % roztoku kyseliny chlorovodíkové



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



Univerzita  
Pardubice

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

- přisypeme 1 g ferrokyanidu draselného
- skleněnou tyčinkou mícháme až do rozpuštění
- připravujeme vždy čerstvý.
- Bezprostředně před fixací zkontrolujeme, zda je nátěr suchý.
- Přichystáme tři čisté barvicí kyvety s víčkem.

### **Pracovní postup**

- Suché, označené nátěry kostní dřevě vložíme do barvicí kyvety a fixujeme methyllalkoholem po dobu 5 minut.
- Fixované nátěry necháme volně uschnout na vzduchu.
- Do čisté kyvety nalijeme reakční roztok.
- Suché, fixované nátěry kostní dřevě vložíme do barvicí kyvety s reakčním roztokem a barvíme 5 minut při laboratorní teplotě.
- Obarvené nátěry opláchneme mírným proudem destilované vody.
- Necháme volně uschnout na vzduchu.
- Suché, obarvené nátěry dobarvíme Jádrou červení po dobu 10 – 30 minut (podle stáří barvy) při laboratorní teplotě.
- Dobarvené nátěry opláchneme mírným proudem destilované vody.
- Necháme volně oschnout na vzduchu.
- Suchý obarvený preparát přiřadíme k nátěru kostní dřevě daného pacienta.

### **Hodnocení**

Při hodnocení se sleduje počet buněk s granulemi zásobního železa, zjišťuje se velikost a počet granulí v krevních buňkách červené řady, dále tvorba prstenčitých formací, množství zásobního železa v makrofázích a přítomnost extracelulárního nehemového železa  $Fe^{3+}$ .

### **Referenční a varovná rozmezí**

Analyt	Zkratka metody	Pohlaví	Referenční hodnoty	Jednotky výsledků
Železo	FEOD	siderocyty	0 – 3	‰ (na 1000 erytrocytů)
		sideroblasty	40 – 60	‰ (na 100 erytroblastů)

### **Interpretace výsledků**

**Snížené množství zásobního železa**- sideropenická anémie, posthemorhagická anémie, zánětlivé reakce (bakteriální infekce, TBC, akutní revmatická horečka, primární progresivní polyartritida, generalizovaná karcinóza).

**Zvýšené množství zásobního železa** - sideroblastická anémie, hemolytická anémie, megaloblastová anémie, MDS, některé typy leukemie, alkoholismus, po splenektomii.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

## Literatura

Marková M.: *Standardní operační postup OKH – SOPV – 064*, 2008; Pardubická krajská nemocnice

Löffler, H., Rastetter, J.: *Atlas of Clinical Hematology*, Springer, 1999; str. 34, obr. 6 h); str. 71, obr. 19 f), g), h); str. 161, obr. 60 b), c), d); str. 162, obr. 60 h); str. 165, obr. 62 b); str. 233, obr. 99 h).

Kaplan, E. a spol.: *Sideroblasts: a study of stainable nanhemoglobin iron in marrow normoblasts*, Blood 9, 1954, str. 203.

Lexová, S. a autor kolektivů: *Hematologie pro zdravotní laboranty 1. díl*, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 2000.

Pecka, M.: *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*, Finidr, s.r.o., 2006.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky