

Miroslav Pecka

LABORATORNÍ HEMATOLOGIE V PŘEHLEDU

Fyziologie
a patofyziologie krevní buňky

2006

Recenzenti: prof. MUDr. Ladislav Chrobák, CSc.
prof. MUDr. Karel Smetana, DrSc.

OBSAH

Úvod	9
------------	---

STRUKTURA, MORFOLOGIE, FUNKCE, METABOLISMUS A FYZIOLOGIE KREVNÍCH BUNĚK

1. STRUKTURA A MORFOLOGIE KREVNÍCH BUNĚK	13
1.1. Morfologie a struktura erytrocytu	15
1.2. Morfologie a struktura krevní destičky	17
2. MORFOLOGIE KREVNÍCH BUNĚK	26
2.1. Anomálie červených krvinek	26
2.1.1. Odchylky velikosti	27
2.1.2. Odchylky tvaru	29
2.1.3. Odchylky zbarvení	34
2.1.4. Výskyt inkluzí, tělísek a prstenců	35
2.1.5. Jiné změny a formace	37
2.2. Změny morfologie bílé krvinky	39
2.3. Změny morfologie krevní destičky	49
2.4. Přítomnost parazitů v krvi	51
2.4.1. Červi	51
2.4.2. Prvoci	52
2.4.3. Bakterie	58
2.4.4. Mykotické formy	60
3. FUNKCE A FYZIOLOGIE KREVNÍCH BUNĚK	62
3.1. Fyziologie červené krvinky	62
3.1.1. Metabolismus červené krvinky	63
3.1.2. Stárnutí a fyziologický zánik červené krvinky	66
3.2. Fyziologie a funkce bílé krvinky	72
3.2.1. Cytochemický průkaz látek v krevních buňkách	74
3.2.2. Nespecifická a specifická buňkami zprostředkovaná imunita ...	86
3.3. Fyziologie a funkce krevních destiček	103

© Doc. RNDr. Miroslav Pecka, CSc., 2006

Autor: Doc. RNDr. Miroslav Pecka, CSc.

II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie

Fakultní nemocnice, Hradec Králové a Katedra interních oborů

Lékařské fakulty University Karlovy, Hradec Králové

Fotodokumentace: Irena Šulcová

Technická spolupráce: Hana Zyklová

Grafická spolupráce: Mgr. Filip Vrbacký, Mgr. Ilona Fátorová

Vydal a vytiskl: tiskárna ~~Š~~FINIDR, s. r. o., Český Těšín, 2006

Litografie: Infiniti art, s. r. o., Český Těšín

Vydání této publikace podpořili:

A. L. Instruments, s. r. o., Český Těšín,

Biogenix, s. r. o., Gambro BCT, Grifols, s. r. o., Medesa, s. r. o.

Publikace byla dále podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906.

ISBN (2. díl) 80-86682-02-1

ISBN (soubor) 80-86682-00-5

ISBN (1. díl) 80-86682-01-3

ISBN (3. díl) 80-86682-03-X

3.3.1.	Aktivace krevní destičky	106
	Změna tvaru krevní destičky	109
	Adheze krevních destiček	109
	Agregace krevních destiček	113
	Uvolňovací reakce	122
	Retrakce krevní destičky	123
3.3.2.	Metabolismus krevní destičky	130
3.3.3.	Funkce krevních destiček v organismu	131
4.	PARAMETRY KREVNÍCH BUNĚK	135
4.1.	Principy počítání krevních částic na analyzátoch	137
4.2.	Charakteristiky červené krvinky	142
4.3.	Charakteristiky bílé krvinky	145
4.4.	Charakteristiky krevní destičky	150
4.5.	Některé nové parametry krevních buněk	152
	PATOFYZIOLOGIE NEMOCÍ KREVNÍCH BUNĚK	155
1.	NEMOCI HEMATOPOETICKÉ KMENOVÉ BUŇKY	157
1.1.	Dřeňové útlumy	160
2.	NEMOCI ČERVENÉ KRVINKY	164
2.1.	Polycytemie (polyglobulie)	164
2.2.	Anémie (chudokrevnost)	167
2.2.1.	Anémie z nedostatečné tvorby erytrocytů	171
	Čisté erytroidní anémie	171
	Dyserythropoetické anémie	172
	Sideropenické anémie	174
	Anémie chronických chorob	178
	Sideroblastické (sideroachrastické) anémie	180
	Talasemie	183
	Perniciózní anémie	189
2.2.2.	Anémie z akutní a chronické ztráty krve	191
2.2.3.	Anémie ze zvýšené destrukce erytrocytů	192
	Dědičná (hereditární) sférocytóza – HS	196
	Paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH)	197
	Defekt glukózo-6-fosfát dehydrogenázy	201

	Defekt pyruvátkinázy	202
	Hemoglobinopatie S	203
	Hemoglobinopatie C	205
	Hemoglobinopatie E	205
	Autoimunitní hemolytické anémie (AIHA)	208
	Aloimunitní hemolytické anémie	212
	Hemolytické onemocnění novorozenců (HON)	214
	Hemolytické anémie neimunitní povahy	217
2.2.4.	Anémie z kombinovaných příčin	218
3.	NENÁDOROVÉ ZMĚNY V BÍLÉ KREVNÍ ŘADĚ	222
3.1.	Změny v počtech buněk bílé řady	223
3.2.	Změny v počtu a rozpočtu buněk bílé řady	224
3.3.	Reaktivní stavy v bílé řadě	229
4.	NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ KRVETVORBY	232
4.1.	Akutní leukemie (AL)	232
4.1.1.	Klasifikace akutních leukemií	236
4.1.2.	Akutní myeloblastická leukemie (AML)	239
4.1.3.	Akutní lymfoblastická leukemie (ALL)	245
4.2.	Myelodysplastický syndrom (MDS)	248
4.3.	Myeloproliferativní syndromy	256
4.3.1.	Pravá polycytemie (PV)	258
4.3.2.	Esenciální (primární) trombocytémie (ET)	260
4.3.3.	Primární myelofibroza	261
4.4.	Chronické leukemie	264
4.4.1.	Chronická myeloidní leukemie (CML)	264
4.4.2.	Chronická B-lymfocytární leukemie (B-CLL)	268
4.4.3.	Prolymfocytová leukemie	271
4.4.4.	Vlasatobuněčná leukemie	272
4.5.	Lymfoproliferativní choroby	276
4.5.1.	Hodgkinova nemoc	278
4.5.2.	Nehodgkinovské lymfomy (NHL)	282
	Mycosis fungoides a Sézaryho syndrom	286
4.5.3.	Monoklonální gamapatie	288
	Mnohočetný myelom (MM)	290
	Waldenströmová makroglobulinemie	293
	Amyloidóza	294

ÚVOD

Druhý díl Laboratorní hematologie v přehledu – fyziologie a patofyziologie krevní buňky je určen širší odborné veřejnosti se zájmem o laboratorní hematologii. Kniha je rozdělena do dvou částí. V první části se zabývá morfologií, ultrastrukturou, metabolismem, funkcí, fyziologií a patofyziologií krevních buněk. Jsou zde zmíněny některé anomálie krevních buněk, dále cytochemická vyšetření týkající se přítomnosti depozitních látek a isoenzymů v krevních buňkách a některé další souvislosti spojené s abnormitami krevních buněk. V poslední stati jsou zmíněny parametry krevních buněk a jejich fyziologické hodnoty. Další část se věnuje některým aspektům, které souvisí buď přímo nebo nepřímo se vznikem některých laboratorně zajímavých nemocí spadajících do oblasti klinické hematologie. V knize jsou úmyslně vynechány části, které souvisí s léčebnými postupy, výskytem a frekvencí onemocnění a s dále diagnostickou a diferenciálně diagnostickou rozvahou. Tyto oblasti nejsou prioritním zájmem laboratorních pracovníků a poznatky lze čerpat z řady nedávno vydaných velmi kvalitních monografií, učebnic a publikací.

Kniha vychází z mých dlouholetých zkušeností s laboratorní problematikou oboru klinické hematologie. Celý soubor je pokračováním a rozšířením problematiky již dříve publikované v „Přehledech laboratorní hematologie I-IV“. Soubor publikací Přehled laboratorní hematologie rozebírá tuto problematiku podle toho, zda se tato týká červené nebo bílé krvinky či krevní destičky. Soubor „Laboratorní hematologie v přehledu“ se zabývá v prvním dílu otázkami souvisejícími s krevní buňkou a krvetvorbou a ve třetím dílu fyziologií a patofyziologií hemostázy.

Využívám této příležitosti, abych poděkoval prof. MUDr. Jaroslavu Malému, CSc., za celoživotní spolupráci a nezištné přátelství. Současně je pro mně milou povinností poděkovat i oběma recenzentům prof. MUDr. Ladislavu Chrobákovi, CSc., a prof. MUDr. Karlu Smetanovi, DrSc., za velmi kvalifikovanou, důslednou a pečlivou recenzi této knihy. Prof. RNDr. Miloši Tichému, CSc., prof. MUDr. Ladislavu Jebavému, primáři MUDr. Otakaru Kopeckému, CSc., MUDr. Vladimíru Maisnarovi, PhD., a MUDr. Davidu Beladovi děkuji za cenné připomínky k některým kapitolám této knihy. Poděkování patří i paní Haně Zyklové za technické zpracování dokumentace a seřazení jednotlivých statí v této knize. Jsem také velmi zavázán paní Mgr. Věře Vlačihovské za perfektní zpracování literární rešerše, paní Ireně Šulcové za vypracování a převedení obrázků do elektronické podoby, Mgr. Filipu Vrbáckému a Mgr. Iloně Fátorové za mikroskopické zpracování a zhotovení digitálních fotografií a grafů k jednotlivým statím této knihy.

Představitelům firem A.L. Instruments a HK Credit, panu ing. L. Cimalovi a panu ing. J. Michálkovi a dalším firmám děkuji za podporu při vydání a případnou distribuci této knihy. Na závěr bych chtěl poděkovat i všem dalším spolupracovníkům, laborantkám a lékařům za jejich pochopení pro mou práci a své rodině za podporu, kterou mi poskytovala po celou dobu sepisování jednotlivých statí.

V Hradci Králové dne 10. října 2006

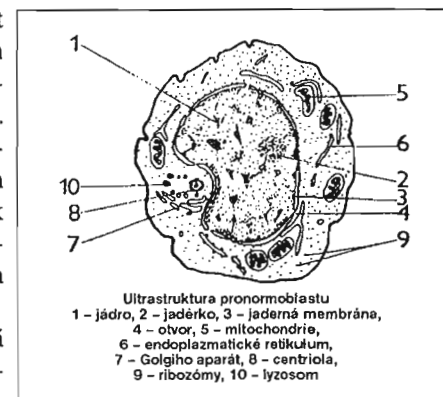
Miroslav Pecka

Struktura, morfologie,
funkce, metabolismus
a fyziologie
krevních buněk

1. STRUKTURA A MORFOLOGIE KREVNÍCH BUNĚK

Toto obecné složení buněk se vztahuje i na buňky krvetvorby a jejich zralé formy včetně erytrocytů a trombocytů, které však neobsahují jádro a některé organely a řadí se tak mezi tzv. neúplné buňky.

- **Golgiho systém** – je hlavně rozvinut v promyelocytech a secernujících plazmatických buňkách. Málo rozvinut je v buňkách červené krevní řady.
- **Endoplazmatické retikulum** – je hojné zejména v časných vývojových stádiích krvetvorných buněk a v buňkách, které tvoří granula a bílkoviny, jako jsou např. plazmocyty a plazmatické buňky.
- **Chromatinová struktura** – je jemná u nezralých a hrubá u zralých krevních buněk.
- **Jadérka** – jsou velká a aktivní v nezralých buňkách.



S dozráváním a stárnutím buněk ubývá buněčných organel a některé z nich zanikají. Když zaniknou organely proteosyntetického aparátu, které tvoří enzymy a bílkoviny nezbytné k životu a buňka nemá nebo vyčerpá svojí enzymatickou výbavu, zaniká.

- **Neutrofilní granulocyty** – zralé neutrofilní granulocyty na rozdíl od nezralých mají málo endoplazmatického retikula, malý počet mitochondrií a relativně malý Golgiho aparát. Obsahují většinou 500–1000 specifických granul, často ve tvaru rýže nebo činek. Nezralé granulocyty od stadia promyocytu mají 50–200 primárních azurofilních granul.
- **Eozinofilní granulocyty** – obsahují kolem 200 zrn s obalem tvaru vajíčka. Uvnitř zrn je enzymatická výbava eozinofilu a jeden nebo více krystalků.
- **Bazofilní granulocyty** – zrna bazofilních leukocytů mají jemné vrstevnaté uspořádání, poněkud hrubší než u tkáňových bazofilů. Vznikají patrně z Golgiho aparátu.
- **Lymfocyty** – mají jádro s jadérkem, které je viditelné u zralých forem jen po speciálním barvení. Mitochondrie jsou u nich ojedinělé. Některé lymfocyty mají několik hrubých azurofilních granul.
- **Monocyty** – mají jádro méně hutnější než ostatní krevní buňky. Cytoplazma obsahuje více mitochondrií a jemná azurofilní granula.

- ❑ **Plazmatická buňka retikulární** – má cytoplazmu tvořenou převážně ergastoplazmou s dobře vyvinutým Golgiho aparátem.
- ❑ **Tkáňový bazofil** – má cytoplazmu bohatou na zrna. Okolo zrn bývají někdy vakuoly. Ve vakuolách se rozpouštějí zrna obsahující heparin a histamin. Obsah vakuol se vyprazdňuje do okolí a cév.

Neúplné buňky

Jedná se o buněčné útvary ohraničené cytoplazmatickou membránou, které nemají jádro a chybí v nich některé organely přítomné v nezralých vývojových stádiích. Mezi neúplné buňky počítáme:

- ❑ **Erytrocyt**
- ❑ **Krevní destičku (trombocyt)**

1.1. Morfologie a ultrastruktura erytrocytu

K plnění svých funkcí je erytrocyt dokonale strukturálně vybaven. Jeho struktura je uzpůsobena tak, aby erytrocyt snesl opakované deformace z průměru kolem 7.2 μm ve velkých cévách na průměry kolem 2 μm v kapilárách a to po celou dobu jeho života v obvodové krvi (110–120 dní).



Erytrocyty a leukocyt – rastrovací el. snímek

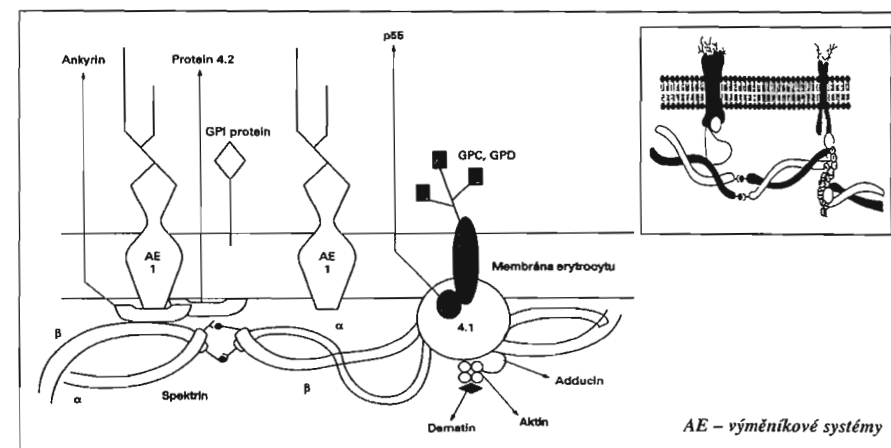
Membrána erytrocytu

Membrána červené krvinky je nejen elastická, ale i pevná. Do membrány může omezeně **pronikat** voda a některé anionty, ale membrána **zabraňuje** úniku kationtů a bílkovin (hlavně hemoglobinu). Důležité místo zaujímá i **transport sodíku a draslíku**. V membráně se uskutečňuje **výměna lipidů** mezi erytrocyty a plazmou (zejména fosfolipidů a cholesterolu), která je nezbytná pro udržení životaschopnosti erytrocytu (Warda a Zeisig, 2001).

Membrána erytrocytu má **strukturu tekuté mozaiky**. Na membránu směrem do nitra buňky navazují další proteiny, které jsou k membráně přichyceny a tvoří síťovitý skelet – tzv. **membránový skelet**. Jedná se o polymerní útvar, který má mikrotubulární a mikrofilamentózní strukturu. Toto uspořádání do značné míry ovlivňuje tvar a deformovatelnost červené krvinky (Nakao a spol., 1987).

Hlavní součástí skeletu jsou **kontraktilní bílkoviny** (spektrín, aktin, ankyrin).

MEMBRÁNA ERYTROCYTU S CYTOSKELETÁRNÍ STRUKTUROU



V membráně lze rozlišit:

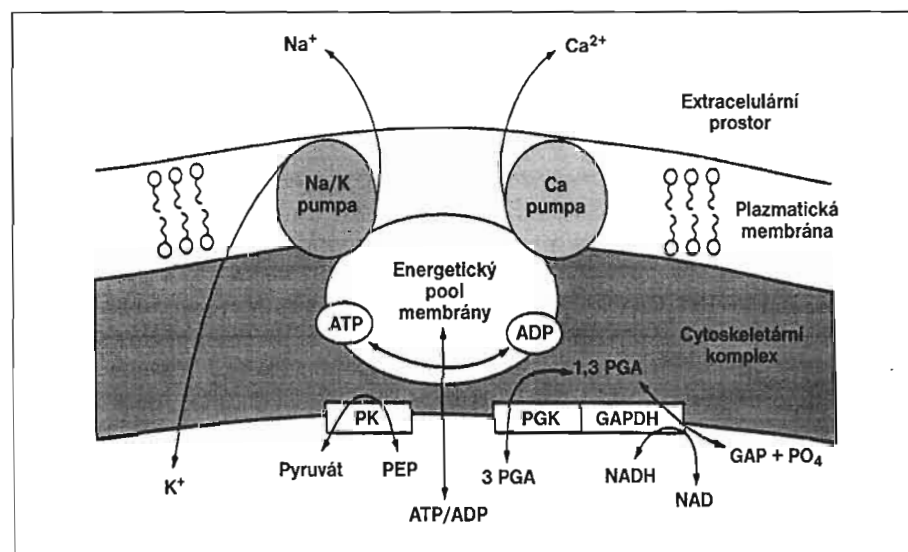
- ❑ **vnitřní stranu membrány:** jsou k ní fixovány kontraktilní bílkoviny hlavně spektrin, který napomáhá udržet tvar erytrocytu (Bennett a Baines 2001).
- ❑ **vnější stranu membrány:** jsou v ní uloženy integrační molekuly glykoproteinů a glykolipidů, které jsou nositeli antigenních vlastností červené krvinky, např. krevních skupin (Takakuwa, 2001).

Udržování stálé struktury membrány a cytoskeletu vyžaduje značný přísun energie, kterou zprostředkuje **ATP vznikající při glykolýze**. Erytrocyt tedy potřebuje ATP:

■ k udržení buněčné struktury membrány

■ **pro aktivní transport buněčnou membránou** (sodíková pumpa). V erytrocytu podobně jako v jiných buňkách se udržuje v porovnání s extracelulárním prostorem vyšší koncentrace draslíku a nižší koncentrace sodíku. Tento koncentrační rozdíl (vně a uvnitř buňky) je udržován prostřednictvím tzv. **sodíkové pumpy**, která ke své činnosti vyžaduje ATP. Sodíková pumpa je tvořena bílkovinnými složkami, které jsou uloženy v membráně erytrocytu. Proto jakákoliv změna nebo nestabilita v membráně erytrocytu, případně jiné rozložení membránových fosfolipidů, následně vede k omezení, či nedostatečné činnosti sodíkové pumpy. Omezí-li se činnost této pumpy, začne do buňky pronikat sodík, vápník a voda. Erytrocyt ztrácí bikonkávní tvar a získává tvar kulovitý (změní se na **sferocyt**). Tvarově změněný erytrocyt je pak snadno z krevního oběhu vychytáván MFS.

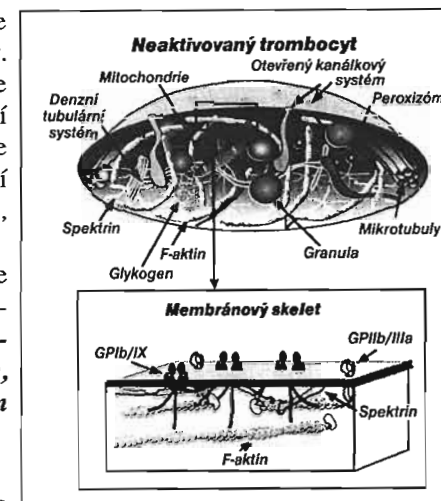
SCHÉMA A STRUKTURA SODÍKOVÉ A VÁPŇÍKOVÉ PUMPY



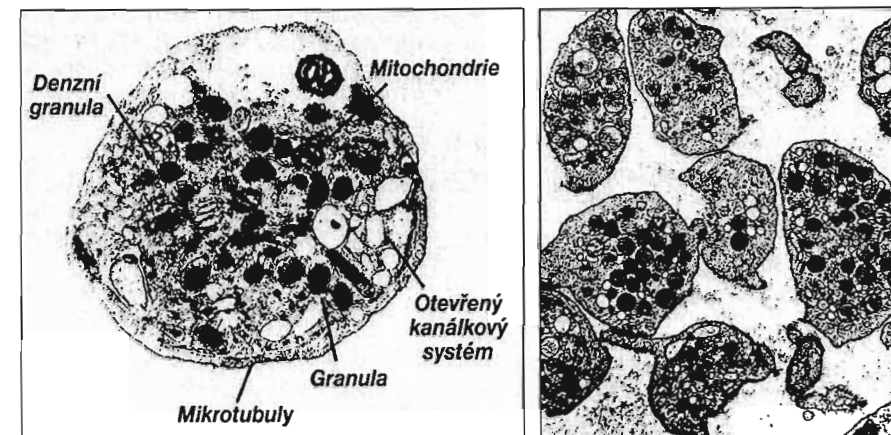
1.2. Morfologie a struktura krevní destičky

Trombocyty nemají jádro a proto je podobně jako erytrocyty řadíme mezi tzv. neúplné buňky. Membrána trombocytů je citlivá k řadě působků, které ovlivňují metabolické procesy a aktivaci děje v buňce. Tvar krevní destičky se mění podle stupně aktivace (Kroll a spol., 1996).

V elektronovém mikroskopu lze v krevní destičce rozlišit některé mikrostruktury: **granule, denzní tělíska, otevřený kanálkový systém, mitochondrie, mikrotubuly, denzní tubulární systém a další struktury** (Shattil a spol., 1987).



Ultrastruktura trombocytu



Elektronové snímky krevní destičky (příčné řezy destičkou)

STRUKTURA TROMBOCYTU

Podle anatomických znaků lze v krevní destičce vyčlenit 4 oblasti:

- ❑ **Periferní oblast** zahrnuje „plazmatický obal“, glykokalyx, membránové a submembránové struktury. V této části probíhají pochody na molekulární úrovni při interakci trombocytu s extracelulárním prostředím.
- ❑ **Oblast solubilního gelu:** viskózní matrix, tvořená z převážné části fibrilárními

proteiny. Sestává z obvodového pásu mikrotubulů, submembránových filamentů, mikrofilamentů a proteinové podjednotky v rovnováze s polymerizovanými vlákny. Tyto struktury tvoří základní jednotku destičkového kontraktálního systému.

- ❑ **Oblast organel** zahrnuje hustší tělíska (nemetabolický pool), dále méně hustá tělíska (*alfa-granule*, lysosomy, peroxisomy) a mitochondrie.
- ❑ **Membránové systémy** s otevřeným kanálkovým systémem a densním tubulárním systémem.

„Plazmatický obal“ krevní destičky

Adsorbci malého množství plazmatických bílkovin na povrch trombocytu si tyto vytváří tzv. „plazmatický obal“. Kromě albuminu jej tvoří hlavně fibrinogen, dále ostatní koagulační plazmatické činitele a Ca^{2+} . Tento obal příznivě ovlivňuje přilnavost trombocytů a sehrává důležitou úlohu při interakcích krevní destičky.

- *Plazmatický obal schází na propraných destičkách nebo na destičkách získaných gradientovou centrifugací.*

Membrána krevní destičky

Membrána krevní destičky má tloušťku 6–10 nm a podobné složení jako membrány ostatních krvinek. Vytváří však na rozdíl od ostatních buněk početné hluboké vchlípeniny do nitra destičky tzv. **otevřený kanálkový systém**.

Membrána krevní destičky zahrnuje tyto složky:

- **Bílkoviny (57 %):** kontraktilní (aktin, myozin, tropomyozin a jiné) enzymy buněčné receptory
- **Lipidy (35 %):** lipoproteiny (65–75 %) cholesterol (20–25 %) glykolipidy (2–5 %)
- **Sacharidy (8 %):** glykoproteiny glykolipidy glukosaminy mukopolysacharidy

Membrána je tvořena dvojvrstvou lipidů s asymetrickým uložením fosfolipidů (fosfolipidy s negativním nábojem – *fosfatidyletanolamin* a *fosfatidylserin* jsou u destičky v klidovém stavu uloženy ve vnitřní části membránové dvojvrstvy). Podstatnou složkou plazmatické membrány je **cholesterol**, který je nerovnoměrně rozdělen mezi membránové listy – v zevním listu je dvakrát vyšší koncentrace, než ve vnitřním. Cholesterol ovlivňuje pružnost (fluiditu) membrán, dále ovlivňuje transport přes membránu a propustnost membrán (permeabilitu). V membráně jsou vol-

ně uloženy transmembránové proteinové složky zajišťující přenos signálu a přestup látek přes membránu (Chan a spol., 1987).

- *Molekuly fosfolipidů mají schopnost difúze (podél dvojvrstvy), nebo může po aktivaci destičky dojít k přetočení dvojvrstvy destičkové membrány tzv. **flip-flop fenomén**. Při tomto kroku dochází k přetočení vnitřní a vnější části fosfolipidové membrány. Do vnější membrány se tak dostává větší množství fosfatidylserinu a fosfatidyletanolaminu.*



Model membrány krevní destičky

Receptory na povrchu krevní destičky

Zachycení signálu, případně další aktivační procesy krevní destičky jsou zprostředkovány pomocí receptorů na povrchu membrány krevní destičky. Řada biologických procesů regulovaná destičkami je zprostředkována membránovými glykoproteiny (GP). **Receptorů** glykoproteinového typu je celá řada a označují se římskými číslicemi. Tyto skupiny glykoproteinů mají další podskupiny označované malými písmeny abecedy. Je známo již více než 50 membránových glykoproteinů. Každý z glykoproteinů umožňuje po obsazení svého vazebného místa průběh určitého děje.

Mimo tyto vazebné receptory má krevní destička na své membráně řadu dalších receptorů, které slouží k navázání některých aktivačních a stimulačních látek (Evans a Graham, 1988).

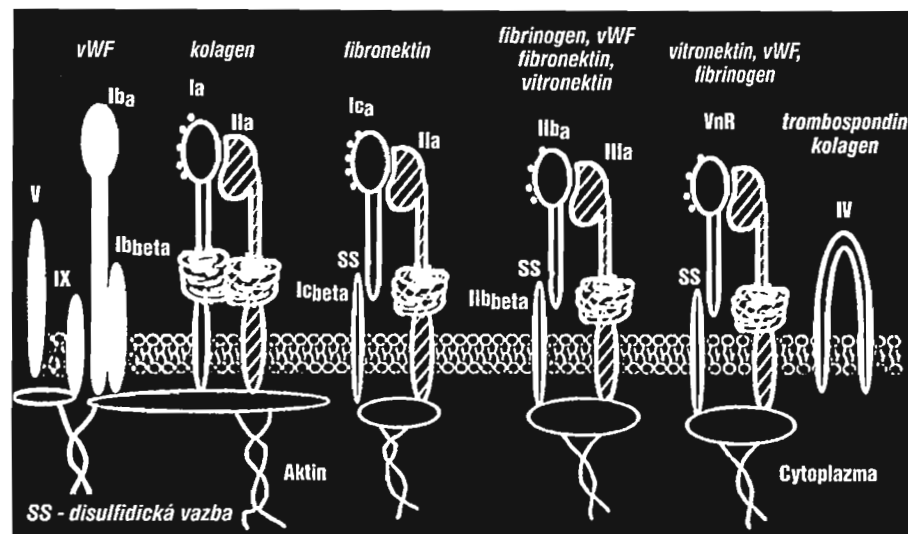
- *Krevní destička má velké množství různých receptorů pravděpodobně z těchto důvodů:*
 - *neumí a ani nemůže receptory syntetizovat (nemá příslušnou výbavu pro jejich syntézu)*
 - *krevní destička se setkává s rozmanitými typy kolagenu*

Na povrchu krevní destičky jsou zastoupeny tyto skupiny receptorů:

- **Integriny** – hlavně GP IIb/IIIa a GP Ia/IIa. Jde o nejpočetněji zastoupenou skupinu.
- **Glykoproteiny bohaté na leucin (LRG)** – komplex GP Ib/IX, který zprostředkuje adhezi krevních destiček na vWF endotelu.
- **Selektiny** – zprostředkovávají interakce krevních destiček a endotelu s leukocyty. Na krevních destičkách se jedná zejména o selektin GMP-140 (P/selektin). Je uvolňován z krevních destiček po jejich aktivaci.

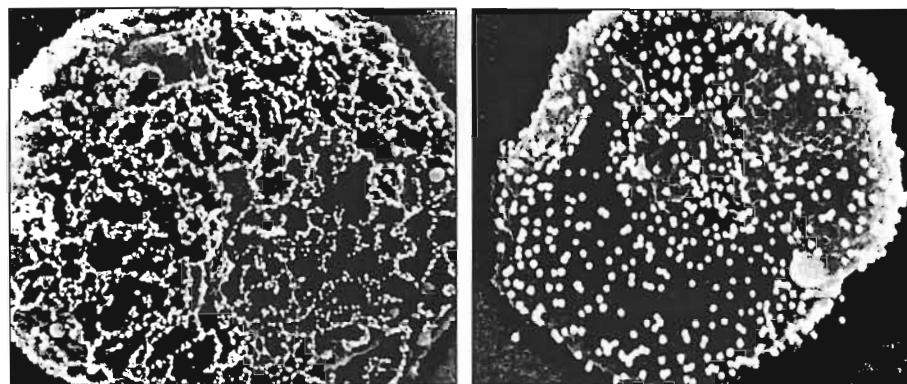
- **Imunoglobuliny** – z této skupiny je přítomen PECAM-1. Je také přítomen na monocytech.
- **Proteiny neznámé funkce, tzv. quadraspaniny.**

NĚKTERÉ RECEPTORY NA MEMBRÁNĚ KREVŇÍ DESTIČKY



- *Glykoprotein GP IV není homologní s žádnou z těchto skupin. Předpokládá se, že je destičkovým receptorem pro trombospondin, dále váže kolagen.*

RECEPTOROVÁ MÍSTA NA MEMBRÁNĚ KREVŇÍ DESTIČKY



GP1b

Rastrovací el. mikroskop

GP1b/IIIa

Antigeny na povrchu krevní destičky

Na povrchu krevní destičky nacházíme rozličné antigeny. Dělíme je na antigeny:

- **společné s jinými buňkami**
- **specifické destičkové antigeny**

Krevní destičky mají na svém povrchu navázány antigeny systému HLA I. třídy A a B, slabě C. Destičky nejsou nositeli HLA antigenu II. třídy. Z krevních systémů erytrocytů je součástí membrány erytrocytů pouze systém ABO.

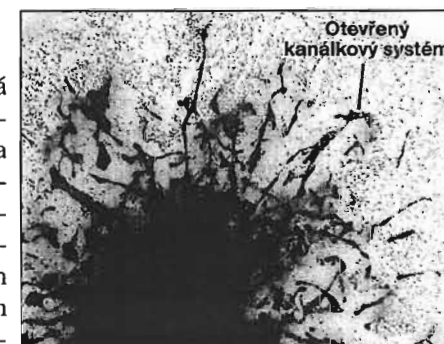
Glykokalyx

Glykokalyx tvoří nejvrchnější vrstvu destičkové membrány. Jde o 10–50 nm silný obal, který zasahuje i do výstelky otevřeného kanálkového systému. Glykokalyx tvoří převážně glykoproteiny, zčásti glykolipidy. Glykoproteiny jsou shodné s glykoproteiny jiných membrán a plní hlavně funkci receptorů.

Otevřený kanálkový systém

(Surface connecting system)

Otevřený kanálkový systém se skládá z početných zvlněných vychlípení destičkové membrány, které zasahují do nitra buňky. Systém vytváří síť kanálků o průměru 200–300 nm, která prochází cytoplazmou. Kanálky jsou propojeny navzájem a současně jsou spojeny s densním tubulárním systémem. Kanálkový systém existuje jak v neaktivních, tak i v aktivovaných destičkách.

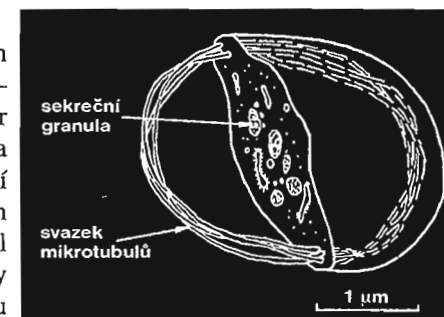


Otevřený kanálkový systém v krevní destičce

Funkce: Systém hraje důležitou úlohu ve fyziologii krevní destičky – zvětšuje povrch krevní destičky a urychluje membránový transport. Dále slouží k vyplavení obsahu granulí na povrch buňky. Mimo to vychytává tekuté látky i částice z bezprostředního okolí trombocyty.

Kontraktilní systém krevní destičky

Skládá se z početných vláknitých struktur v různém stavu polymerizace – **cytoskelet**, který udržuje diskoidní tvar destičky a podílí se při její aktivaci na změně tvaru, tvorbě pseudopodií, vnitřní kontrakci a sekreci. Cytoskelet je tvořen strukturami složenými pouze z molekul proteinů. Cytoskeletární soustava buňky sestává z fibrilárních elementů, které jsou uloženy v základní cytoplazmě mezi



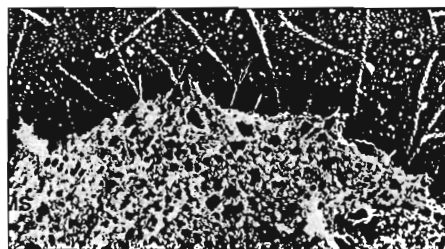
Struktura mikrotubulů

ostatními buněčnými organelami. Cytoskelet rovněž udržuje jednotlivé organely na určitém fixním místě vzhledem k membráně v rámci ultrastruktury krevní destičky. Základní funkcí cytoskeletu je transformace chemické energie v kinetickou (Carlsson a spol., 1979).

Podle morfologie a zejména podle zastoupení proteinů rozdělujeme cytoskelet na dvě základní strukturální a funkční komponenty:

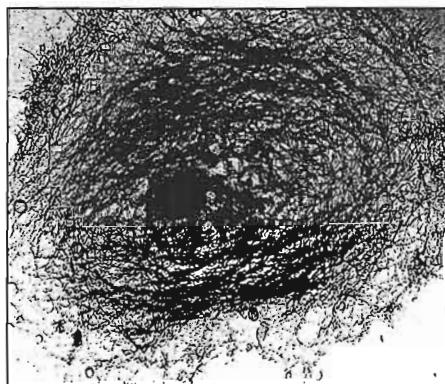
- **mikrotubuly**
- **mikrofilamenta**

K cytoskeletu přiřazujeme i membránový a jaderný skelet. Střední filamenta nejsou v destičkách přítomna. Největší část filament tvoří **aktin**. Aktin je v klidovém stavu v monomerní struktuře, po aktivaci polymeruje. Další látkou, která je součástí mikrofilament je **profilin**. Je to protein, který váže monomery aktinu a tím zabraňuje jeho polymeraci. Komplex profilin – aktin je nazýván **pro-filaktin**. Profilin je důležitý regulační protein, který mimo jiné ovlivňuje i buněčné metabolické procesy. Dalším proteinem z této skupiny je tzv. **protein vázající aktin (ABP)**, který váže aktin za tvorby gelu.



Struktura kontraktálních proteinů pod membránou trombocyty (el. snímek)

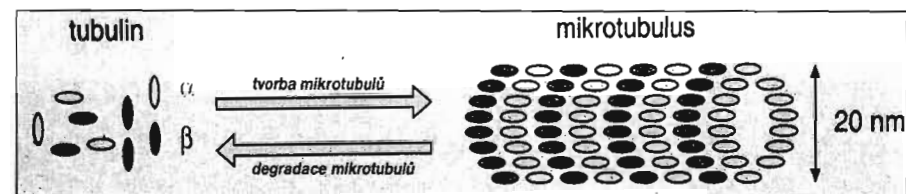
Na kontrakci mikrofilamentózní sítě se podílí **myozin**, hexamer, který se podobně jako aktin nalézá v cytoplazmě klidových destiček. K dalším proteinům mikrofilamentární struktury v krevních destičkách se řadí spektrin, gelsolin, α -aktinin, tropomyozin, talin a kaldesmon. Základní hybnou jednotkou mikrofilamentů je **aktinmyozinový komplex**. Systém mikrofilamentů je odpovědný za změnu tvaru destičky, vytváření pseudopodií a je řízen obsazením membránových receptorů (Sheetz, 1996).



Mikrofilamenta v krevní destičce (el. snímek)

Základní stavební jednotkou **mikrotubulů** je protein **tubulin**, který je polymerizovaný do tvaru trubiček. Mikrotubuly se skládají z 8–24 kruhových útvarů o průměru 25 nm. Struktura trombocyty je udržována prstencem mikrotubulů. V neaktivované destičce jsou mikrotubuly uloženy na obvodu, těsně pod plazmatickou membránou, ke které jsou fixovány aktinovými vlákny. Při stimulaci krevní destičky dochází k potlačení tvorby mikrotu-

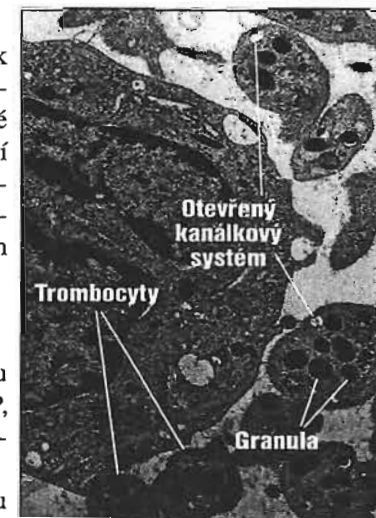
bulů a tím k narušení mikrotubulinového prstence. Mikrotubuly tedy udržují diskoidní tvar trombocyty (cytoskelet) a podílejí se na přesunech granulí a na sekreci jejich obsahu (uvolňovací reakce). Samy nemají schopnost kontrakce, tu jim zajišťují mikrofilamenta (Kenney a Linck, 1985).



Tvorba a degradace mikrotubulů

Granula krevní destičky

V cytoplazmě destiček se vyskytuje několik typů sekrečních a skladovacích sférických granulí ohraničených membránou. V neaktivované destičce jsou granule volně rozptýleny, při její aktivaci se začínají seskupovat směrem do centrální části krevní destičky. V granulích jsou uskladněny četné látky, které se uvolňují během uvolňovací reakce do prostředí.



Ultratenký řez krevní destičkou (OCS – otevřený kanálkový systém, GL a GR – granula)

Rozlišujeme:

- **denzní granula:** 6–8 granulí o průměru 80–150 nm v 1 destičce, **obsahují:** ADP, ATP, serotonin (přejímají jej z extracelulárního prostoru) a Ca^{2+}
- **α -granula:** 10–15 granulí o průměru 150–300 nm v 1 destičce, **granula obsahují:**
 - proteiny tvořené při vývoji megakaryocyty: vWF, PF4, β -TG
 - proteiny absorbované z plazmy megakaryocyty pomocí endocytozy: IgG, IgA, fibrinogen, albumin
 - složky membrány granulí, které se po vyplavení fixují na povrchu krevní destičky: GPIIb/IIIa
- **lysozomy:** jsou tvaru mikrosomálních vezikul o průměru 175–250 nm, **obsahují:** hydrolytické enzymy (β -glukuronidázu, kyselou fosfatázu), které secernují po aktivaci krevní destičky trombinem nebo kolagenem.
- **peroxizomy,** **obsahují:** glutathionperoxidázu

➤ **Trombocyty serotonin vychytávají z plazmy. Jeho zdrojem je střevní sliznice, kte-**

rá obsahuje až 90 % serotoninu celkem přítomného v organismu. Serotonin vyvolává krátkodobou vazokonstrikci. Na vnější podnět může být serotonin uvolněn rychle (během 10–120 s) nebo pomalu (během 30 minut až 4 hodin).

Mitochondrie + glykogen

Mitochondrie zaujímají asi 3 % z celkového objemu krevní destičky. Jsou energetickým zdrojem buňky. energii pro činnost buňky získávají oxidativní fosforylací. Předpokládá se, že v nich probíhá syntéza některých destičkových proteinů (destičkový činitel 4 PF4 – platelet factor 4, β -tromboglobulin a destičkový aktivační faktor PAF – platelet activating factor). V omezené míře vychytávají a skladují volný nitrobněčný vápník.

Densní tubulární systém

Densní tubulární systém je analogem hladkého endoplazmatického retikula, neobsahuje však ribozomy. Vytváří souvislou síť úzkých kanálků. Místy je spojen s otevřeným kanálovým systémem. Jsou zde uloženy některé enzymy (např. enzymy cyklu kyseliny arachidonové) nezbytné k syntéze prostaglandinů, TXA₂ a některých bílkovin. Je zásobníkem pro Ca²⁺ a podílí se na jeho přesunu uvnitř buňky a na aktivaci kontraktálního systému.

Cytoplazma krevních destiček

V cytoplazmě krevních destiček byly nalezeny i některé růstové faktory:

- **Destičkový růstový faktor (PDGF – platelet derived growth factor)** – je důležitý pro normální růst a vývoj.
- **Destičkový transformační růstový faktor β (pTGF β – platelet transforming growth factor β)** – peptid, který inhibuje buněčný růst a transformaci buněk.
- **Epidermální růstový faktor (EGF – epidermal growth factor).**

Literatura

BENNETT, V., BAINES, A. J. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol. Rev.*, 2001, roč. 81, s. 1353–1392.

CARLSSON, L., MARKEY, F., BLIKSTAD, I., et al. Reorganization of actin in platelets stimulated by thrombin as measured by the DNase I inhibition assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, roč. 76, s. 6376–6380.

CHAP, H., PERRET, B., PLANTAVID, M., et al. Topography of platelet membrane phospholipids. In MacIntyre, D. E., Gordon, J. I. (Eds). *Platelets in biology and pathology III*. Amsterdam: Elsevier Science, 1987, s. 191–204.

EVANS, W. H., GRAHAM, J. M. Membrane structure and function. Oxford, England: Oxford IRL Press, Oxford University Press, 1988.

KENNEY, D. M., LINCK, R. W. The cytoskeleton of unstimulated blood platelets: structure and composition of the isolated marginal microtubular band. *J. Cell. Sci.*, 1985, roč. 78, s. 1–22.

KROLL, M. H., HELLUMS, J. D., McINTIRE, L. V., et al. Platelets and shear stress. *Blood*, 1996, roč. 88, s. 1525–1541.

NAKAO, M., JINBU, Y., SATO, S., et al. Structure and function of red cell cytoskeleton. *Biomed. Biophys. Acta*, 1987, roč. 46, s. 5–9.

SHATTIL, S. J., HOXIE, J. A., CUNNINGHAM, M., et al. Changes in platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. *J. Biol. Chem.*, 1985, roč. 260, s. 1107–1114.

SHEETZ, M. P. Microtubule motor complexes moving membranous organelles. *Cell Struct. Funct.*, 1996, roč. 21, s. 369–373.

TAKAKUWA, Y. Regulation of red cell membrane protein interactions. *Curr. Opin. Hematol.*, 2001, roč. 8, s. 80–84.

WARDA, M., ZEISIG, R. Phospholipid- and fatty acid-composition in the erythrocyte membrane of the one-humped camel and its influence on vesicle properties prepared from these lipids. *DTW Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 2001, roč. 107, s. 349–388.

2. MORFOLOGIE KREVNÍCH BUNĚK

Změny morfologie krevních buněk posuzujeme ze dvou hledisek. Hodnotíme buď jednotlivé buňky (tvar, struktura, barvitelnost) nebo přihlížíme k jejich poměrnému zastoupení v celkovém počtu všech hodnocených buněk – hodnotíme tzv. stav buněčného typu v systému. O stavu mluvíme většinou tehdy, pokud daný morfologický typ přesáhne hodnotu 0,1 (dříve 10 % – např. o mikrocytoze mluvíme tehdy, přesáhne-li počet mikrocytů ze všech hodnocených erytrocytů 10 %):

- **Hodnocení morfologie jednotlivých buněk** – např. mikrocyt, poikilocyt, echinocyt aj.
- **Hodnocení poměrného zastoupení (stav)** – např. mikrocytoza, poikilocytoza, anizocytoza aj.

V obvodové krvi se mohou nacházet anomálie:

- ☐ Červené krvinky (včetně výskytu plasmodií)
- ☐ Bílé krvinky
- ☐ Krevní destičky

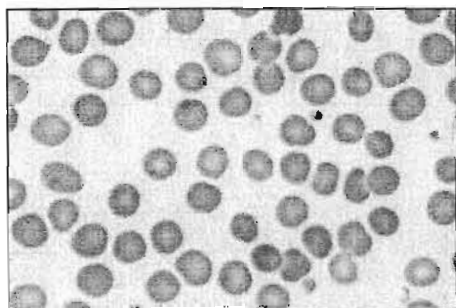
2.1. Anomálie červenýchrvinek

Normocyty

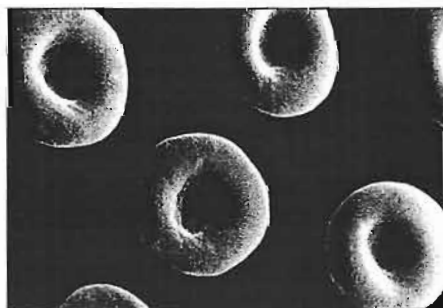
Normocyty jsou **normální červené krvinky** jak co do velikosti, tak i tvaru a barvitelnosti. Normocyt má z čelního pohledu tvar kulatého terčíku. Bikonkávní tvar normální červené krvinky vytváří při čelním pohledu obraz středového prosvětlení uvnitř buňky s bohatším prstencem obarveného hemoglobinu směrem k erytrocytární membráně.

Patologické změny červené krvinky

Patologické změny červenýchrvinek se projevují změnou jejich tvaru, velikosti a barvitelnosti, popř. i změnou funkce v porovnání s normocytem.



Normocyt – periferní krev



Normocyt – rastrovací el. mikroskop

MORFOLOGICKÉ ANOMÁLIE ČERVENÉ KRVINKY

Tvar	Zabarvení	Inkluze	Membrána
echinocyty	hypochromázie	Howellova-Jollyho tělíska	aglutinace
eliptocyty	polychromázie	paraziti	hemoglobin C
poikilocyty	sférocyty	bazofilní tečkování	stomatocyty
schistocyty			leptocyty
drepanocyty			
dakrocyty			
		Velikost	
		anizocytoza	
		makrocyty	
		mikrocyty	

V krevních nátěrech můžeme hodnotit tyto změny červenýchrvinek:

- ☐ **odchylky velikosti:** mikrocyty, makrocyty
- ☐ **odchylky tvaru:**
 - **kulatý terčík:** planocyty, anulocyty, leptocyty, sférocyty, achromocyty
 - **jiný tvar terčíku:** ovalocyty, drepanocyty, poikilocyty, schistocyty, akantocyty, stomatocyty, echinocyty,
- ☐ **odchylky zbarvení:** hypochromie, anizochromie, polychromazie
- ☐ **výskyt zrn, tělísek, prstenců:** bazofilní tečkování, Heinzova tělíska, Howellova-Jollyho tělíska, Cobotovy-Schleipovy prstence
- ☐ **jiné změny a formace:** karyorexe, penízkovatění, plasmodia

2.1.1. Odchylky velikosti

Mikrocyty

(řecky: mikros = malý, kytos = buňka)

Jde o krvinky s bikonkávním tvarem podobně jako normocyty, ale s **průměrem menším než 6,7 μm a MCV menším než 80 fl.** Jsou tenčí než normocyty a v panopticky obarveném nátěru mají světlejší zbarvení než normocyty (je to dané menší tloušťkou erytrocytu).

Výskyt: u anémií z nedostatku železa (sideropenické anémie), u anémií z neschopnosti včlenit železo do hemu (sideroblastické anémie, anémie chronických onemocnění) a u vrozených poruch tvorby hemoglobinu (talasemie, hemoglobinopatie).

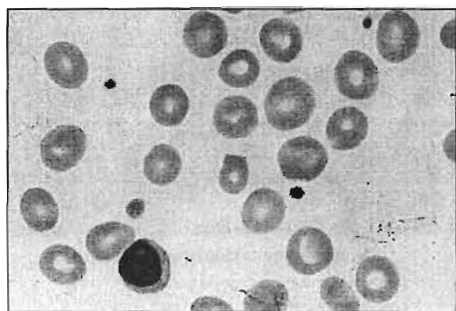
Makrocyty

(řecky: makros = velký, kytos = buňka)

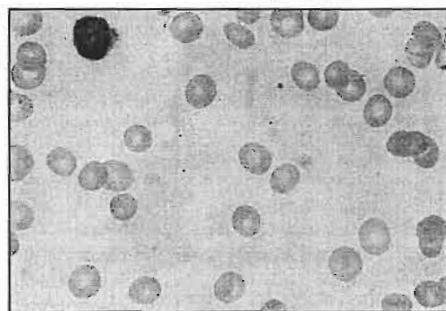
Jde o **krvinky rovněž s bikonkávním tvarem srovnatelným s normocytem, ale s průměrem větším než 7,7 μm a MCV větším než 97 fl.**

Výskyt: nachází se např. u stavů s nedostatkem vitamínu B₁₂ a kyseliny listové, u nemocných s primární poruchou metabolismu nukleových kyselin (MDS, aplastická anémie).

➤ V případě, že erytrocyt je menší nebo větší než normocyt, používáme také názvu mikrocyt a makrocyt, ale spíše by se v tomto případě mělo mluvit o malých nebo velkých erythrocytech, protože názvy mikrocyt a makrocyt jsou přesně definované buněčné charakteristiky. Pokud popisujeme v nátěru mikrocytozu nebo makrocytozu jako stavy, pak o nich platí totéž, co o anizocytoze (viz dále).



Makrocyty – periferní krev

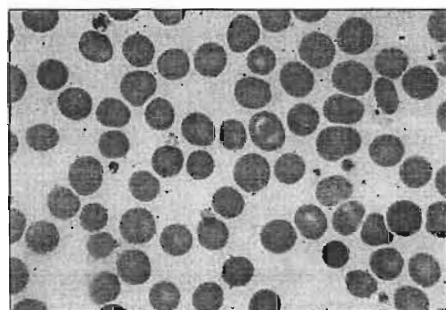


Mikrocyty – periferní krev

Anizocytoza

(řecky: *an-isos* = nestejný, *kytos* = buňka)

V krevním nátěru i za fyziologických podmínek můžeme nalézt určité procento erytrocytů, které jsou menší nebo větší než normocyty. Pokud jsou v nátěru přítomny nestejně velké erythrocyty, mluvíme o **anizocytoze** erythrocytů. Popisujeme-li však krevní nátěr, tak za anizocytozu považujeme až stav, kdy v popisované nátěru je přítomno z celkového počtu hodnocených erythrocytů **více než 10 % erythrocytů o nestejně velikosti**.



Anizocytoza – periferní krev

Anizocytoza je tedy stav u kterého je zvýšené zastoupení mikrocytů nebo makrocytů. Mohou nastat tyto případy:

- současný výskyt mikrocytů a normocyty
- současný výskyt makrocytů a normocyty
- současný výskyt mikrocytů a makrocytů
- současný výskyt mikrocytů, normocyty a makrocytů

2.1.2. Odchylky tvaru

KULATÝ TVAR TERČÍKU

Planocyty

(*planus* = plochý, *kytos* = buňka)

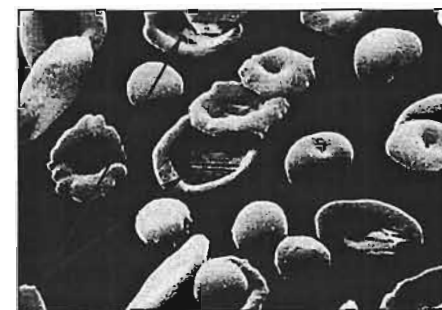
Nachází-li se **zvlášť tenké erythrocyty** popisujeme je jako planocyty. Mají menší MCV než normocyt, ale MCD mají stejné jako normocyt.

Anulocyty

(*anulus* = prstenec, *kytos* = buňka)

U anulocytů jde o **erythrocyty velmi chudé na hemoglobin, který bývá uložen na obvodě krvinky v podobě prstence**. Střed krvinky se zdá jakoby vyplaven. Mají výrazně menší MCV než normocyt, ale MCD mají stejné jako normocyt.

Výskyt: u těžkých sideropenických anémií.



Planocyty – rastrovací el. snímek

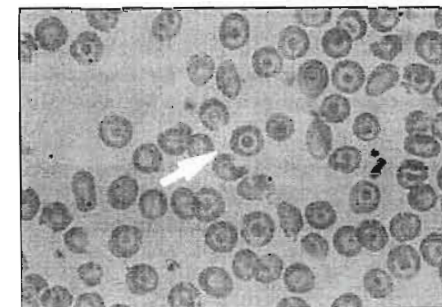


Anulocyty – rastrovací el. snímek

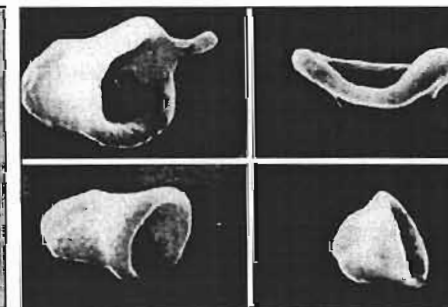
Leptocyty

(řecky: *leptos* = úzký, *kytos* = buňka)

(Terčovité erythrocyty – Target cells)



Leptocyty – periferní krev



Leptocyty – rastrovací el. snímek

Leptocyty jsou *tenké erytrocyty, chudé na hemoglobin, který je uložen na obvodě a v centru krvinky* – v místě, kde se velká membrána nedostatečně vyplňuje erytrocytu mírně vyklenuje (připomínají mexický klobouk).

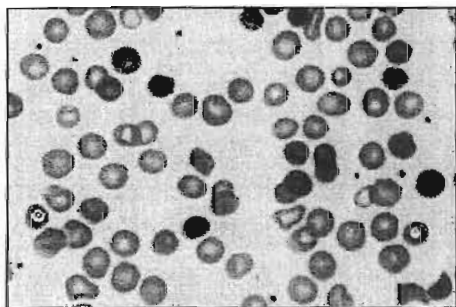
Výskyt: při anémiích, z nedostatku železa. Jsou však typickým nálezem u hemolytické anémie z poruchy hemoglobinu (talasemie, hemoglobinopatie C) a u chronických poruch jaterní buňky (Crook, 1998).

Sférocyty

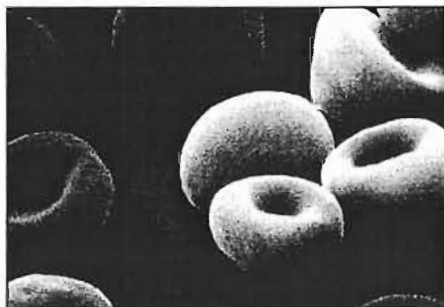
(řecky: *sphaira* = koule, *kytos* = buňka)

Sférocyty jsou *erytrocyty kulovitého nebo bochníkovitého tvaru*. Jejich tloušťka je kolem 3 μm a průměr je menší než 6,7 μm . Pro svou tloušťku se barví nápadně sytě až hnědočerveně. Tvorba sférocytů je známkou snížené životaschopnosti erytrocytů v důsledku malých zásob ATP. Sférocyty se zachycují v kapilárách sleziny a jsou tam pohlceny makrofágy. Vyskytují-li se ve více než 10 %, popisujeme tento stav jako *sférocytozu*.

Výskyt: u vrozené sférocytozy, známky stárnutí erytrocytů.



Sférocyty – periferní krev



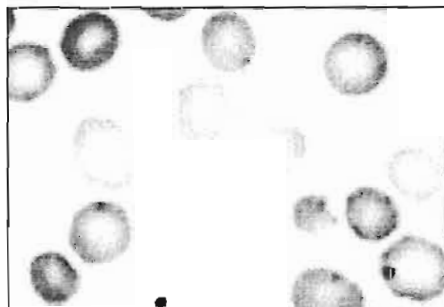
Sférocyty – elektron. snímek

Achromocyty

(řecky: *chroma* = barva, *kytos* = buňka)

Achromocyty jsou velmi světlé růžové erytrocyty. Jde vlastně jen o *obarvené membrány erytrocytů, ze kterých se hemoglobin vyplavil*. Někdy je možné v těchto krvinkách nalézt i retikulo-filamentózní substanci pak se označují jako *achromoretikulocyty*.

Výskyt: u těžkých anémií.



Achromocyty – periferní krev

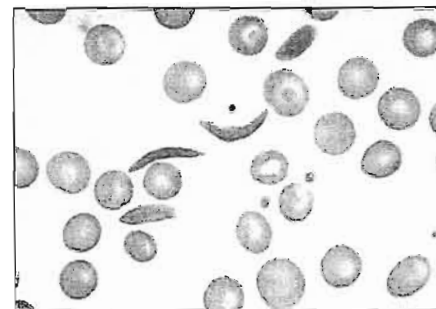
JINÝ TVAR TERČÍKU

Drepanocyty

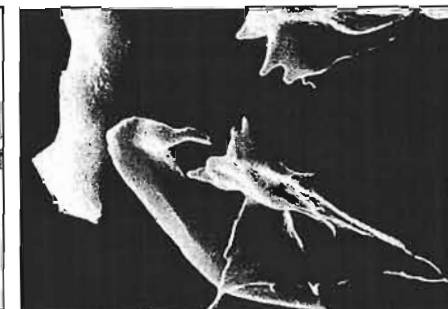
(řecky: *drepanom* = srp, *kytos* = buňka)

(srpkovité erytrocyty)

Erytrocyty, které mají *úzký měsíčekovitý až srpkovitý tvar* zvýrazněný zejména při nedostatku kyslíku, se nazývají drepanocyty.



Drepanocyty – periferní krev

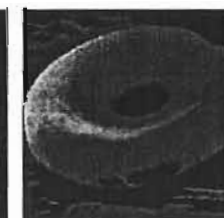


Drepanocyty – rastrovací el. snímek

Mají spirálovitě změněnou molekulu HbS (mutace v 6. sekvenci β -globinového řetězce). Tato molekula se zejména při nedostatku kyslíku uspořádá spirálovitě a tím se mění tvar erytrocytu. Tyto erytrocyty jsou odolnější k hypotonickým roztokům NaCl (zvýšená osmotická rezistence).



Drepanocyt



Normocyt

Poikilocyty

(řecky: *poikilos* = různý, *kytos* = buňka)

Poikilocyty jsou *erytrocyty různého, někdy až bizarního tvaru*. Nejčastěji mají tvar visící vodní kapky nebo hrušky. Vyskytují-li se tyto útvary ve více než 10 %, mluvíme o *poikilocytoze* (Marsh 1966).

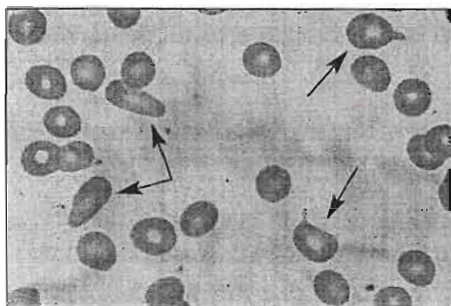
Výskyt: u těžkých anémií

Ovalocyty, Eliptocyty

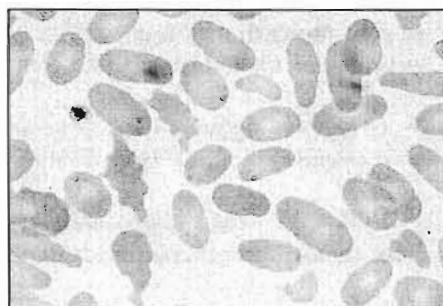
(*ovalis* = oválný, *ellipticus* = vejčitý, *kytos* = buňka)

Ovalocyty jsou *erytrocyty oválného tvaru*. Jsou-li přítomny ve více než 10 %, v populaci normocytů mluvíme o *ovalocytoze* (Rodgers a spol., 1999).

Výskyt: dědičná ovalocytoza (v krvi 25–90 % ovalocytů).



Poikilocyty – periferní krev



Eliptocyty – periferní krev

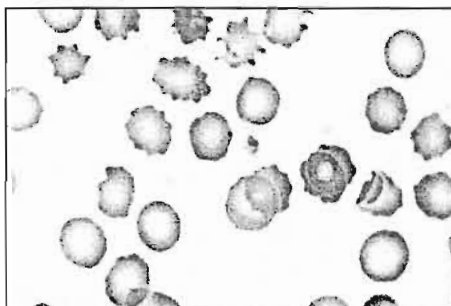
Echinocyty

(řecky: *echinos* = ježek, *kytos* = buňka)

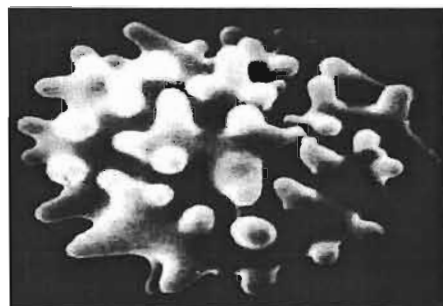
Echinocyty byly poprvé popsány Ponderem v roce 1948 (Ponder, 1948). Jedná se o erytrocyty připomínající zdánlivě **konfiguraci povrchu ježka**.

Výskyt: mohou se vyskytnout u nemocných po bypassu, někdy i po transfuzi.

In vitro – jako artefakt starší krve.



Echinocyty – periferní krev



Echinocyty – rastrovací el. snímek

Akantocyty (foto viz. vedlejší strana)

(řecky: *akantha* = bodlák, trn, *kytos* = buňka)

Akantocyty jsou **erytrocyty s ostnatými výběžky**. Vznikají při nedostatku β -lipoproteinů v membráně erytrocytů (Salt a spol., 1960). Vyskytují-li se ve více než 10 %, popisujeme tento stav jako **akantocytozu**.

Výskyt: při α -beta lipoproteinemii a při alkoholickém poškození jater.

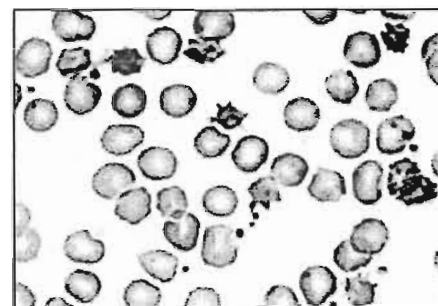
In vitro – jako artefakt v hypotonických roztocích.

Stomatocyty (foto viz. vedlejší strana)

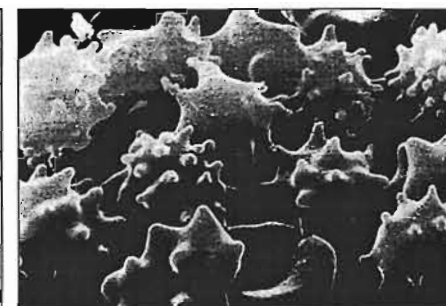
(řecky: *stoma-stomatos* = ústa, *kytos* = buňka)

Stomatocyty jsou **erytrocyty tvaru pootevřených úst**. Vyskytují-li se ve více než 10 %, popisujeme tento stav jako **stomatocytozu**.

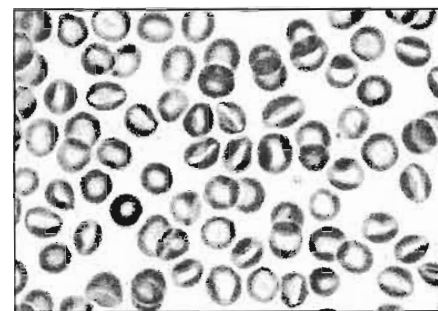
Výskyt: vrozená stomatocytoza (Lock 1961), alkoholická cirhóza jater.



Akantocyty – periferní krev



Akantocyty – rastrovací el. snímek



Stomatocyty – periferní krev

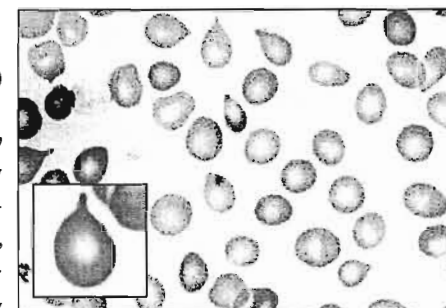


Stomatocyty – rastrovací el. snímek

Slizovité (kapkovité) erytrocyty

(řecky: *dakryon* = slza, *kytos* = buňka)
(Dacrocyty, Tear drops)

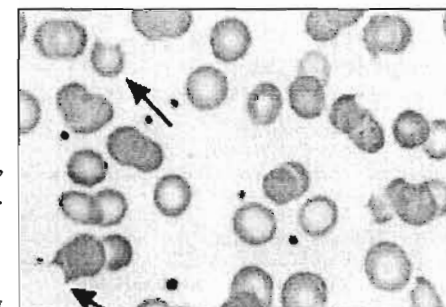
Dakrocyty jsou **erytrocyty tvaru slzy nebo kapky**. Nachází se u myelofibrózy a u ostatních myeloproliferativních nemocí, dále u perniciózní anémie, u talasemie, myeloidní metaplasie a u některých hemolytických anémií. **Dakrocyty – periferní krev**



Keratocyty

(řecky: *keras* = roh, *kytos* = buňka)

Keratocyty jsou rohovité erytrocyty, které mohou mít jeden nebo dva výběžky.



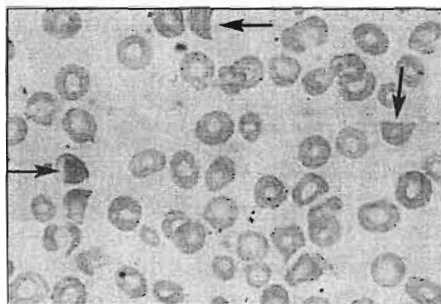
Keratocyty – periferní krev

Schistocyty (schizocyty)

(řecky: *schistos* = rozštěpený, *schizo* = štípám, *kytos* = buňka)

Schistocyty jsou *útržky erytrocytů, často tvaru helmice či prasklé vaječné skořápky*, vznikající přetržením erytrocytu na fibrinových vláknech (Marsh 1966).

Výskyt: mikroangiopatická hemolytická anémie (MAHA – *microangiopathic hemolytic anemia*), a trombocytopenická purpura.



Schizocyty

2.1.3. Odchylky zbarvení

Při správném panoptickém barvení mají všechny erytrocyty podobné zbarvení do růžova, při přebarvení do hněda. U chorobných stavů se erytrocyty mohou zbarvit různě.

Hypochromie

(řecky: *hypo* = pod, *chroma* = barva)

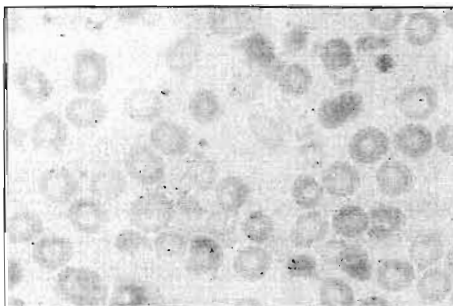
Hypochromie ukazuje na *snížený obsah hemoglobinu v erytrocytu*. Erytrocyty se barví méně intenzivně, centrální projasnění je větší než u normocyty.

Výskyt: u sideropenických anémií

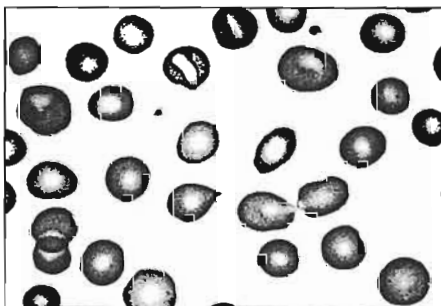
Polychromazie

(řecky: *polys* = mnohý, *chroma* = barva)

Při polychromazii se nachází erytrocyty s modravým nebo šedofialovým nádechem. Toto zbarvení je vyvoláno *přítomností ještě částečně bazofilní cytoplazmy se zbytkovým množstvím RNA*. Jde o mladé erytrocyty, větší než normocyty. Polychro-



Hypochromie – periferní krev



Polychromazie – periferní krev

mazie svědčí o nevyzrálém charakteru cytoplazmy ve vývoji červené řady. Při pravé polychromazii mají tento nádech jen některé erytrocyty – rozdíl od nepravé polychromazie. Často to jsou retikulyocyty.

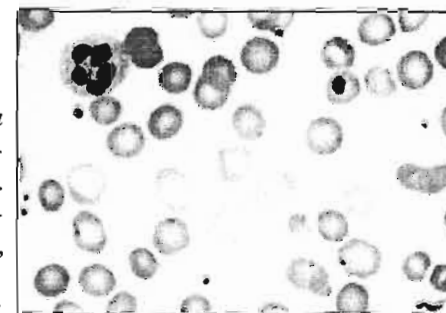
➤ U nepravé polychromazie jsou do modra zbarveny všechny erytrocyty – jde o artefakt při použití nesprávné techniky barvení nebo o nekvalitní barviva.

Výskyt: zvýšené vyplavování mladších erytrocytů při zvýšené produkci kostní dřeně (u novorozenců, při polycytemii a u metastáz nádorů do kostní dřeně).

Anizochromie

(řecky: *an-isos* = nestejný, *chroma* = barva)

Nestejný obsah hemoglobinu v erytrocytech, vede k jejich odlišné barvitelnosti – anizochromii. U anizochromie se nachází jak erytrocyty, které se barví normálně, tak erytrocyty,



Anizochromie – periferní krev

které se barví slabě.

2.1.4. Výskyt inkluzí, tělísek a prstenců

Bazofilní tečkování erytrocytů

V erytrocytech se nachází jemná, málokdy hrubší zrnka, sytě tmavomodrá. Tato zrna jsou *zbytkem bazofilní cytoplazmy erytroblastů. Jde o agregáty RNA, respektive ribozomů, které neprochází fyziologickým metabolismem*.

Výskyt: u anémií vyvolaných intoxikací kovy a případně i jinými faktory, včetně některých cytostatik a těžkých infekcí.

Fyziologické hodnoty: méně než 0,0003 (300 bazofilně tečkovaných erytrocytů/1 milion erytrocytů)

➤ K dokonalému obarvení se používá speciálního barvení Mansonovým roztokem.

Heinzova tělíska

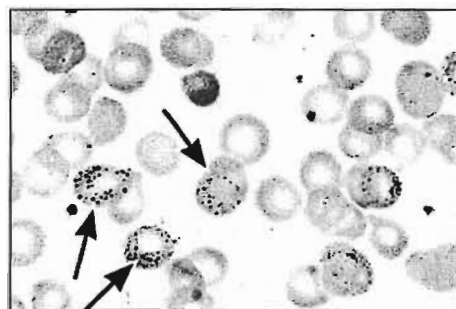
Heinzova tělíska jsou vlastně *denaturovaným hemoglobinem*. Jsou *známkou oxidace a denaturace globinového řetězce vlivem změny metabolismu erytrocytů*, při které glykolytické enzymy nejsou schopné produkovat dostatek redukčních látek (NADPH a glutathionu). *Vznikají precipitací oxidovaného hemoglobinu a bílkovin stromatu na membráně erytrocytu*. Na obvodě červené krvinky tvoří o-

válné, modře se barvící útvary (Jacob, 1970). K jejich průkazu je třeba použít speciálních barvicích technik tzv. vitální barviva např. *nilská modř*, *krystalová violet* (Schwab a Lewis, 1969).

- U starších erytrocytů klesá postupně aktivita jednotlivých glykolytických enzymů a zvyšuje se pravděpodobnost tvorby Heinzových tělísek.

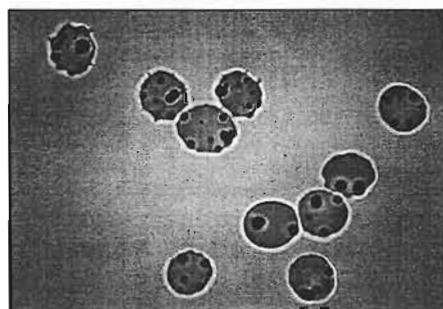
Výskyt: nachází se hlavně v přítomnosti nestabilních hemoglobinů, při nedostatku některých glykolytických enzymů G-6-PDH a po užívání oxidačních látek (sulfonamidy, antimalarika, streptomycin aj.). Počet Heinzových tělísek se zvyšuje po operacích sleziny (snižuje se schopnost organismu vychytávat změněné erytrocyty).

- Na specifická vazebná místa erytrocytové membrány se vážou jak molekuly Hb, tak produkty jeho oxidačního odbourávání, označované jako hemichrómy. Hemichrómy labilizují membránu erytrocytu a jejím rozpadem vyvolávají vznik



Bazofilní tečkování – periferní krev

hemolytické reakce (Jacob 1970).

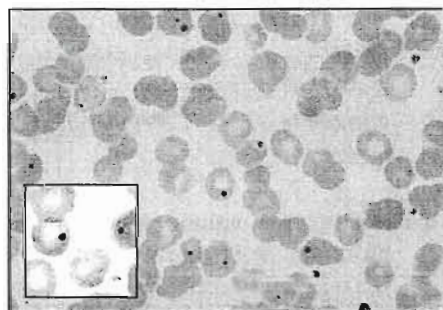


Heinzova tělíka – periferní krev

Howellova-Jollyho tělíka

Vznikají pravděpodobně ze zbytků jaderných chromozomů. Jsou to 1–3 červenofialová až zářivě červeně zbarvená tělíka, 0,5–1 µm velká. Jsou-li zbytky jádra nepatrné, označují se jako *chromatinový prach* nebo *azurofilní tečkování*.

Výskyt: po splenektomii a u perniciózní anémie.

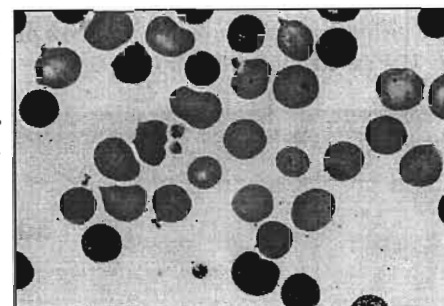


Howellova-Jollyho tělíka – periferní krev

Pappenheimerova tělíka

Jsou *granula obsahující železo*, která jsou viditelná v běžném panoptickém barvení tehdy, je-li železo agregováno

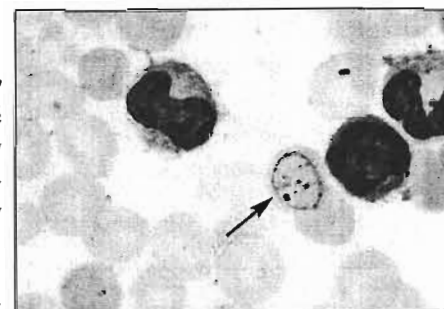
s mitochondriemi a ribozómy. Často vytváří drobné chomáčky, které jsou vyvolány barvením proteinů vázajících železo. Nachází se u těžkých forem anémií, u talasemie a po splenektomii (Pappenheimer a spol., 1945).



Pappenheimerova tělíka – periferní krev

Cabotovy-Schleipovy prstence

Jsou zbytkem jaderné membrány erytroblastů. Nachází se fialově červené až tmavě červené tenké kroužky, klíčky nebo smyčky. Krvinky ve kterých se nacházejí tyto útvary vykazují i jiné známky nezralosti (bazofilie).



Cabotův-Schleipův prstenec

2.1.5. Jiné změny a formace

Karyorexe

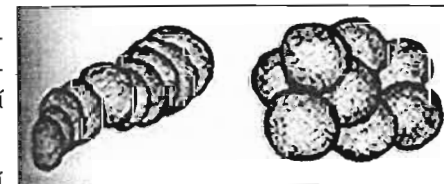
(řecky: *karyon* = jádro, *rhexis* = roztržení)

Porucha ve vypuzování jádra, které se rozpadne na izolované větší hrudky (expulse jádra).

- Za normálních okolností je jádro normoblastu z buňky aktivně vypuzeno. Buňka se několikrát svaští, jádro se ztenčí, nabude přechodně tvaru uprostřed zaškrnceného, kdy jedna jeho část již opustila buňku a posléze je celé vytlačeno z buňky. Za patologických stavů se však jádro z buňky nevypudí, rozdrobí se nebo se scvrkne.

Penízkovatění erytrocytů

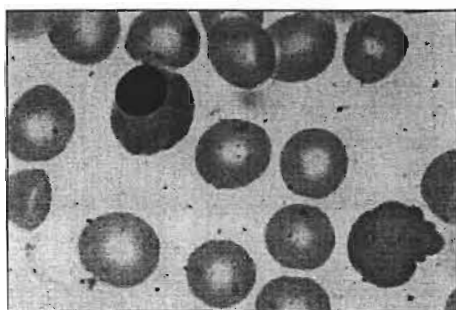
Erytrocyty i v tenkých místech preparátu se *kladou vzájemně na sebe* podobně jako sloupce mincí. Penízkovatění



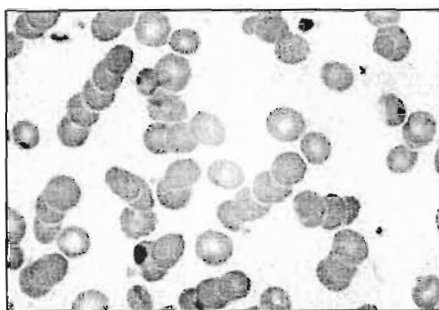
Rozdíl mezi penízkovatěním a aglutinací

erytrocytů je příznakem změn reologických poměrů červených krvinek v přítomnosti paraproteinů v krevní plazmě a při hyperfibrinogenemii.

Výskyt: monoklonální gamapatie



Karyorexe – periferní krev



Penízkovatení erytrocytů – periferní krev

Plazmodia v erytrocytech

Viz kapitola krevní paraziti.

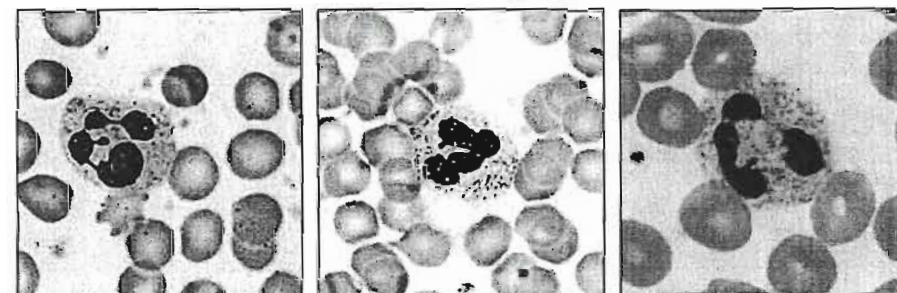
2.2. Změny morfologie bílé krvinky

Změny morfologie bílé krvinky se týkají změn v utváření jádra, zrnění a inkluzí v cytoplazmě.

FYZIOLOGICKÉ

Sexchromatin

V některých granulocytech, zejména segmentovaných, méně eozinofilních a bazofilních se mohou nacházet *zbytky jaderného chromatinu, který zůstává nitkovitým výběžkem spojen s jádrem*. Vytváří tak přívěsky tvaru *bubnové paličky*. Kromě toho mohou být na jádře výčnělky tvaru *kapky, pupence, hrubších vláken, tyček nebo háčků*, kterých bývá na jednom jádře i více. Jaderné výběžky představují *pohlavní chromatin (sexchromatin)*, který se barví na rozdíl od ostatní hmoty jádra výrazně sytě. U žen se nachází zejména výběžky tvaru bubnové paličky, ostatní druhy jsou přítomny u mužů i u žen. Přívěsky tvoří neaktivní chromozom X (druhý chromozom je u žen aktivní).

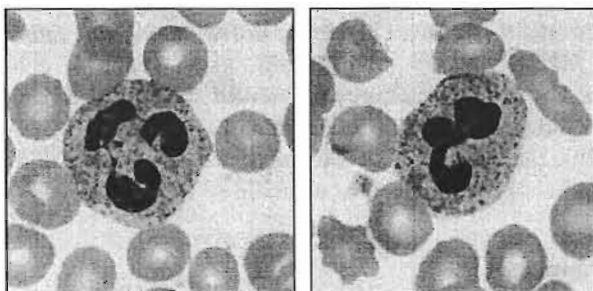


Sexchromatin – tvary bubnové paličky

- Jestliže při vyhodnocování nátěru nalezneme u 500 granulocytů více než 6 výběžků tvaru bubnové paličky jedná se s velkou pravděpodobností o krevní nátěr pocházející od ženy. Jde však jen o orientační metodu, která se využívala dříve v soudním lékařství. Průměrně připadá asi 30 různých výběžků na 500 granulocytů.

Filamentozní a nefilamentozní granulocyty

Struktura segmentovaných částí zralých granulocytů je velmi rozmanitá a vykazuje řadu odlišností. Zajímavým se ukazuje sledování tzv. *filamentozních granulocytů*, tj. granulocytů, u kterých jsou části jádra spojeny jemným vláknem – filamentem. Druhá hodnocená skupina pak představuje granulocyty s jadernými segmenty, které jsou buď zcela oddělené nebo různým způsobem pospojované – *nefilamentozní granulocyty*.



Filamentozní a nefilamentozní granulocyty

- Dříve toto vyšetření mělo význam u diagnostiky Crohnovy nemoci, u které se v aktivním stadiu onemocnění nacházel zvýšený výskyt filamentozních granulocytů.

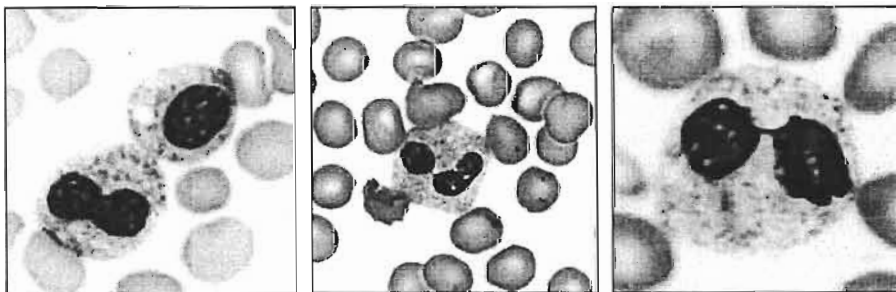
ANOMÁLIE BÍLÉ KRVINKY

Poruchy velikosti a segmentace

Pelgerova-Hüetova anomálie (PH-anomálie)

Holandský lékař Karel Pelger (1885–1931) popsal v roce 1925 anomálie projevující se poruchou segmentace jader granulocytů. Hüet v roce 1932 popsal tuto anomálii jako dědičnou a benigní.

PH-anomálie je vrozená autozomálně dominantní porucha, která se projevuje **sníženou segmentací neutrofilních leukocytů** (segmenty se skládají maximálně ze dvou částí). Většina segmentů má paličkovité nebo i kulaté jádro. Granulocyty nejmenší ve 20–50 % nemají jádro členěné na segmenty buď vůbec, nebo jsou přítomna nejvýše dvousegmentovaná jádra (tvarem připomínající činky, brýle nebo burský oříšek). V porovnání s normálními neutrofily vypadají segmenty jakoby stlačené. Jaderný chromatin je velmi hrubý, segmentované části chromatinu bývají spojeny



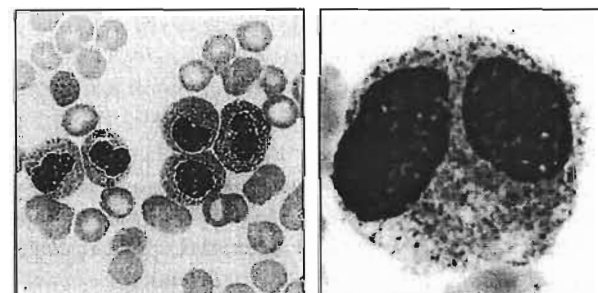
Pelgerova-Hüetova anomálie u neutrofilních granulocytů

tenkým chromatinovým můstkem. Funkce granulocytů není narušena, je normální. Rozeznáváme formu heterozygotní a homozygotní. U homozygotní formy nenacházíme u neutrofilů prakticky žádné členění jádra a jaderné segmenty jsou zakulacené.

Pseudo PH-anomálie

Nachází se obdobné změny jako u vrozené PH-anomálie. Častěji se nachází hypogranulární formy neutrofilů.

Výskyt: u těžkých infekcí, u akutní myeloidní leukemie s myelodysplastickými změnami, u myelodysplastického syndromu, u chronické myeloidní leukemie během akcelerované fáze onemocnění, u metastáz karcinomů v kostní dřeni a s touto formou se lze setkat i po podání některých léků (např. sulfoamidy).



Pseudo Pelgerova-Hüetova anomálie u neutrofilních granulocytů

Hypersegmentace neutrofilů

Zvýšení počtu jaderných úseků u vyzrálých forem neutrofilních leukocytů. Za normálních okolností se průměrně v jednom segmentovaném granulocytu nachází kolem 3 jaderných úseků. Počet nad 6 svědčí pro hypersegmentaci. Může se nacházet i 10–12 jaderných úseků, většinou spojených tenkými chromatinovými můstky. Funkce neutrofilů není narušena (Westerman a spol., 1999).

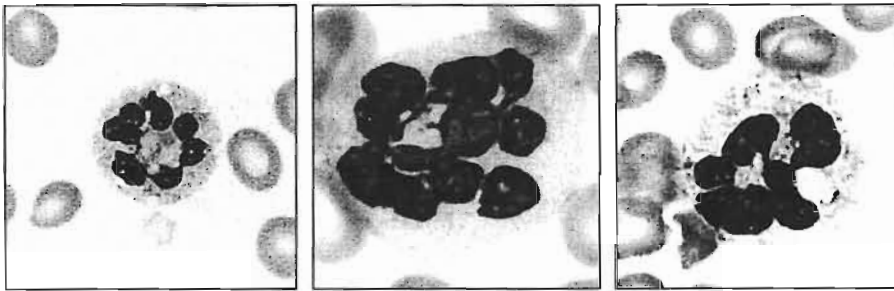
Výskyt: existuje i dědičná forma této anomálie, ale většinou jde o sekundární projevy vyvolané nedostatkem vit. B₁₂ a kyseliny listové (megaloblastové anémie). Vyskytuje se i po cytostatické léčbě, zejména metotrexátem.

- Za normálních okolností se průměrně v jednom segmentovaném granulocytu nachází kolem 3 jaderných úseků. Počet nad 6 svědčí pro hypersegmentaci.

Obrovské granulocyty

Jde o vrozené onemocnění, při kterém se v nátěrech obvodové krve nachází **velké granulocyty**. Průměr takto změněných granulocytů přesahuje 2–3násobek normálního průměru.

Výskyt: hlavně jako sekundární projev při myelodysplazii a po podání cytostatik.



Hypersegmentace granulocytů

Obrovské granulocyty

Změny granulace

Alderova-Reillyho konstituční anomálie granulocytů

Byla poprvé popsána Alderem (1939) a později Reillym (1941).

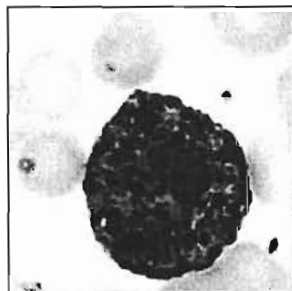
Tato konstituční anomálie je charakteristická **hrubou azurofilní granulací neutrofilů, eozinofilů, bazofilů** a někdy i monocytů a lymfocytů. Bývá viditelné jádro, většinou je však granulemi zakryto. V buňkách se nachází četná poměrně velká hrubá tmavá zrna, podobná bazofilní granulaci. V kostní dřeni se tato granula vyskytují jen u méně zralých forem granulocytů. Jde o **defekt buněčného metabolismu bílkovin a sacharidů, které nepodléhají enzymatickým degradačním procesům** (dochází ke hromadění mukopolysacharidů v lysozomálním aparátu buňky). Funkce granulocytů tím není narušena.

Výskyt: nachází se u teaurismóz s poruchami metabolismu bílkovin, či sacharidů. Nachází se zejména tam, kde je vystupňovaný buněčný obrat (CML, talasemie aj.).

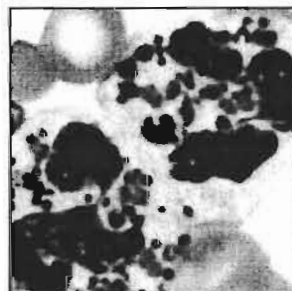
Chediakova-Steinbrinckova-Higashiho anomálie

Syndrom byl poprvé popsán r. 1943 Cezarem, později Chediakem a Higashim.

U této anomálie se nachází v cytoplazmě **obrovské amorfni peroxidázo-pozitivní granule** (průměr až 4 μ m). Tyto granule nesnadno fúzují, vážne fagocytoza.



Alderova-Reillyho anomálie



Chediakova-Steinbrinckova-Higashiho anomálie u neutrofilů

Změny se týkají granulace a jaderných struktur všech leukocytů. Jde o zřídka se vyskytující autozomálně recesivní **defekt na úrovni membrány (složení sfingolipidů) a defekt v inhibici tvorby mikrotubulů**, které vedou k ochromení migrace a degranulace. Je rovněž narušena cytotoxicita a zpracování antigenu. Anomálie bývá spojena i s jinými vývojovými změnami kožní tkáně, kostí a jiných orgánů. Často se přidružuje pancytopenie. Defekt doprovází časté infekční komplikace, nebo některé další abnormity (albinismus, mentální retardace).

Toxické zrnění

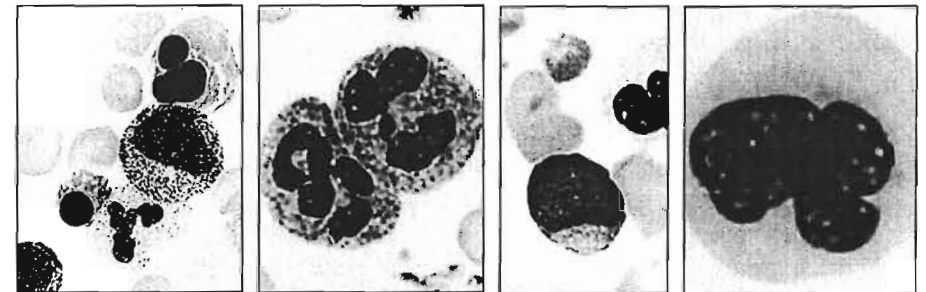
(Toxická granulace)

Při těžkých infekcích, otravách a po podání některých léků, zejména cytostatik, mohou být v leukocytech přítomná **azurofilní granula – tzv. toxická granula**. Granula se barví červenohnědě nebo červenofialově a vyplňují plazmu bílých krvinek buď difúzně nebo jsou nepravidelně rozloženy mezi normálními neutrofilními granulemi. Morfologicky je možné rozlišit toxická granula: jemná, střední a hrubá (Smetana, 2005). Toto rozlišení se dříve hojně používalo, v současné době se od této diferenciace upouští.

Výskyt: těžké infekce a otravy, léčba cytostatiky

Snížená granulace

Jde většinou o arteficiální úkaz vyvolaný chybným barvením. Snížení, nepravidelnosti nebo úplné vymizení granulace může svědčit pro MDS.



Toxická granulace v neutrofilech

Snížená granulace u MDS

Změny v cytoplazmě

Vakuolizace

V cytoplazmě a někdy i v jádře se vyskytují kulatá prázdná nebo prosvětlená místa (vakuoly).

Výskyt: těžké infekce a septické stavy, otravy.

- Vakuoly se mohou nacházet za fyziologických podmínek jen u monocytů. U neutrofilů, bazofilů, eozinofilů a lymfocytů je jejich výskyt příznakem patologie.

gických změn nebo poškození buňky. Vakuoly se nachází rovněž u nezralých buněčných forem, zejména u hemoblastóz nacházíme vakuoly u leukemických buněk. Vakuolizaci granulocytů často předchází jejich degranulace.

Döhleho tělíčka (inkluze)

Döhleho tělíčka jsou *malá kulatá nebo oválná ostře ohraničená cystická tělíčka v cytoplasmě neutrofilů, soustředěná hlavně při okraji membrány* o velikosti 1–2 μm , která se *barví světle modře až do šeda*. Vznikají v oblastech, kde se nachází ribozomy a endoplazmatické retikulum. V buňkách se vyskytuje většinou 1–5 Döhleho tělísek. Mohou se nacházet i v nezralých vývojových stádiích krevních buněk granulocytární řady, ale i v monocitech a lymfocytech.

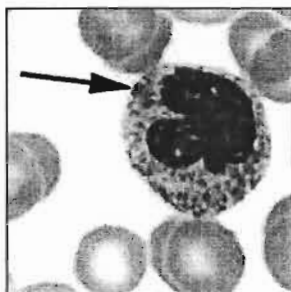
Výskyt: těžké bakteriální infekce (spála, pneumonie), popáleniny, malignity, léčba cytostatiky. Někdy se vyskytují i v průběhu těhotenství.

Anomálie Mayova-Hegglinova

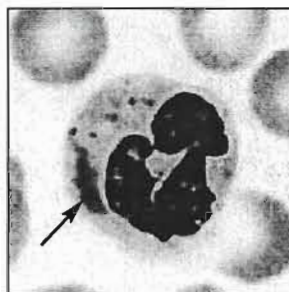
V cytoplasmě neutrofilů nebo eozinofilů, zejména v okrajových částech, jsou přítomná různě velká *bledě modrá políčka tvaru vřetena nebo srpku* (bazofilní inkluze). Změna je často provázena leukopenií s nálezem Döhleho tělísek a trombocytopenií s nálezem velkých trombocytů.



Vakuolizace



Döhleho inkluze



Mayova-Hegglinova anomálie

Změny v lymfocytech

Riederovy formy

U některých nemocí lze pozorovat v *jádrech lymfocytů zářezy až segmentaci*. Tyto morfologické změny popisujeme jako Riederovy formy.

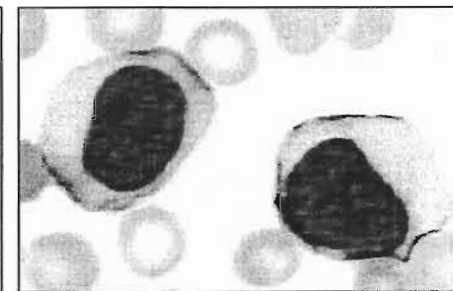
Reaktivní formy lymfocytů (virocyty)

Za reaktivní formy lymfocytů se považují *velké lymfocyty s kulatým nebo vkleslým jádrem (připomínající jádro monocytu), bazofilnější cytoplazmou a řidším jaderným chromatinem*.

Výskyt: některé virózy, infekční mononukleóza



Riederovy formy u lymfocytů



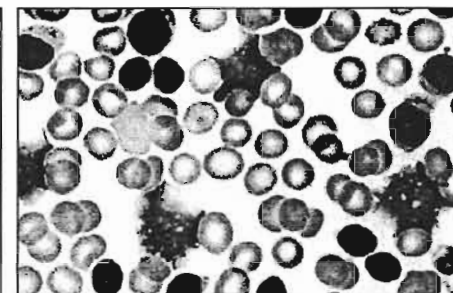
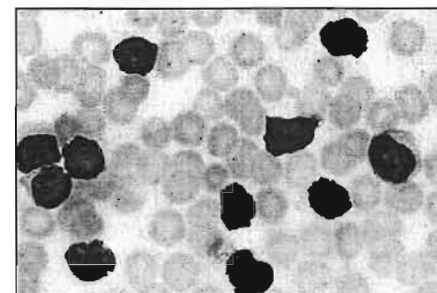
Reaktivní formy lymfocytů

Jiné změny

Gumprechtovy stíny

Gumprechtovy stíny jsou vlastně *laboratorní artefakty*, které se mohou projevit při zhotovení nátěru některých stavů, u kterých jádra lymfoidních buněk nemají dostatečnou soudružnost. Lymfoidní buňky, hlavně leukemické, jsou velmi fragilní a snadno ztrácí cytoplazmu. Při mechanickém namáhání, pak dochází k jejich narušení a rozdrvení. V nátěru nacházíme rozetřená jádra.

Výskyt: chronická lymfatická leukemie, některé formy AL.



Gumprechtovy stíny – periferní krev

Poruchy jader

Poruchy jader se mohou projevit nejčastěji *pyknózou jádra s rozmazanou strukturou chromatinu*.

Auerovy tyčky (tělíčka)

Auerovy tyčky vznikají *splynutím azurofilních zrn v endoplazmatickém retikulu*. V plazmě myeloblastů se nachází 1 nebo více červeně se barvicích tyčkovitých útvarů. Auerovy tyčky jsou tedy vlastně *abnormální lysozomy vřetenovitého tvaru se známkami krystalizace*. Mají vlastnosti a enzymatickou výbavu shodnou

s azurofilními granuly (myeloperoxidáza a další enzymy). Auerovy tyčky mohou tvořit větší celky otýpky nebo svazky (fagott cells).

Výskyt: AML (hlavně typy M_1 – M_3).



Auerovy tyčky – periferní krev



Fagott cell – periferní krev

LE BUŇKY

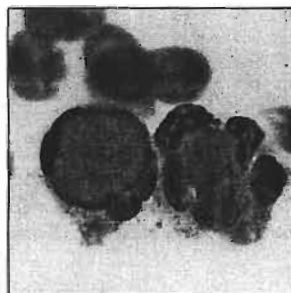
(LE = Lupus Erythematodes Disseminatus)

Systémový Lupus Erythematodes (SLE) je choroba pojivové tkáně spojená se vznikem autoprotilátek proti DNA, RNA a nukleoproteinům. Předpokládá se, že příčinou SLE je hyperaktivita imunitní odpovědi zprostředkované B-lymfocyty. V nátěrech se nachází tzv. LE buňky.

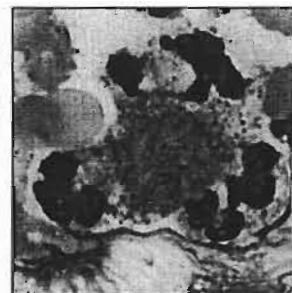
LE BUŇKY – JEDNOTLIVÉ FORMY



Amorfní bílkovinná hmota jádra



Fagocytující neutrofil



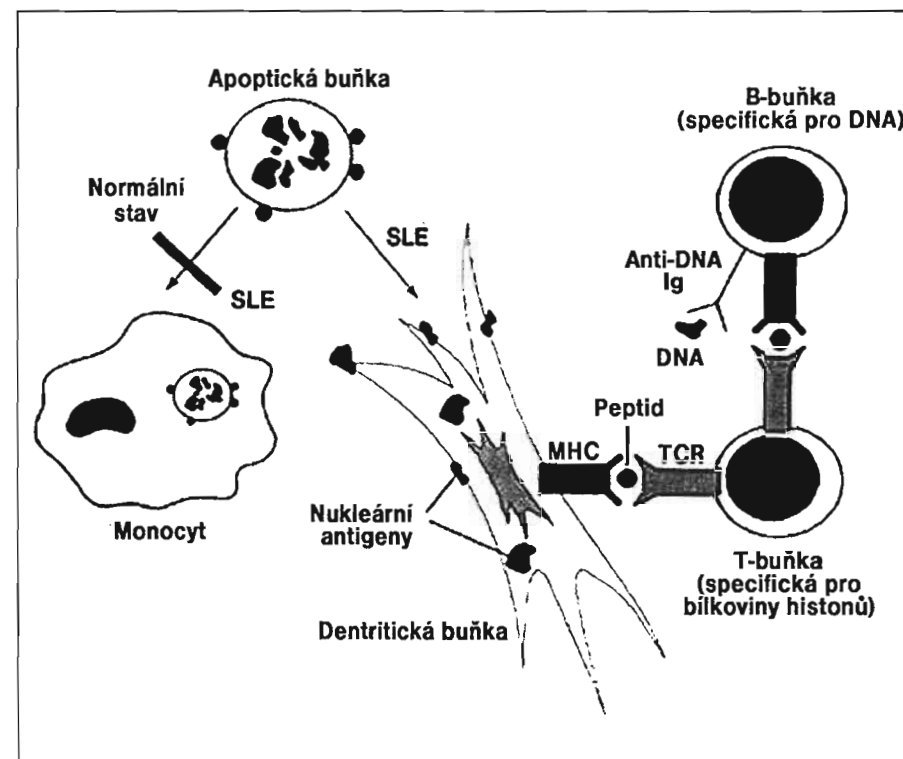
Rozeta LE buňky

LE buňka je neutrofil (vzácně monocyty) s jádrem vytlačeným na periferii a s fagocytovanými amorfními hmotami vzniklými depolymerizací nukleových kyselin (DNA, RNA) z jader zaniklých neutrofilů. Tyto buňky vznikají účinkem protilátek namířených proti jádru leukocytu. Jádra se poškozuji, dochází k jejich uvolnění a posléze jsou fagocytována. Protílátka vniká do jádra, to se rozruší a dojde k depolymeraci jaderného chromatinu. Jádro tak postupně ztrácí svou strukturu

a funkci – bazofilie jádra se vytrácí. Zaniká tak i možnost obnovování buněčné cytoplazmy a dochází k jejímu rozpadu. Nakonec zůstává jen amorfní bílkovinná hmota jádra, která se uvolňuje. Na tuto amorfní hmotu nasedají neutrofil (vzniká růžice – rozeta). Neutrofil amorfní bílkovinnou hmotu fagocytuje a původní jádro je fagocytovanou hmotou vytlačeno na okraj – vzniká LE buňka.

V obarvených nátěrech se nachází rozety nebo amorfní hmota. Za normálních okolností dochází k pohlcení apoptických buněk makrofágy a k jejich konečnému rozkladu.

MOŽNÝ MECHANISMUS VZNIKU SLE



U **SLE** se předpokládá, že vznik protilátek je vyvolán hyperaktivitou imunitní odpovědi zprostředkovanou B lymfocyty. Na předchozím obrázku je znázorněn možný mechanismus vzniku systémového SLE. Z apoptických buněk se u tohoto onemocnění uvolňují do okolního prostředí fragmenty DNA, které aktivují imunologickou odpověď. Signál k tvorbě protilátek lymfocyty citlivými k DNA je zprostředkován dentritickými buňkami a T-lymfocyty.

Výskyt:

- Lupus erythematoses disseminatus (autoimunitní onemocnění postihující tkáň mezenchymu) – u nemocných se nachází typický motýlovitý exantém postihující kořen nosu a tváře.
- autoimunitní onemocnění pojiva
- neerozivní artritida postihující dva nebo více kloubů.



SLE – motýlovitá kresba

Nepravé LE buňky

Nepravé LE buňky mají fagocytované jádro lymfocytu (Tartova buňka), které si zachovává ještě svou strukturu.

Výskyt: některá kloubní onemocnění reakce z přecitlivělosti.

Agregáty neutrofilů

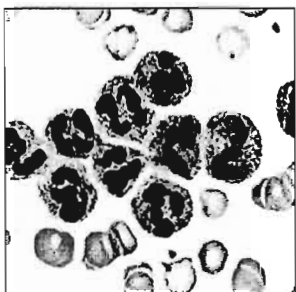
Agregáty neutrofilů jsou velmi ojedinělým jevem. Vznikají v periferní krvi působením autoprotilátek nebo se objevují po infekci. Protilátky jsou aktivní jen v systémech in vitro. Agregáty obsahují morfologicky normální neutrofile. Jsou-li agregáty vyvolány infekcí bývá v neutrofilech přítomno toxické zrnění. Počet leukocytů získaný na automatech krevních buněk bývá v těchto případech falešně nízký. (Deal a spol. 1995).

Apoptóza neutrofilů

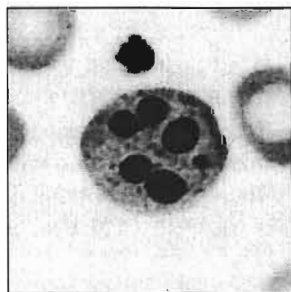
Při apoptóze neutrofilů dochází k fragmentaci jaderné DNA. V buňkách jsou jasné ohraničené oválné fragmenty DNA uvnitř buňky. Ojediněle lze apoptické formy buněk nalézt i v normálních preparátech, zejména v období po proběhlé infekci nebo v krvi skladované po delší dobu v chladu (již po 12–18 hodinách skladování při 4 °C). Cytoplazma má často tmavý odstín bez granulace.

Adherované erythrocyty

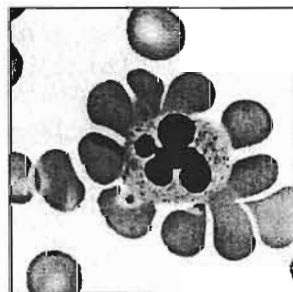
U těžkých hemolytických stavů může docházet k adhezenci erythrocytů k povrchu neutrofilu.



Agregáty neutrofilů



Apoptotická buňka



Adherované erythrocyty

2.3. Změny morfologie krevní destičky

Mikrotrombocyty

(řecky: *mikros* = malý, *thrombos* = sraženina)

Jde o velmi malé trombocyty o průměru menším než 1,5 μm a o objemu destiček menším než 8 fl.

Výskyt: sideropenické a sideroblastické anémie, talasemie.

Makrotrombocyty

(řecky: *makros* = velký, *thrombos* = sraženina)

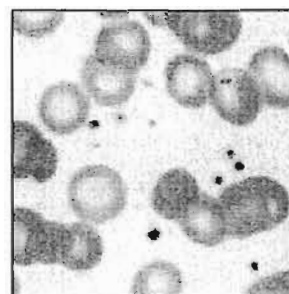
Jedná se o velké destičky s průměrem větším než 3,5 μm a MPV větším než 14 fl.

Výskyt: trombocytopenie Mayova-Hegglinova, syndrom Bernardův-Soulierův. Větší destičky se mohou nacházet i u hyposplenismu.

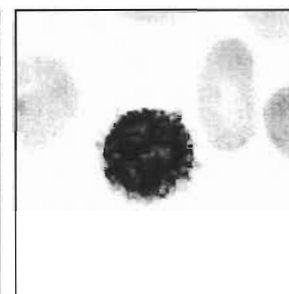
Anizocytoza trombocytů

(řecky: *an-isos* = nestejný)

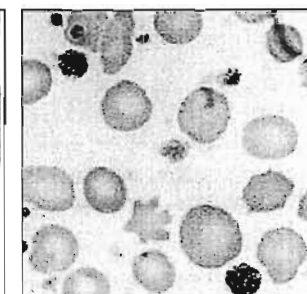
Anizocytoza trombocytů se zjišťuje všude tam, kde se nachází současně mikrotrombocyty, makrotrombocyty a destičky o normální velikosti.



Mikrotrombocyty



Makrotrombocyty



Anizocytoza trombocytů

Destičkový satelismus

Destičkový satelitismus je jev, který se vyskytuje na neutrofilech. Obnažený glykokalyx granulocytů umožňuje krevním destičkám vychytávat se na jejich membrány. V přítomnosti některých látek (léky, EDTA aj.) dochází k obnažení glykoproteinového obalu (glykokalyx) membrány neutrofilů. Krevní destičky pak adherují k takto obnaženému neutrofilu (Skinnider a spol., 1978). Mechanismus, při kterém dochází k odhalení membrány neutrofilů není zcela jasný.

Výskyt: u nemocných s protilátkami proti destičkám, ale nachází se i u jiných stavů i u relativně zdravých jedinců. Tento jev vyvolává arteficiální trombocytopenii.

Syndrom šedých destiček

Krevní destičky u tohoto syndromu postrádají granulaci. Nachází se jen šedavé

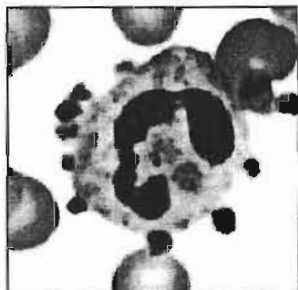
formy destiček bez vnitřní granulární formy. U těchto destiček neprobíhá uvolňovací reakce a mají narušeny i další destičkové funkce.

Výskyt: syndrom šedých destiček je samostatná klinická jednotka, která vede ke krvácivým stavům.

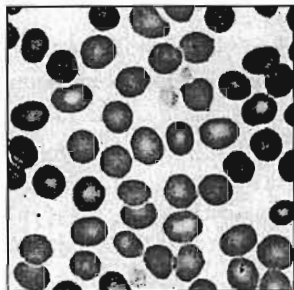
Agregáty trombocytů

Agregáty trombocytů se vyskytují ze dvou příčin. Jednak jde o zvýšenou aktivitu krevních destiček. V druhém případě může jít o tzv. **EDTA fenomén**, kdy se u některých jedinců tvoří po odběru krve do EDTA solí trombocytové agregáty. EDTA pravděpodobně způsobí odhalení glykokalyx krevních destiček a ty se začnou navzájem shlukovat. EDTA může vyvolat konformační změnu GP IIb/IIIa na membráně krevní destičky a tím vyvolat její agregaci (Stavem a Berg, 1973).

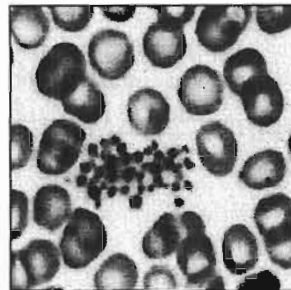
Při použití analyzátorů krvinek tyto agregáty způsobují tzv. **nepravou (laboratorní) trombocytopenii**, při které se agregáty započítají buď do erytrocytů nebo do leukocytů podle typu analyzátoru.



Destičkový satelitismus



Syndrom šedých destiček



Agregáty trombocytů

2.4. Přítomnost parazitů v krvi

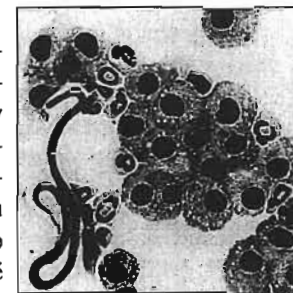
➤ Tato problematika nepatří přímo do oblasti hematologie, ale protože s některými parazity se můžeme setkat v červených krvinkách, s jinými v jaderných krevních buňkách (zejména u makrofágů) a jiní se vyskytují volně v krvi, zmíníme se o nich v této části. S parazity v oblasti hematologie se setkáváme hlavně v krevních nátěrech.

Paraziti jsou cizopasně organizmy, které využívají hostitele jako zdroj své potravy a často i jako své životní prostředí. Přitom dochází k poškození tkání hostitele. V medicínské praxi se pod parazity zařazují červi a prvoci.

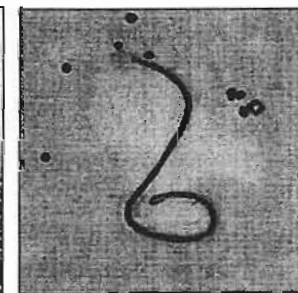
2.4.1. Červi

FILARIOZY

Filariózy způsobují filárie. Jsou to červi s nitkovitou strukturou, délky 2–60 cm. Patří do řádu FILARIIA, třídy NEMATODES. Samičky kladou embryonální vajíčka, nebo rodí živé larvy označované jako **mikrofilarie** (velikosti 0,2–0,3 mm). Objevují se v kůži nebo v krvi. Většina mikrofilarií se objevuje v noci, přes den se zdržují v kapilární síti plic. Dospělí červi přežívají až 15 let. Ve světě se vyskytuje celkem 5 druhů filarióz. Filariózu lymfatických tkání vyvolávají **WUCHERIA BANCROFTI**, **BRUGIA MALAYI** nebo **BRUGIA TIMORI**. Filariózu subkutánních tkání způsobuje filárie **LOA LOA**.



Mikrofilárie v uzlině



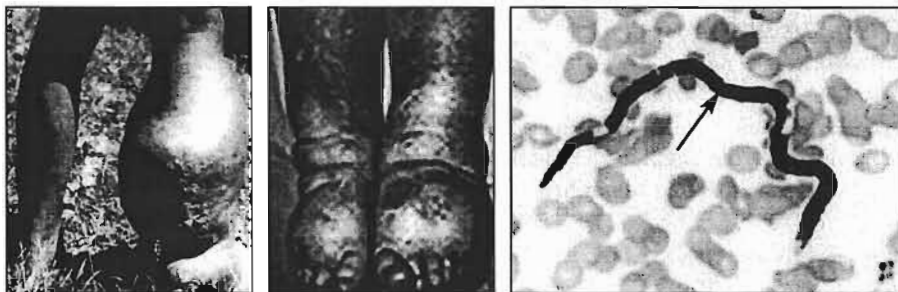
Mikrofilárie v krvi

WUCHERIA Bancrofti

Wucheria Bancrofti způsobuje wucheriózu. Je to cizopasný červ (vlasovec), který je přenášen komáry rodu **CULEX**, **ANOPHELES**, **Aedes** a **MANSONIA**. Parazit vyvolává u lidí lymfatickou filariózu. Je to bolestivá a lidské tělo znetvořující nemoc. Červ napadá převážně mízní cévy lidského lymfatického systému, ve kterých se množí, uzavírá jejich průsvit a z nich se dostává do krve. Zamezení odtoku lymfy vede k výrazným otokům různých částí těla, především paží, nohou, prsou a genitálií – **elefantiáza** (Dacie a Lewis, 2001).

Nález v krvi: nacházíme zde **hádkovité útvary**.

Přenos: nejčastějším přenosem jsou krevní převody (mikrofilarie infikovaného dárce se dostávají do krve příjemce).



Lymfatický otok šourku

Lymfatické otoky nohou

Mikrofilárie v krvi

Výskyt: zejména v Číně, Indii a Indonésii. Podle statistik WHO je v současné době (r. 2005) nakaženo asi 120–140 milionů lidí a další 1 miliarda je vystavena přímému účinku infekce nebo žije v oblasti jejího zvýšeného výskytu.

2.4.2. Prvoci

(Protozoa)

Prvoci jsou jednobuněčné organizmy. Jsou mnohem větší než bakterie a viry. Mají podobné funkce a vývojová stadia jako paraziti.

TOXOPLAZMÓZY

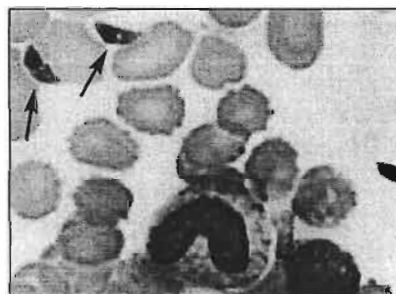
TOXOPLASMA gondii je parazit, který žije a množí se ve všech jaderných buňkách.

Přenos: nedostatečně tepelně upravené maso infikovaných zvířat, hlavně prasat a králíků.

PLASMODIA

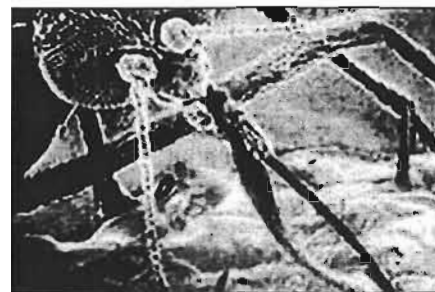
Malárie je onemocnění vyvolané prvoky, vyskytující se především v tropech. Původci malárie jsou prvoci rodu *PLASMODIUM*, které jsou přenášeny samičkou komára *ANOPHELES*, v jehož těle prodělává parazit část svého vývoje. Člověk může být napaden čtyřmi druhy plasmodií: *VIVAX* (*LAVERANIA*), *FALCIPARUM*, *MALARIAE* a *OVALE*.

- Podle druhu původce dochází k hemolýze a k horečnatému stavu ve třídních (malaria terciána), nebo čtyřdenních (malaria kvartana) intervalech a podle druhu parazita se liší nálezy v erythrocytech. Ze čtyř druhů *Plasmodia* způsobu-



TOXOPLASMA gondii – nález v krvi

ující infekci u lidí je *Plasmodium falciparum* spojováno s vyšší morbiditou a mortalitou, vyvolanou vyšším stupněm parazitémie.

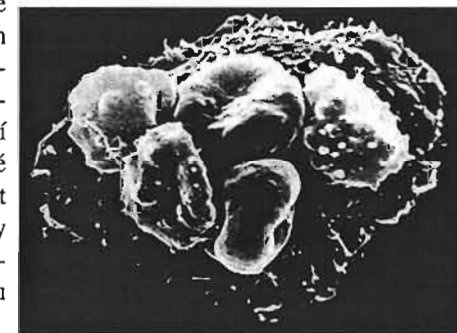


Hlavička a sósák komára ANOPHELES



Komár ANOPHELES

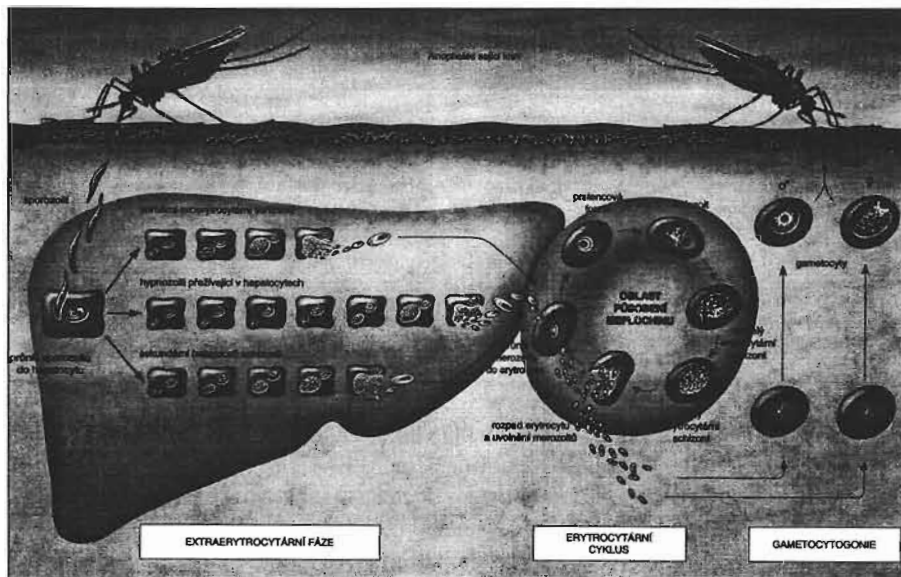
Přenos: Nasaje-li komár krev nemocného s malárií, dostanou se **gamety** těchto parazitů do trávicího ústrojí komára. Zde se pohlavně množí a vytvoří **sporozoity**. Při bodnutí člověka nakaženým hmyzem dochází k přenosu slin společně se sporozoity do kapilárního systému infikovaného člověka, odkud putují do jater a napadají hepatocyty. V játrech dochází k jejich pomnožení mnohonásobným dělením jader tzv. **schizogonií** (stadium latence trvá několik dní až měsíců). Po prasknutí hepatocytu se jednotlivé jednojaderné zárodky (**merozoity**) uvolňují do krevního řečiště, kde napadají erythrocyty, rostou a mění se v prstenčité formy (**trofozoity**), jejichž jádro se opět dělí schizogonií. Zralí schizonti se rozpadnou spolu s erythrocytem na jednojaderné merozoity, které napadají další erythrocyty. Z rozpadlých erythrocytů se uvolňuje hemoglobin a dochází k hemolýze. Po několika dnech parazitémie se v erythrocytech tvoří samičí makrogamety a samčí mikrogamety, které mohou v krevním oběhu člověka přežívat až několik týdnů a mohou být opět nasáty ANOPHELEM, v jehož těle proběhne nové pohlavní množení a cyklus se znovu opakuje (Wengelnik a spol., 2002).



Napadané erythrocyty

- V hepatocytech se může nacházet tzv. spící stadium – **hypnozoit**, které po nej-
různějších impulsích může za měsíce až roky po léčbě malárie obnovit onemoc-
nění – tzv. pozdní relaps onemocnění *Plasmodium ovale* nebo *vivax*. U typu *Plasmodium malariae* může původce přežívat ve velmi nízké parazitémii v periferní krvi až několik desetiletí – **rekrudescence**.

SCHEMATICKE ZNAZORNENÍ VÝVOJOVÝCH STÁDIÍ PLASMODIA VIVAX



V erythrocytech obvodové krve člověka s malárií můžeme pozorovat celkem 4 vývojová stadia malarických residuí:

- **mladé trofozoity** (prstenčitý tvar)
- **rostoucí trofozoity**
- **schizonty**
- **mikrogametocyty a makrogametocyty**

Parazit využívá hemoglobin erytrocytů, zejména jeho globinovou část, kterou rozkládá na aminokyseliny a ty používá při svém metabolismu (k syntéze svých bílkovin). Z hemové části se tvoří odpadní produkt ferriprotoporfyrin - **hemozoin** (tzv. malarický pigment). Dále můžeme pozorovat tzv. **Schüffnerovo tečkování**. Jde o artefakt, který vzniká natečením barviva do prohlubní (kalveol) na povrchu erytrocytu. Barvivo má růžovou až červenou barvu. Nachází se při onemocnění *Plasmodium ovale* nebo *vivax*. Dalším arefaktem, který se nachází u *Plasmodium falciparum* je růžové až červenofialové zabarvení tzv. **Maurerovo tečkování**.

Výskyt: Podle údajů WHO vyskytuje se dnes



Hemozoin – malarický pigment
v erythrocytech

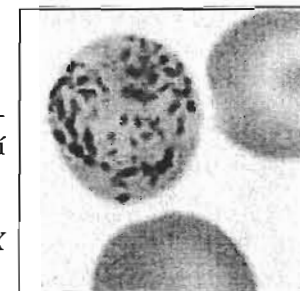
malárie v 91 zemích na světě a tyto oblasti zahrnují asi 40 % světové populace. Na malárii nebo její následky umírá ročně 1,5–2,7 miliónů lidí (*British Committee for Standards in Haematology, 1997*).

PLASMODIUM vivax

Laboratorní nález

- **KO:** makrocytoza, anizocytoza, poikilocytoza
- **Krevní nátěr:** nález velkých erytrocytů v různých stádiích vývoje (malarická plasmodia), které obsahují 12–24 merozoitů (*Warhurst a Williams, 1996*).

➤ *Parazit se velmi čile pohybuje – od toho název VIVAX*



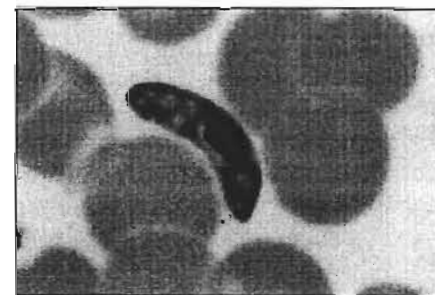
PLASMODIUM vivax –
nález v krvi

PLASMODIUM falciparum

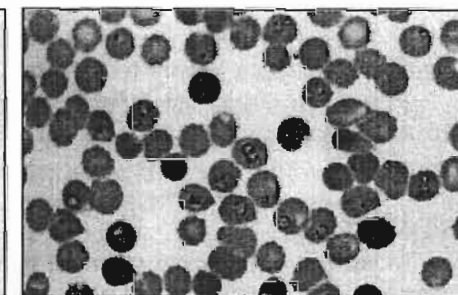
Laboratorní nález

- **KO:** normocytoza
- **Krevní nátěr:** v erythrocytech malé merozoity s dvojitou chromatinovou strukturou, které se nachází často při okrajích buňky. Erythrocyty jsou většinou normální, mohou být i zvětšeny. Je v nich obsaženo 18–24 merozoitů, které zaplňují až 2/3 buňky.

V některých erythrocytech může být Maurerovo tečkování hrubšího typu. V panoptickém barvení sebarví s odstínem do zeleno až hnědofialova (*Warhurst a Williams, 1996*). Nachází se většinou jen mladá vývojová stadia (prstýnky a zralé gametocyty tvaru půlměsíce).



PLASMODIUM falciparum – gametocyt



PLASMODIUM falciparum – trofozoity

➤ *U Plasmodium falciparum je důležité znát procento infikovaných erythrocytů*

PLASMODIUM malariae

Laboratorní nález

- **Krevní nátěr:** erythrocyty jsou normální velikosti, někdy se vyskytují mikrocety,

chybí Schüffnerovo tečkování – rozdíl od vivax a ovale. V erythrocytech bývá 6–12 merozoitů se sníženým zabarvením v centrální části (Warhurst a Williams, 1996).

PLASMODIUM ovale

Laboratorní nález

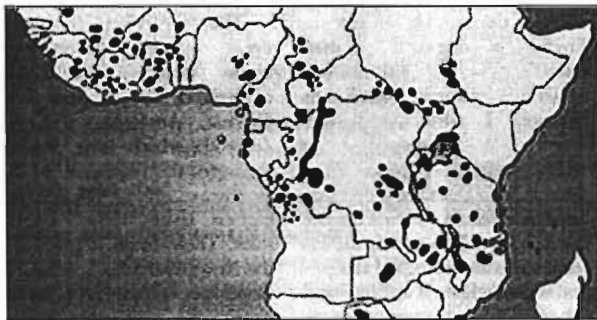
- Nález je podobný jako u Plasmodium Vivax
- **Krevní nátěr:** červená krvinka se zvětšuje, často bývá oválná na okrajích s výběžky a obsahuje Schüffnerovo tečkování, které v panoptickém barvení se barví červeně. V erythrocytech jsou větší merozoity, většinou v počtu 8–12, které zaplňují asi 3/4 objemu buňky (Warhurst a Williams, 1996).
- **Vyšetření na plasmodia se provádí buď z tlusté kapky nebo tenkého nátěru. Při prohlížení nátěrů může docházet k chybám a omylům (trombocyty nalepené na erythrocyty mohou být považovány za parazity, změny v leukocytech mohou být zaměněny za gametocyty, granule v erythrocytech za Mauerovo nebo Schüffnerovo tečkování). Pro malárii svědčí monocytóza, polychromazie a leukopenie, naopak leukocytoza nese svědčí pro malárii.**

TRYPANOSÓMY

Parazit postihuje především CNS, kde jej nacházíme přímo v cerebrospinální tekutině. V akutní fázi lze nalézt trypomastigoty v krvi (mimo krvinky) a v lymfatických uzlinách, jako **červené plošné hádkovité útvary** (Bailey a Smith, 1994).

Přenos: Spavá nemoc (trypanozomóza) je přenášena mouchou tse-tse a způsobována parazity z rodu bičíkovců. Na západě Afriky se vyskytuje *TRYPANOSOMA brucei gambiense* a na východě *TRYPANOSOMA brucei rhodesiense*.

- **První popisy spavé nemoci pocházejí ze 14. století. Trypanosomóza je ve střední Africe endemická nejméně 1500 roků.**



Výskyt trypanozom Brucei
(modrá místa – gambiense, červená místa rhodesiense)



Moucha tse-tse

V jižní a střední Americe existuje forma bičíkovce *TRYPANOSOMA cruzi*, která způsobuje tzv. Chagasovu nemoc. Nemoc vede k patologickým změnám na srdci a zažívacím traktu. Na člověka je přenášena plošticí rodu *Triatoma*, *Panstrongylus* a *Rhodnius*. Trypomastigoty se nachází v krvi jen v akutním stadiu onemocnění a jsou odolnější než ty, co vyvolávají spavou nemoc z oblasti Afriky.



TRYPANOSOMA – plošné hádkovité útvary

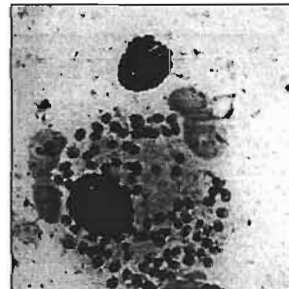
LEISHMANIE

Leishmanie jsou prvoci z kmene BIČÍKOVců – ZOOMASTIGOPHORE. U člověka a obratlovců nemají bičíky, ale mají okrouhlý tvar o velikosti 2–4 µm. Onemocnění vede k rozpadu erythrocytů a ke zvětšení sleziny. Parazity nacházíme buď extracelulárně nebo u pokročilých stavů onemocnění fagocytované v makrofázích v nátěrech z punkce sleziny, lymfatických uzlin, kostní dřeně a periferní krve. *Leishmania donovani* vyvolává onemocnění, které se nazývá kala – azar. U kožní leishmaniózy lze parazity nalézt v nátěrech z kožních lézí (Dacie a Lewis, 2001).

Přenos: komáry druhu PHLEBOTOMUS a LUTZOMYIA.

Laboratorní nález

- **Krevní obraz:** leukopenie, lymfocytóza, monocytóza a hypochromní anémie.



Leishmania –
nález ve slezině



Leishmania donovani –
promastogot narušující
povrch makrofága



Leishmania – nález v krvi

2.4.3. Bakterie

V krvi se mohou nacházet i některé bakteriální struktury, které můžeme odhalit v panopticky obarvených nátěrech periferní krve.

TREPONÉMY

První zmínka o pohlavních chorobách projevujících se vyrážkami a vředy pochází z r. 2736 před Kristem (spisy čínského císaře Hoang Ti).

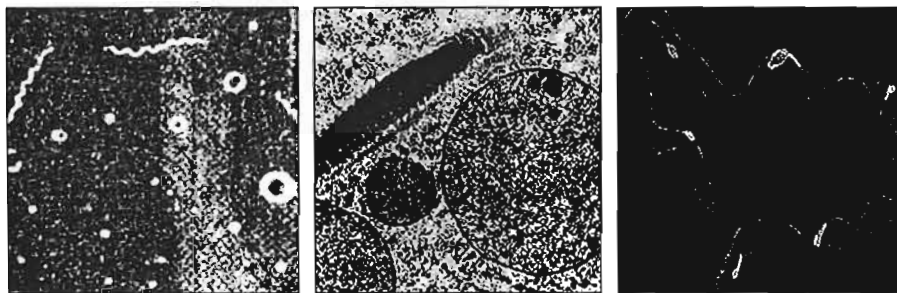
TREPONEMA pallidum

TREPONEMA pallidum byla objevena 3. 3. 1905 zoologem a parazitologem Schaudinem. Tato treponéma vyvolává **syfilis (příjice, lues)**. Na rozdíl od ostatních bakterií je velmi citlivá na teplotu kolem 4 °C a při této teplotě odumírá během 72 hodin. U třetiny postižených se neléčená syfilis vyvíjí několik let až desetiletí a výjimečně může choroba pokračovat i po řádné léčbě.

- R. 1535 vydal ve Veroně Girolamo Frascastaro báseň s názvem „*Syphilis sive morbus Gallicus*“. Líčil v ní, jak pastýř Syphilus stavěl oltář svému králi místo starým bohům a byl jimi za to potrestán nemocí.
- Příjice – slovo odvozené od jména slovanské bohyně PŘÍJE.
- Latinsky „luere“ znamená rozkládat.

Přenos: je možný jen čerstvou krví nebo koncentráty trombocytů. Transfúzí přenesená příjice (lues) má inkubační dobu 4 týdny až 5 měsíců.

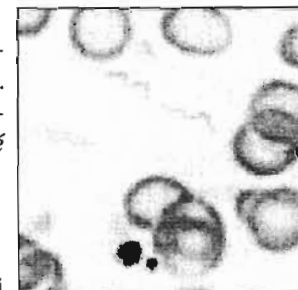
V krvi se nachází útvary vzhledu **prostorové spirály vývrtkovitého tvaru**. Počet závitů kolísá mezi 10–14, v extrémních případech mezi 6–24. Délka bakteriální buňky se pohybuje mezi 4–24 µm, průměrná šířka pak mezi 0,25–0,5 µm. Závitů plošně promítnuté v mikroskopu jsou naprosto pravidelné, stejně vysoké a stejně široké, zaoblené a oproti většině ostatních spirochet velmi jemné. Na obou koncích je buňka zúžena.



TREPONEMA pallidum – uprostřed spirální tvar

BORELIÓZY

Řadí se sem *BORRELIA recurrentis*, která je přenášena vši šatní a *BORRELIA duttoni*, přenášena klíšťaty. Jsou to spirochety, které vyvolávají tzv. návratnou horečku. Nachází se jako **jemné červené nitky v obvodové krvi** v období horečnatých stavů.



BORRELIA recurrentis – nález v krvi

BARTONELÓZA

Byla poprvé popsána Bartonem v r. 1909

Způsobuje ji gram-negativní agens *BARTONELLA bacilliformis*.

Výskyt: nachází se v jižní Americe v Andách.

Laboratorní nález

- **Krevní nátěr:** bakterie tvoří **řetězce** ve většině erytrocytů, někdy seskupení ve tvaru V nebo Y. Vyskytují se i formy kokovité řadící se v páry.

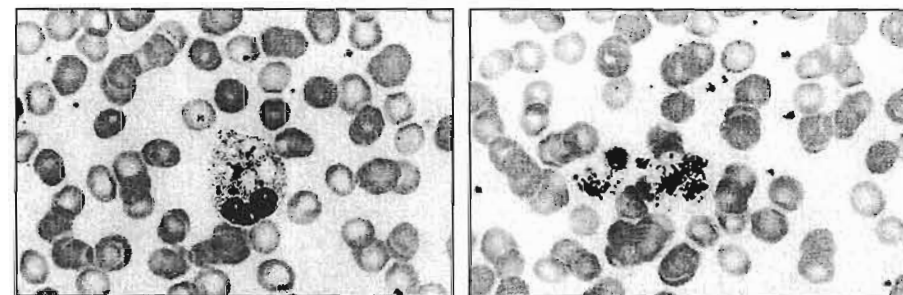


BARTONELLA bacilliformis – periferní krev

STAFYLOKOKOVÉ INFEKCE

Velmi vzácně lze nalézt bakterie buď ve vakuolách nebo volně v cytoplazmě neutrofilů.

Výskyt: u stafylokokových infekcí, je-li krev sbírána od infikovaných jedinců (Howard a Smith, 1999).



Bakterie ve vakuolách neutrofilů

Bakterie volně v cytoplazmě

2.4.4. Mykotické formy

KANDIDÓZY

(Candidosis)

Původcem jsou nejčastěji *CANDIDA albicans* a *CANDIDA tropicalis*. U nemocných s kandidózami můžeme tyto struktury vidět v neutrofilech. Na obrázku jsou v horním neutrofilu vidět dvě kulaté struktury houby *CANDIDA parapsilosis*.



CANDIDA parapsilosis –
nález v krvi

Literatura

AILEY, W., SMITH, D. The quantitative buffy coat for the diagnosis of trypanosomes. *Tropical Doctor*, 1994, roč. 24, s. 54–56.

British Committee for Standards in Haematology 1997. The laboratory diagnosis of malaria. *Clin. Lab. Haematol.*, 1997, roč. 19, s. 165–170.

CROOK, M., WILLIAMS, W., SCHEY, S. Target cells and stomatocytes in heterozygous familial hypobetalipoproteinaemia. *Eur. J. Haematol.*, 1998, roč. 60, s. 68–69.

DACIE, J., LEWIS, S. J. Practical haematology. Ninth edition. London: Churchill Livingstone, 2001. 633 s.

DEAL, J., HERNANDEZ, A. M., PIERRE, R. V. Ethylenediamine tetraacetic acid-associated leukoagglutination. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1995, roč. 103, s. 338–340.

HOWARD, M. R., SMITH, R. A. Early diagnosis of septicaemia in preterm infants from examination of the peripheral blood films. *Clin. Lab. Haematol.*, 1999, roč. 21, s. 365–368.

JACOB, H. S. Mechanisms of Heinz body formation and attachment to red cell membrane. *Semin. Hematol.*, 1970, roč. 7, s. 341.

LOCK, S. P., SEPHTON SMITH, R., HARDISTY, R. M. Stomatocytosis: a hereditary red cell anomaly associated with haemolytic anaemia. *Brit. J. Haematol.*, 1961, roč. 7, s. 303.

MARSH, G. W. Abnormal contraction, distortion and fragmentation in human red cells. London: London University MD thesis, 1966.

PAPPENHEIMER, A. M., THOMPSON, K. P., PARKER, D. D., et al. Anaemia associated with unidentified erythrocytic inclusions after splenectomy. *Q. J. Med.*, 1945, roč. 14, s. 75.

PONDER, E.: Hemolysis and related phenomena. New York: Grune & Stratton, 1948.

RODGERS, M. S., CHANG, C.-C., KASS, L. Elliptocytosis and tailed poikilocytes correlate with severity of iron-deficiency anaemia. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1999, roč. 111, s. 672–675.

SALT, H. B., WOLFE, O. H., LLOYD, J. K., et al. On having no beta-lipoprotein. A syndrome comprising a-beta-lipoproteinaemia, acanthocytosis, and steatorrhea. *Lancet*, 1960, roč. 11, s. 325.

SCHWAB, M. L. L., LEWIS, A. E. An improved stain for Heinz bodies. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1969, roč. 51, s. 673.

SKINNIDER, L. F., MUSCLOW, C. E., KAHN, W. Platelet satellitism – an ultrastructural study. *Amer. J. Haematol.*, 1978, roč. 4, s. 179.

SMETANA, K. Nucleoli in blood cells of hematologic malignancies. Trends in Leukemia Research, Romero R. M. ed., Nova Biomed. Books, Hauppauge, New York, 2005, str. 155–180.

STAVEM, P., BERG, K. A macromolecular serum component acting on platelets in

the presence of EDTA – „Platelet stain preventing factor“. *Scand. J. Haematol.*, 1973, roč. 10, s. 202.

WARHURST, D. C., WILLIAMS, J. E. Laboratory diagnosis of malaria. *J. Clin. Pathol.*, 1996, roč. 49, s. 533–538.

WENGELNIK, K., et al. A class of potent antimalarials and their specific accumulation on infected erythrocytes. *Science*, 2002, roč. 295, s. 1311–1314.

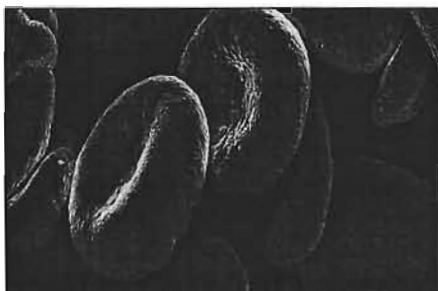
WESTERMAN, D. A., EVANS, D., METZ, J. Neutrophil hypersegmentation in iron deficiency anaemia: a case control study. *Brit. J. Haematol.*, 1999, roč. 107, s. 512–515.

3. FUNKCE A FYZIOLOGIE KREVNÍCH BUNĚK

3.1. Fyziologie červené krvinky

Červená krvinka (erytrocyt)

Červená krvinka je bezjaderná buňka, v krvi nejpočetněji zastoupená (erytrocyty zaujmají 40–45 % objemu krve). Neobsahuje většinu nitrobuněčných organel, proto erytrocyt považujeme spíše za **neúplnou buňku**. Buněčná membrána vlastně uzavírá přesycený roztok hemoglobinu. Barva hemoglobinu a poměrně velký počet erytrocytů v krvi dává krvi charakteristické červené zabarvení. Bikonkávní (dvojvydutý) tvar červené krvinky představuje optimální poměr povrchu k objemu a je velmi výhodný proto, že může být deformován při průchodu kapilárou nebo mezi endotelovými buňkami. Erytrocyty tak mohou procházet kapilárami, jejichž světlost je menší, než průměr erytrocytu.



Červená krvinka – erytrocyt

- Všechny savci mají bezjaderné formy erytrocytů, kdežto ryby a ptáci mají jadernou formu vyzrálé červené krvinky.



Rybí jaderné erytrocyty

Hlavní funkcí erytrocytů v organismu je přenos O_2 z plic do tkání a CO_2 opačným směrem. Tuto funkci zprostředkuje hemoglobin. K **zachování své struktury** produkují erytrocyty prostřednictvím glykolýzy adenosintrifosfát (ATP).

- V obvodové krvi dospělého jedince je za normálních okolností asi 3×10^{13} erytrocytů, což představuje u průměrného jedince asi $0,33 \cdot 10^{12}$ erytrocytů na kg tělesné hmotnosti. Každou sekundu se vytvoří a zároveň zaniká kolem 3 milionů erytrocytů.

NEJDŮLEŽITĚJŠÍ SOUČÁSTÍ ČERVENÉ KRVINKY JE Z FUNKČNÍHO HLEDISKA HEMOGLOBIN. DŮLEŽITOU ROLI VE FYZIOLOGII ERYTROCYTU HRAJE I JEHO ENZYMATICKÁ VÝBAVA A BUNĚČNÁ MEMBRÁNA.

3.1.1. Metabolismus červené krvinky

Erytrocyt přežívá v obvodové krvi po dobu **110–120 dní**. Pro správnou funkci potřebuje dobře vyvinutou buňku, funkční hemoglobin a správně probíhající metabolické pochody. Metabolismus erytrocytů má mnoho zvláštností. Protože erytrocyt nemá buněčné jádro, ztratil schopnost syntetizovat bílkoviny a nukleové kyseliny. Stejně tak téměř úplně chybí citrátový cyklus a dýchací řetězec. Červené krvinky přesto mají **intenzivní metabolismus**. Zralý erytrocyt disponuje asi **22 základními enzymy**, které se uplatňují v metabolických procesech erytrocytu. Metabolismus erytrocytů je tedy ve své podstatě metabolismem sacharidů.

Omezuje se tedy na:

- ◆ **anaerobní glykolýzu** (Embdenův-Meyerhofův cyklus)
- ◆ **aerobní glykolýzu** (Oxidační pentosofosfátový cyklus)

Při obou procesech se získává **chemická energie**, hlavně v podobě **ATP**. Odbourávání glukosy je tedy hlavním zdrojem energie v erytrocytu.

- **Glukóza cirkuluje v krvi ve volném stavu, její koncentrace je za normálních okolností kolem 5 mmol/l. Může vstupovat do buněk, kde se fosforyluje v cytosolu na glukoso-6-fosfát (G-6-P). G-6-P je metabolicky aktivní forma glukosy, která se účastní různých metabolických cyklů. Přestup glukosy do erytrocytu je usnadněn transportním proteinem pro glukosu. Na membráně erytrocytů je umístěno asi 700 tisíc těchto proteinů. Jedná se o protein o MW 55 kDa, který může pronikat membránou. Glukóza se váže na protein pomocí vodíkových vazeb v části C-1 své molekuly a do cytoplazmy vstupuje opačnou částí, koncem C-6.**

ANAEROBNÍ GLYKOLÝZA

(Embdenův-Meyerhofův cyklus)

Anaerobní glykolýza je glykolytický systém, který umožňuje získat **ATP** přeměnou glukosy na laktát. V tomto cyklu se metabolizuje **převážná část glukosy**, která vstoupila do erytrocytu. Tento systém je současně zdrojem nízkomolekulární látky **2,3-bisfosfoglycerátu (2,3-BPG)**, který je jedním z regulátorů přenosu O_2 . **2,3-BPG se získává ve vedlejší cestě přeměnou 1,3-BPG**, která je katalyzována enzymem **difosfoglycerátmutázou**.

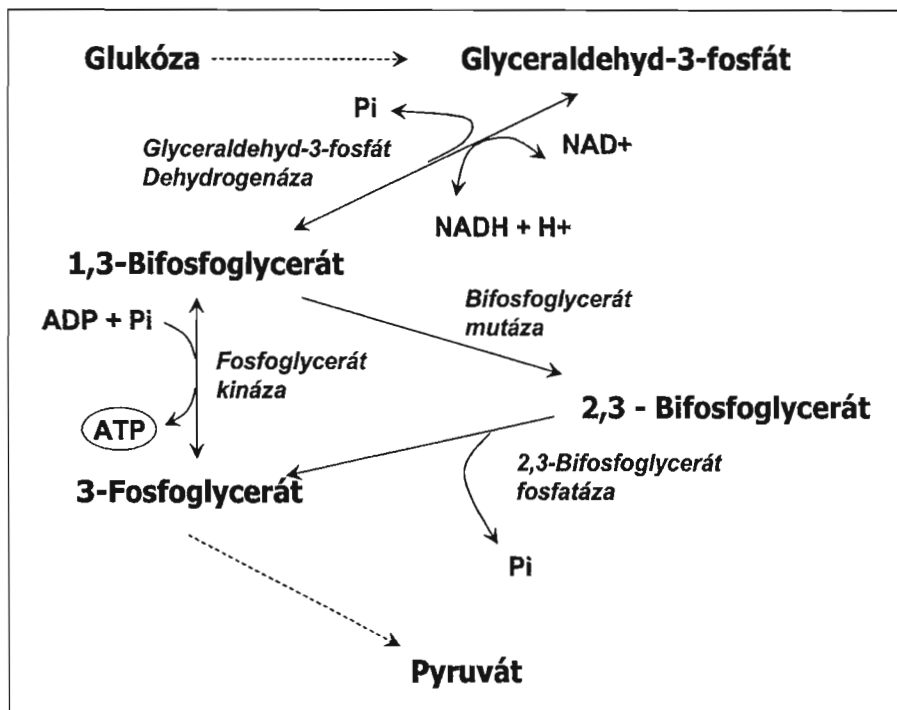
Dalším odbouráním 2,3-BPG lze rovněž získat ATP. Této cesty se využívá k energetickým účelům u stavů, kdy červená krvinka trpí nedostatkem glukosy.

- **2,3-BPG slouží v červené krvi k uvolňování kyslíku do tkání. Stabilizuje totiž kvarterní strukturu deoxygenované formy hemoglobinu a snižuje tak jeho afinitu ke kyslíku - kyslík se snadněji uvolňuje. V deoxygenované formě hemoglobinu se u savců nachází v jeho molekule **centrální dutina**, ve které je přítomná vysoká koncentrace 2,3-BPG. Normální koncentrace 2,3-BPG se pohybuje**

v rozmezí 0,75–0,8 mol/mol hemoglobinu. Při déle trvajícím nedostatku kyslíku při zvýšených nárocích na jeho příjem, koncentrace 2,3-BPG v místě potřeby stoupá.

Při syčení molekuly hemoglobinu kyslíkem – *oxygenaci* se změní struktura hemoglobinové molekuly, včetně tvaru centrální dutiny a 2,3-BPG se do této dutiny „nevejde“ – nedojde k jeho navázání a je proto následně uvolněn do cytoplazmy (Pecka, 2002).

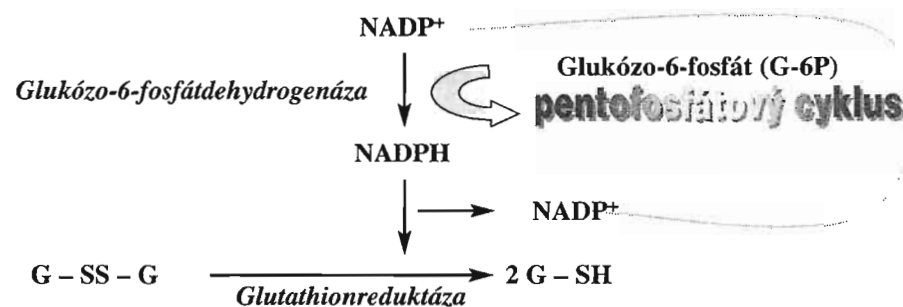
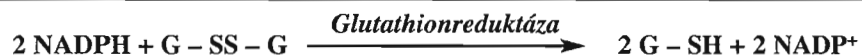
SCHÉMA SYNTÉZY 2,3-BIFOSFOGLYCERÁTU



PENTÓZOFOSFÁTOVÝ (HEXÓZOMONOFOSFÁTOVÝ) CYKLUS

(Aerobní glykolýza)

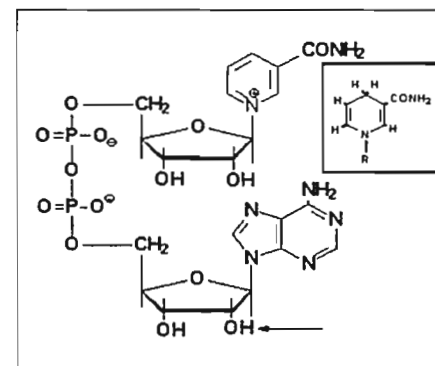
Tímto způsobem se zpracovává asi 5 % glukosy, která se dostává do erytrocytu. V cyklu se tvoří **NADPH**, který je nezbytný pro udržení redukované formy glutathionu (G-SH):



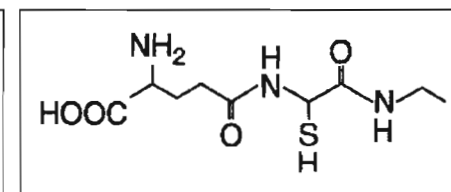
G-SS-G: oxidovaný glutathion

G-SH: redukovaný glutathion

STRUKTURNÍ VZORCE



NAD



Glutathion

➤ **Glutathion (G)** je tripeptid tvořený v červené krvi z aminokyselin Gly-Cys-Glu za přispění enzymu glutathionsyntetázy.

Redukovaný glutathion, který je ve značné koncentraci přítomný v erytrocytech:

- chrání **enzymy a koenzymy** (respektive jejich SH-skupiny) před oxidací **sulfhydrylové skupiny (SH-skupiny)**, která je součástí aktivních míst enzymů a je nezbytná k zachování jejich normální funkce.
- chrání **membránové lipidy** proti peroxidaci
- účastní se **redukce methemoglobinu** (Fe^{3+}) na hemoglobin (Fe^{2+}).

Důležité enzymy sacharidového metabolismu

- **Glukózo-6-fosfátdehydrogenáza (G-6-PD)**
- **hexokináza**
- **pyruvátkináza**

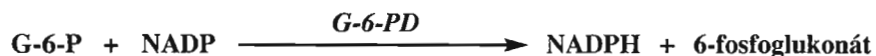
- *Hladiny těchto enzymů lze stanovit spektrofotometrickými metodami. Tam, kde byl zjištěn deficit G-6-PD se netvoří NADPH, ztrácí se ochranná funkce glutathionu a dochází k hemolytickým projevům - defekt G-6-PD.*

Testy ke stanovení enzymů metabolismu sacharidů

Glukózo-6-fosfátdehydrogenáza (G-6-PD)

Jsou-li erytrocyty vystaveny oxidačním vlivům vzrůstá aktivita pentosofosfátového cyklu. Je-li snížena aktivita některého z těchto enzymů nebo tento enzym chybí je v nedostatečné míře produkován glutathion a vážne průběh redukčních procesů (hromadí se oxidovaný hemoglobin).

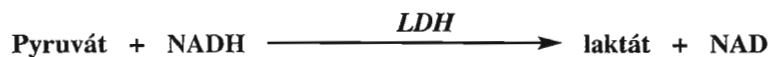
- **Princip stanovení:** v testu se použije vzorek hemolýzátu s obsahem G-6-PD a s přidavkem NADP a glukoso-6-P (G-6-P). V přítomnosti G-6-PD dochází k reakci:



NADPH fluoreskuje v UV oblasti a jeho množství se zjistí fluorometricky. Z výsledného množství NADPH lze vypočítat nepřímo aktivitu G-6-PD (Beutler a spol., 1979).

Pyruvátkináza

- **Princip stanovení:** v testu se použije vzorek s obsahem pyruvátkinázy. Ke vzorku se přidá v přebytku fosfoenolpyruvát, ADP a NADH. V přítomnosti pyruvátkinázy a LDH dochází k reakcím, při kterých se spotřebovává NADH. Zbýlé množství NADH se po reakci zjistí fluorescenčním měřením v UV oblasti. Pokles NADH je nepřímo úměrný aktivitě pyruvátkinázy (Miwa a spol., 1980).



3.1.2. Stárnutí a fyziologický zánik červené krvinky

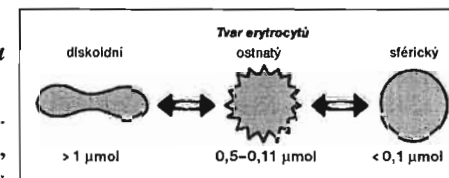
Po průměrné délce života erytrocytu (110–120 dní) dochází k odstraňování erytrocytů z krevního oběhu. U starších krvinek se projevují změny v metabolismu a později i v membráně erytrocytů.

Stárnutí červené krvinky

Potřebná energie k zajištění metabolismu erytrocytů postupně vyčerpá enzymatickou výbavu erytrocytů a dochází k postupnému snižování aktivity enzymů sacharidového metabolismu. Snižováním aktivity těchto enzymů, klesá i výkon sodíkové pumpy a zpomaluje se i přeměna methemoglobinu na hemoglobin.

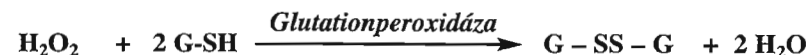
V důsledku těchto změn:

- **stoupá množství methemoglobinu** (z 1 % na 6 %)
- se **pozvolna snižuje syntéza ATP**. Poklesne-li množství ATP **pod 20 %**, nestačí se udržet transportní systémy v membráně erytrocytu (Nakao a spol., 1960).



Vliv snižující se koncentrace ATP na tvar erytrocytu

Vlivem těchto změn klesá v erytrocytu obsah redukčních látek (zejména glutathionu), které se již nestačí syntetizovat v dostatečném množství:



- *Glutathionperoxidáza obsahuje v centrálním místě atom Se a proto její aktivita je v přímém vztahu k hladině Se v krvi.*

Stárnoucí buňka se v důsledku toho nemůže ubránit peroxidaci lipidů, akumulaci methemoglobinu a denaturaci enzymů a membránových bílkovin.



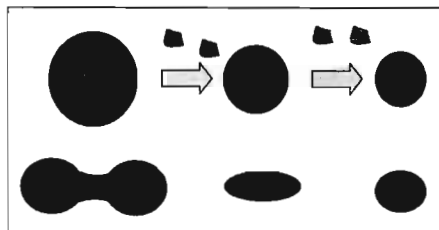
- *Přesný mechanismus zániku červené krvinky není zcela objasněn. Pravděpodobně dochází k odkrytí specifických antigenů, na které se naváží molekuly IgG. To je pak signálem pro makrofágy k destrukci erytrocytu. Erytrocyt, než zanikne uskuteční asi 75 000 oběhů mezi plícemi a tkáněmi. Za den zanikne a zase se obnoví přibližně 1 % z celkového množství erytrocytů.*

ČERVENÁ KRVINKA SE ZMENŠUJE A JEJÍ MEMBRÁNA SE ZTENČUJE. ERYTROCYT DOSTÁVÁ KULOVITÝ (SFÉRIKÝ) TVAR. TAKTO ZMĚNĚNÝ ERYTROCYT SE OBTÍŽNĚ POHYBUJE V KAPILÁRNÍM ŘEČIŠTI, ZACHYCUJE SE ZEJMÉNA VE SLEZINĚ A JE FAGOCYTOVÁN – ERYTROCYT ZANIKÁ.

Předčasný zánik červené krvinky

Je-li erytrocyt nějakým způsobem vnitřně pozměněn (změna struktury erytrocytu či hemoglobinu, metabolismus) nebo ovlivněn vnějším prostředím, dochází k jeho předčasnému zániku. Zániku červené krvinky a jejímu pohlcení makrofágy může předcházet i opakované působení některých negativních vlivů na červené krvinky.

Důsledkem těchto vlivů může být **ztráta části erytrocytové membrány (fragmentace)**, bez ztráty hemoglobinu. Po každé další fragmentaci se erytrocyty stávají kulatějšími - vzrůstá jejich **rigidita**. Rigidní krvinky nejsou schopny procházet určitými místy mikrocirkulace (kapiláry kostní dřene, sleziny). V těchto místech jsou předčasně zadrženy a posléze fagocytovány.



Postupná fragmentace erytrocytu

Většina erytrocytů zaniká extravaskulárně. Při intravaskulárním zániku se erytrocyt rozpadá a uvolňuje hemoglobin do okolního prostředí – dochází k **hemolýze**. Hemoglobin uvolněný z červených krvinek se rozpouští v plazmě a barví ji červeně – volný hemoglobin. V organismu může vzniknout **anémie**, pokud krvetvorba nestačí nahrazovat ztrátu červených krvinek.

- Za **normálních podmínek hemolýza nenastává**, **metabolicky aktivní erytrocyt udržuje osmotickou rovnováhu mezi vnějším a vnitřním buněčným prostředím**.
- **In vitro vyvoláme hemolýzu** zvýšením teploty, hypotonickými roztoky, saponinem a řadou dalších chemických látek.

Testy ke zjištění hemolýzy

- ☐ **přirozené podmínky**
 - **volný hemoglobin**
- ☐ **uměle vytvořené podmínky**
 - přidání glukosy: **autohemolýza**
 - mechanické namáhání: **mechanická rezistence erytrocytů**
 - koncentrační gradient (NaCl): **osmotická rezistence erytrocytů**
- **Dříve používaný Pink test na průkaz sférocytozy se dnes nedoporučuje používat pro jeho nízkou specifitu.**

Testy na PNH

Dříve se používaly k průkazu PNH některé testy, u kterých se vyvolala hemolýza krvinek a hodnotil se stupeň hemolýzy proti slepému vzorku:

- ☐ **Hamův test (Ham a Dingle, 1939)**
- ☐ **Dacieho test (Dacie a spol., 1960)**

- ☐ **Crosbyho test (Crosby, 1950)**
- ☐ **Hartmannův test (Hartmann a Jenkins, 1966)**
- ☐ **CLS test (complement lysis sensitivity test) (Resse a Dacie, 1966)**

V současné době se k průkazu PNH používá **průtokové cytometrie**. Zjišťuje se přítomnost anti-CD59 u erytrocytů nebo anti-CD59 či anti-CD55 u neutrofilů.

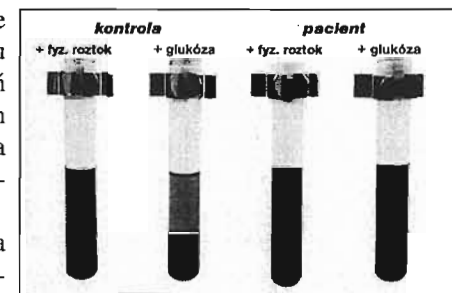
VOLNÝ HEMOGLOBIN

- **Princip stanovení:** volný hemoglobin se stanoví fotometricky po oxidaci hemoglobinu roztokem s obsahem ferikyanidu draselného. Dochází k oxidaci hemoglobinu na methemoglobin, který se kyanidem draselným převede na barevný komplex hemiglobinkyanidu.
- **Fyziologické hodnoty:** 20–50 mg/l
- **Klinická interpretace:** Plazmatický neboli volný hemoglobin bývá zvýšený u hemolytických anémií, nejvýrazněji u intravaskulárních hemolýz (mikrocytární anémie, PNH, paroxysmální chladové hemoglobinurie a v přítomnosti chladových protilátek).

- **Zvýšená hladina plazmatického hemoglobinu bývá spolehlivou známkou intravaskulární hemolýzy.**

TEST AUTOHEMOLÝZY

- **Princip stanovení:** krev se inkubuje ve dvou roztocích s glukosou a s fyziologickým roztokem. Stupeň hemolýzy se stanoví v obou roztocích spektrofotometricky. Vyšší hemolýza je vždy tam, kde je fyziologický roztok (Selwyn a Dacie, 1954).
- **Klinická interpretace:** Autohemolýza bývá zvýšena u hereditární sférocytozy, PNH, při deficitu G-6-PD a pyruvátkinázy a dále u některých dalších hemolytických anémií.



Test autohemolýzy (kontrola a pacient)

- **V případě poruchy glykolytických enzymů je autohemolýza ve fyziologickém roztoku zvýšena, ale v prostředí s glukosou se nesnižuje.**

OSMOTICKÁ REZISTENCE ERYTROCYTŮ

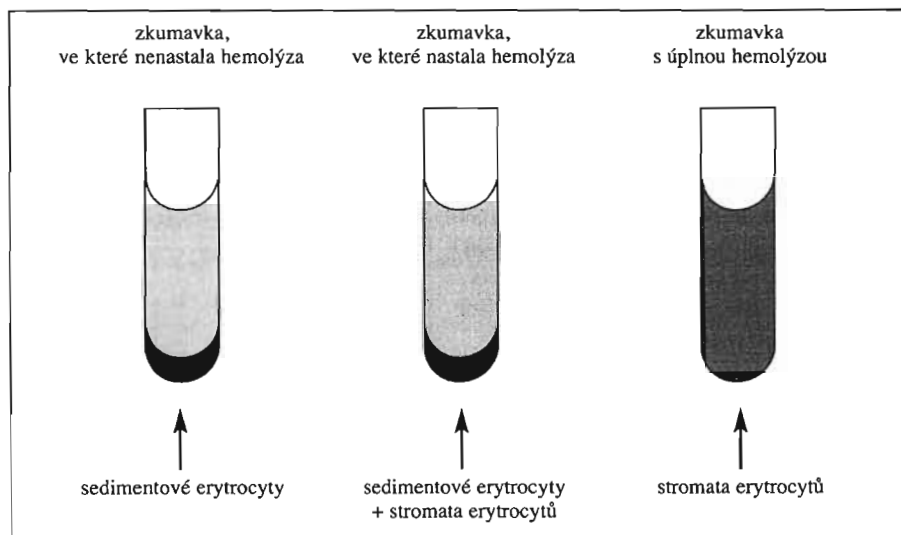
- **Princip stanovení:** zjišťuje se odolnost membrány erytrocytů k hypotonickému roztoku NaCl. Erytrocyt v hypotonickém roztoku přibírá do sebe vodu, jeho tvar se zakulacuje až při určitém objemu zadržené vody dojde k protržení membrány

erytrocytu a vyplavení jeho obsahu – **k hemolýze**. Faktorem, který udává míru schopnosti membrány erytrocytů vůči hypotonickým roztokům je tvar erytrocytu, který je závislý na soudružnosti a funkčnosti membrány a cytoskeletárního systému. Určitou úlohu zde hraje i objem a povrch erytrocytu, pH a teplota hypotonického roztoku (Parpart a spol., 1947).

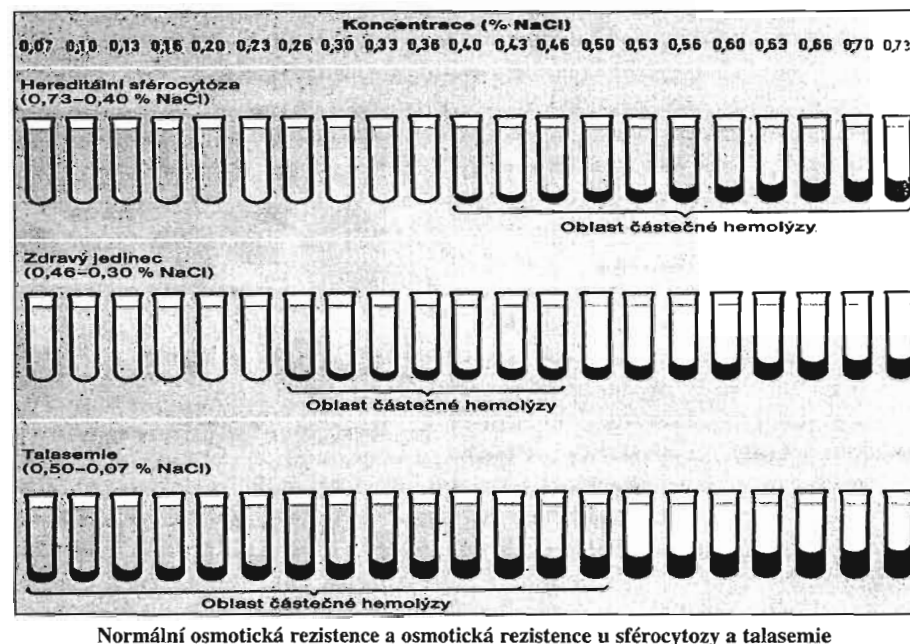
- Pokud jsou erytrocyty vystaveny koncentraci fyziologického roztoku (8,5 g NaCl/l) netvoří se koncentrační gradient mezi vnějším a vnitřním prostředím buňky a do erytrocytu nepřechází, ani z něho neuniká žádná voda. Při snížení této koncentrace dochází vlivem koncentračního gradientu k průniku vody do buňky a tím k vytvoření tlaku na membránu erytrocytu (Pecka, 2002).

Za normálních okolností jsou erytrocyty odolné i vůči hypotonickému roztoku až do koncentrace 0,44 %–0,42 %. Hodnotí se hemolýza erytrocytů v jednotlivých zkumavkách (zůstávají-li ve zkumavce sedimentované erytrocyty není hemolýza úplná).

OSMOTICKÁ REZISTENCE ERYTROCYTU



- **Fyziologické hodnoty:**
 - 0,44–0,42 %: hemolyzují jen nejméně odolné erytrocyty – **minimální osmotická rezistence**
 - 0,32–0,30 %: hemolyzují všechny erytrocyty – **maximální osmotická rezistence**



- **Klinická interpretace:** Snížená osmotická rezistence bývá u **dědičné sférocytózy** a u všech poruch, u kterých se ve zvýšené míře vyskytují sférocyty. Zvýšená se vyskytuje u jaterních onemocnění, srpkovité anémie, u sideropenických anémií, u talasémie, u polycytemie a tam, kde ve zvýšené míře vznikají terčovité erytrocyty. Retikulocyty mají zvýšenou osmotickou rezistenci.

MECHANICKÁ REZISTENCE ERYTROCYTŮ

Zjišťuje se odolnost membrány erytrocytů k mechanickému namáhání (tlak skleněných kuliček na erytrocyty). Množství uvolněného hemoglobinu se měří spektrofotometricky.

- **Klinická interpretace:** změny mechanické rezistence většinou provází změny osmotické rezistence. U **jaterních chorob** mají erytrocyty zvýšenou osmotickou a sníženou mechanickou rezistenci. U **perniciózní anémie** bývá při normální osmotické rezistenci snížená mechanická rezistence.

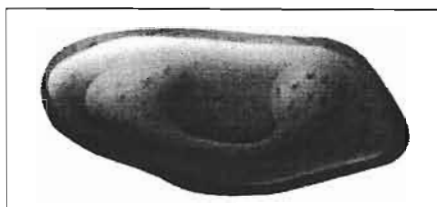
3.2. Fyziologie a funkce bílé krvinky

Bílá krvinka – leukocyt

Bílé krvinky podobně jako ostatní buňky krevetvorby pochází z tkáně mezenchymu a zúčastňují se obranných reakcí organismu. Jsou to bezbarvé kulovité buňky, které obsahují jádro.

U bílé krevní složky na rozdíl od červené rozlišujeme několik druhů, morfologicky, funkčně a svým původem mnohdy vzdálených a značně odlišných konečných stadií krvinek. Za normálních podmínek nacházíme v obvodové krvi tyto krvinky:

- ☐ *Neutrofilní tyče a segmenty*
- ☐ *Eozinofilní segmenty*
- ☐ *Bazofilní segmenty*
- ☐ *Monocyty*
- ☐ *Lymfocyty*



Neutrofilní segmenty



Lymfocyt a monocyt



Eozinofil



Bazofil

ROZLIŠENÍ LEUKOCYTŮ

Morfologické hledisko

U morfologického hlediska se přihlíží k přítomnosti, či nepřítomnosti specifických granul v cytoplazmě

- ☐ *granulocyty* – Polymorfonukleáry (neutrofilní, eozinofilní, bazofilní)
- ☐ *agranulocyty* – Mononukleáry (lymfocyty, monocyty, plazmocyty)

Imunologické hledisko

- ☐ *fagocyty* (buňky s fagocytární schopností)
 - mikrofágy (neutrofily, eozinofily)
 - makrofágy (monocyty, histiocyty)

- ☐ *imunocyty*
 - lymfocyty (B- a T-lymfocyty, NK buňky)
 - plazmatické buňky (plazmocyty)

U dospělého člověka tvoří celkové množství bílých krvinek přibližně 1 500 g, z toho jednotlivé orgány obsahují:

- ☐ *kostní dřev* 900 g
- ☐ *tkáň* 600 g
- ☐ *obvodová krev* 10 g

➤ Bílé krvinky mají vysoký obsah vody (80,2 %), dále obsahují bílkoviny, lipidy, minerály a jiné látky.

- ☐ **Zralé neutrofily** – Prežívají v krevním oběhu jen několik hodin a pak přechází do tkání, kde pravděpodobně zanikají.
- ☐ **Zralé eozinofily** – V krevním oběhu prežívají 12–24 hodin a pak přechází do oblastí mimo krevní oběh.
- ☐ **Zralé bazofily** – V krevním oběhu prežívají 4–7 dnů.
- ☐ **Monocyty** – Prežívají v krevním oběhu několik dní, potom přechází do tkání. Některé z nich se opět vrací do oběhu, jiné se natrvalo usazují v tkáních a za určitých okolností se zde i pomnožují. V tkáních se diferencují na specifické tkáňové makrofágy (histiocyty).
- ☐ **Lymfocyty B a T** – Běžná populace lymfocytů prežívá několik dní až týdnů, paměťové buňky prežívají několik let až desetiletí.

Enzymy a ostatní látky v leukocytech

Leukocyty jsou velmi bohaté na enzymy. Počet enzymů v nich obsažený se odhaduje na 50. Pro **cytochemický průkaz** mají význam jen některé z nich:

Neutrofily

- ☐ *Primární granula* (0,5–0,8 μ m) obsahují: myeloperoxidázu, esterázy (necitlivé k NaF), lipidy (barvitelné sudanem B)
- ☐ *Sekundární granula* (0,25–0,4 μ m) obsahují: alkalickou fosfatázu, lysozym

Eozinofily

- ☐ *Eozinofilní granula* obsahují: hlavně myeloperoxidázu a lipidy, neobsahují lysozym, navíc je přítomen histamin a plazminogen

Bazofily

- ☐ *Bazofilní granula* obsahují: histamin a heparin

Monocyty

- ☐ *Obsahují*: esterázy (citlivé na inhibici NaF), myeloperoxidázu (pouze u mladších forem), lysozym

Lymfocyty

- ❑ **Obsahují:** lipidy (asi poloviční obsah než granulocyty) a dále kyselé hydrolázy (fosfatázy)

3.2.1. Cytochemický průkaz látek v krevních buňkách

Průkaz bílých krvinek podle aktivity jejich nitrobuněčných lysozomálních enzymů pomocí cytochemie zavedl Hayhoe v r. 1958 (Hayhoe a Quaglino, 1958).

Cytochemické metody podobně jako histochemické metody používají k průkazu látek **specifických chemických reakcí**, jejichž výsledný produkt je viditelný v optickém nebo elektronovém mikroskopu. Tím lze prokázat přímo v buňce nejen řadu látek základní buněčné stavby, ale i přechodné a konečné produkty metabolismu buňky (depozita látek, aktivitu buněčných enzymů). Cytochemických metod lze využít ke sledování nezralých buněk u akutních myeloidních leukemií, abnormalit ve vyzrávání u MDS a myeloproliferativních syndromů (Dacie a Lewis, 2001).

- Po zavedení imunologického průkazu buněk pomocí membránových znaků je význam cytochemického průkazu dnes menší, než byl před lety. **K rozlišení akutních myeloidních leukemií jsou však cytochemická stanovení ještě stále cenným přínosem.**

Cytochemické barvení se skládá z několika na sebe navazujících dílčích kroků:

- ❑ **zhotovení nátěru** (nesrážlivá a srážlivá krev – heparin)
- ❑ **fixace nátěru** (zakonzervování buněk)
- ❑ **barvení nátěru** (cytochemická reakce, barvení hodnocené složky, dobarvení pozadí kontrastním barvením)
- ❑ **hodnocení nátěru** (hodnotí se většinou semikvantitativně)
- **Fixace buněk musí být šetrná, aby se zachovala jak jemná struktura buňky, tak i aktivita vyšetřované substance. Při fixaci dochází k denaturaci některých proteinů, mění se jejich prostorové uspořádání, optické vlastnosti a dochází ke snížení jejich rozpustnosti.**

Cytochemický průkaz hodnocené složky může probíhat buď **přímo**, kdy cytochemická reakce prokazuje přímo hledanou složku nebo **nepřímo**, kdy hledaná složka (enzym) přeměňuje substrát na produkt a z množství obarveného produktu se usuzuje na aktivitu enzymu (Hayhoe a Quaglino, 1988).

- **Výsledek cytochemického průkazu leukocytů je závislý na specifčnosti reakcí, na čistotě a stabilitě chemikálií a na zkušenostech hodnotícího pracovníka.**

Semikvantitativní hodnocení

- 0 – negativní
- 1 – slabě pozitivní
- 2 – středně pozitivní
- 3 – silně pozitivní
- 4 – velmi silně pozitivní

Hodnocení cytochemických barvení

Typ pozitivity:

- ❑ difúzní
- ❑ difúzní + granulární
- ❑ granulární
- ❑ v blocích
- ❑ fokální (v 1 místě)



U buněk můžeme cytochemicky prokazovat:

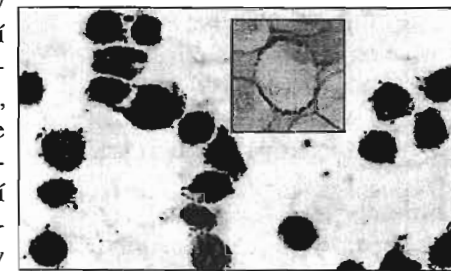
- depozita látek
- místa aktivity enzymů
- místa inhibice některých isoenzymů

DEPOZITA LÁTEK

Barvení na polysacharidy (glykogen)

PAS reakce – (Periodic Acid-Schiff)

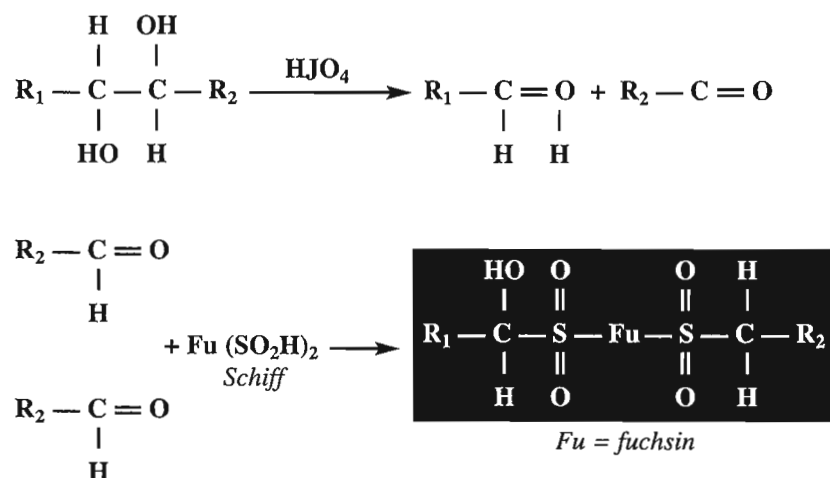
Toto barvení je citlivé na přítomnost monosacharidů, mukoproteinů, glykoproteinů, fosforylovaných cukerných složek a karbohydrátů. V krevních buňkách se barví glykogen (Hotchkiss, 1948). Reakce vykazuje pozitivitu prakticky u všech krevních buněk s výjimkou erytroblastů. Charakteristika barvení a jeho intenzita se mění podle druhu a vývojového stadia buňky. Nachází se všechny typy pozitivity (difúzní, granulární i fokální). Granulocyty vykazují difúzní pozitivitu na všech stupních buněčného vývoje. Eozinofily nevykazují pozitivitu granúl, ale difúzní pozitivitu cytoplazmy. Naopak u lymfocytů se nachází hrubá pozitivní granula, bez difúzního pozadí cytoplazmy (barví se depozita glykogenu). Pozitivita u monocytů je méně výrazná jemně granulární s difúzním pozadím cytoplazmy. Trombocyty jsou výrazně pozitivní, erytroblasty naopak negativní (Dacie a Lewis, 2001).



PAS reakce

➤ *Glykogen slouží jako zdroj energie hlavně pro metabolismus lymfocytů. Je uložen převážně v cytoplazmě mimo buněčné organely. Tvoří asi 1/20 až 1/40 suché váhy lymfocytu.*

- **Princip stanovení:** Působením silného oxidačního činidla (kyseliny jodisté – HJO_4) dochází k oxidaci hydroxylových skupin polysacharidů a k rozevření vazeb mezi uhlíky za vzniku dialdehydu. Aldehydy reagují se Schiffovým činidlem (kyselinou fuchsin-siřičitou). V místech výskytu glykolových skupin vzniká červená stálá sloučenina.



- **Klinické použití:** U CLL a Hodgkinova lymfomu se v lymfocytech nachází zvýšený počet PAS pozitivních granulí. U erytroleukemie a talasemie jsou normoblasty pozitivní. Méně často se zjišťuje PAS pozitivita i u MDS, hemolytických anémií, perniciózní anémie, aplastické anémie a polycytemie.

Barvení na lipidy

Sudanofilní lipidy (neutrální tuky, fosfolipidy, steroidy) jsou přítomny ve vyzrálých neutrofilech a fosfolipidy, resp. fosfolipoproteiny v nezralých primárních azurofilních granulích.

- **Princip stanovení:** Buněčné struktury, které obsahují lipidy vážou nespecificky sudanovou černí B. Myeloidní buňky mají výrazně zabarvená granu-



Barvení sudanovou černí B

la a intenzita zbarvení se zvyšuje s vyzráváním buňky. Monocyty mají slabší jemnou granulární pozitivitu (Shee-han a Storey 1974).

- *Auerovy tyčky jsou dobře barvitelné. Myeloblasty vykazují nevýraznou pozitivitu. Pozitivitu vykazují i nezralé formy buněk Burkittova lymfomu.*
- **Klinické použití:** barvení lze použít k odlišení akutní myeloidní a myelomonocytární leukemie od lymfoblastických forem leukemií.

Barvení jadérek v lymfocytech

- **Princip stanovení:** Při aktivaci lymfocytu dochází v jeho jadérku k transkripci a dále ke hromadění ribonukleové kyseliny (RNK). Tato kyselina je za normálních podmínek v neaktivním stavu. Roztoky bazických barviv (např. toluidinové nebo methylenové modři) specificky barví v kyselém pufovaném prostředí (pH 5,2–5,4) buněčné struktury obsahující RNK, tedy i jadérka (Sme-tana, 1980).
- **Hodnocení:** Při hodnocení se popisují různé tvary jadérek a jejich počet v lymfocytu:
 - **aktivní (plná) jadérka** – přítomná v mladých, imunologicky stimulovaných lymfocytech (do 5 %)
 - **prstenčitá** – přítomná v klidových lymfocytech, které jsou ještě schopny stimulace (85 %)
 - **mikrojadérka** – přítomná v neaktivních, imunologické stimulace neschopných lymfocytech (do 10 %)

Nukleolo-nukleolární koeficient – vyjadřuje počet jadérek ve všech hodnocených lymfocytech dělený počtem hodnocených lymfocytů

Koeficient aktivity RNA – vyjadřuje počet lymfocytů s aktivními jadérky ve všech hodnocených lymfocytech dělený počtem hodnocených lymfocytů

Fyziologické hodnoty:

- nukleolo-nukleolární koeficient 1–1,2
- koeficient aktivity RNK 0–0,1

Průkaz slouží k získání obrazu o reálném stavu lymfocytu a to zejména o jeho schopnosti reagovat na imunologický podnět.

- *Zvýšený počet a abnormální tvary jadérek v lymfocytech ukazují na stavy, kdy je lymfocytární aparát stimulován (mladé lymfocyty při infekcích, orgánové malignity, lymfoblastická leukemie).*

- Diagnosticky význam měl tento test při sledování nemocných s *M. Hodgkin* (aktivace RNK v jádru byla patrná již několik měsíců před relapsem). V dnešní době po zavedení jiných imunologických testů postrádá tento test svůj klinický význam.
- U dětí bývá převaha lymfocytů s plnými jádry, u dospělých přibývá prstenčitých jader. U dětí bývá v jedné buňce jádro více, u dospělých je převaha buněk s 1 jádrem.

Barvení na železo (Perlsonova reakce)

Depozita zásobního železa v podobě feritinu nebo hemosiderinu se mohou nacházet v cytoplazmě erytrocytů a zralějších buněk vývojové řady červené krvinky (siderocyty a sideroblasty) a v některých makrofázích (siderofágy). Tato depozita lze barvit tzv. Perlsonovou reakcí (Grüneberg, 1941).

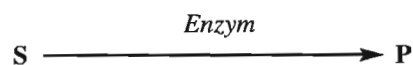
- **Princip stanovení:** Feroxyanid draselný v kyselém prostředí reaguje s Fe^{3+} (zásobní železo) a vytváří tzv. berlínskou (pruskou) modř – feroxyanid železnatoželezitý $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$



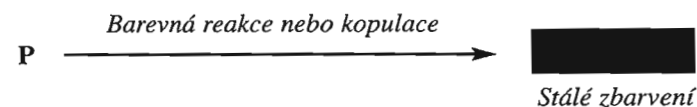
- Při hodnocení se sleduje počet buněk s granulemi zásobního železa, zjišťuje se velikost a počet granul v krevních buňkách červené řady, dále tvorba prstenčitých formací, množství zásobního železa v makrofázích a přítomnost extracelulárního nehemového železa (Fe^{3+}).
- **Klinické použití:** Množství zásobního železa bývá zvýšené u sideroblastické anémie, MDS, některých typů leukemie, hemolytické anémie, megaloblastové anémie, alkoholismu, po splenektomii. Nepřítomnost zásobního železa se nachází u sideropenické anémie.

Místa aktivity enzymů

Při cytochemickém barvení intracelulárních oblastí se prokazují prakticky jen **lysozomální enzymy**, které jsou obsahem primárních nebo sekundárních granul leukocytů. Cytochemický průkaz využívá katalytických schopností enzymů, při kterých dochází k přeměně substrátu (S) na produkt (P):



Při této reakci se vytváří přímo barevná stabilní sloučenina nebo kopulací dochází k vytvoření stabilního azobarviva



- Na rozdíl od předešlých cytochemických průkazů je nutné mít na paměti, že enzymy jsou biologicky aktivní látky, u kterých jejich biologická účinnost s časem klesá. Proto průkaz enzymů provádíme prakticky ihned po dodání vzorků do laboratoře!

FOSFATÁZY

Fosfatázy, přesněji fosfomonoesterázy jsou enzymy, které uvolňují kyselinu ortho-fosforečnou z vazby na alkohol nebo aromatický monoester. Existuje několik isoenzymů, které se rozlišují podle toho při jakém pH vykazují nejvýraznější aktivitu (**alkalická fosfatáza – AF** a **kyselá fosfatáza – KF**). Jednotlivé isoenzymy se liší ve svých vlastnostech. AF na rozdíl od KF jsou výrazněji aktivovány hořečnatými ionty (Mg^{2+}) méně ionty Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , zatímco fluoridy (F^-) inhibují pouze KF, ne AF (Dacie a Lewis, 2001).

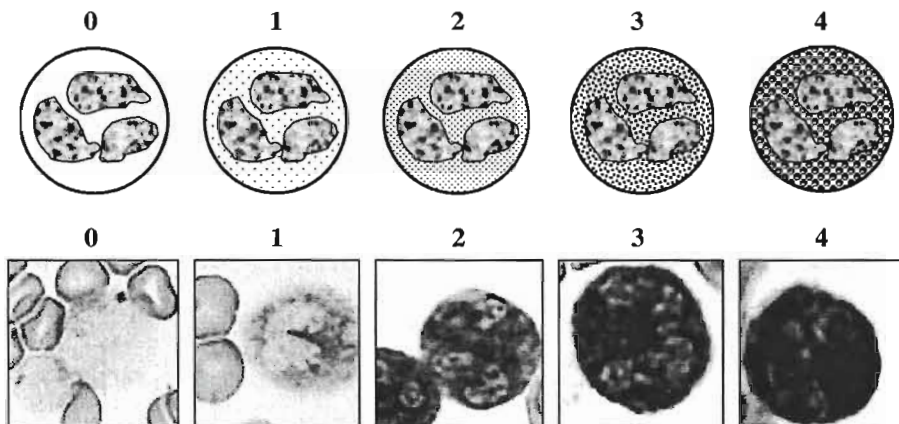
Alkalická fosfatáza (AF)

Alkalická fosfatáza je lysozomální enzym přítomný v sekundárních (specifických) granulích neutrofilů. Aktivitu alkalické fosfatázy vykazují hlavně segmentované neutrofile, jen ojediněle méně zralé formy, z nich nejvíce tyčky. Starší neutrofile, kolující déle v krvi, vykazují vyšší aktivitu AF, než mladší neutrofile (Rosner a Lee, 1965). Ojediněle lze nalézt slabou pozitivitu i v B lymfocytech (Poppema a spol., 1981).

- **Princip stanovení:** Fosfatáza v zásaditém prostředí odštěpuje ze substrátu přidaného do reakce (α -naftolfosfátu) α -naftol. Kopulací α -naftolu a diazoniové soli vzniká v místech enzymové aktivity červená sloučenina nerozpustná ve vodě (Kaplou, 1963).
- **Hodnocení:** Katalytická aktivita enzymu se hodnotí semikvantitativně 0–4 body a vyjadřuje se početním zlomkem (početní zlomek = nalezený počet bodů k celkovému počtu hodnocených neutrofilů):

- 0 – negativní preparát (bez zbarvení)
- 1 – jemná difúzní pozitivita nebo naznačené granule
- 2 – difúzní pozitivita s jemnými granuly
- 3 – výrazná pozitivita s hrubšími granuly
- 4 – velmi výrazná pozitivita s hrubými granuly

SKÓRE ALKALICKÉ FOSFATÁTY



Skóre alkalické fosfatázy – výpočet:

$$\text{Skóre AF} = \frac{(a \cdot 0) + (b \cdot 1) + (c \cdot 2) + (d \cdot 3) + (f \cdot 4)}{a + b + c + d + f}$$

a, b, c, d, f – jsou počty neutrofilů se zjištěnou pozitivitou (0–4).
Hodnocení se většinou provádí ve 100 neutrofilech.

- **Příklad:** Při hodnocení AF bylo zjištěno 30 buněk s pozitivitou 0; 12 buněk s pozitivitou 1; 22 buněk s pozitivitou 2; 27 buněk s pozitivitou 3; 9 buněk s pozitivitou 4.

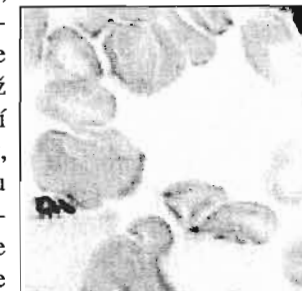
$$\text{Skóre AF} = \frac{30 \times 0 + 12 \times 1 + 22 \times 2 + 27 \times 3 + 9 \times 4}{30 + 12 + 22 + 27 + 9} = \frac{173}{100} = 1,73$$

- **Klinické použití:** Zvýšení aktivity enzymu je pozorováno v těhotenství, při stresu, u infekcí s neutrofilii a po podání kortikoidů. S vyšší aktivitou AF se můžeme setkat i u aplastické anémie, MDS a u některých lymfo- a myeloproliferativních onemocnění (polycytemia vera, myelofibróza, mnohočetný myelom, aktivní stadium M. Hodgkin). Snížené hodnoty se nachází u CML (lze tak odlišit CML od leukomoidní reakce, u které je hodnota AF zvýšena), při infekční mononukleóze, u PNH a u některých anémií (sferocytární a sideroblastická).
- Ukazuje se, že AF podobně jako ostatní nitrobuněčné enzymy odráží metabolickou buněčnou aktivitu. Zjistilo se, že enzymatická aktivita je kontrolována genem

na chromozomu 21. Tím se vysvětluje spojitost mezi poklesem AF a abnormitami tohoto chromozomu.

Kyselá fosfatáza (KF)

Do skupiny kyselých fosfatáz se zahrnují isoenzymy přítomné v sekundárních granulích neutrofilů, monocytů, lymfocytů, plazmatických buňkách a trombocytech. Vzhledem k tomu, že se tyto isoenzymy nachází u většiny buněk je jejich význam pro průkaz jednotlivých typů buněk omezený. Lze je frakcionovat na 7 isoenzymů. Největší význam má stanovení **isoenzymu 5**, který se nachází ve zvýšené míře u vlasatobuněčné leukemie a u akutní lymfatické leukemie. **Isoenzym 3** se nachází převážně u myelomu (pozitivita je patrná až u 90 % myelomových buněk). Vlasaté buňky vykazují výraznou difúzní i granulární aktivitu kyselé fosfatázy, která se u většiny buněk snižuje po přidání vinanu sodného. U ostatních lymfocytů vykazujících granulární aktivitu KF dochází v přítomnosti vinanu sodného ke snížení aktivity enzymu. Barvicí techniky se liší podle použitého azobarviva (Li a spol., 1970).



Kyselá fosfatáza

- **Princip stanovení:** Některé isoenzymy fosfatáz v kyselém prostředí odštěpují ze substrátu přidaného do reakce (naftol AS BI fosfát) α -naftol. Kopulací α -naftolu a diazoniové soli vzniká v místech enzymové aktivity červená sloučenina nerozpustná ve vodě (Goldberg a Barka, 1962).
- Nejčastěji se jako diazoniové soli používá pararosanilinu.

ESTERÁZY

Esterázy jsou velmi rozšířenou skupinou lysozomálních enzymů **přítomných v endoplazmatickém retikulu**. Tyto enzymy **hydrolyzují estery nižších mastných kyselin** jak alifatických, tak aromatických. Jsou spojovány s azurofilními (nespecifickými) granulemi. Granulocyty, monocyty a tkáňové buňky obsahují ve svých granulích esterázy, které se poněkud liší svou specificitou k substrátu. Dnes je popsáno **9 isoenzymů esteráz**. Takzvané „**specifické**“ esterázy obsahují isoenzymy 1, 2, 7, 8 a 9. Isoenzymy 3, 4, 5 a 6 reprezentují takzvané „**nespecifické**“ esterázy, které jsou citlivé k NaF. Výrazná aktivita těchto enzymů se projevuje zejména v monocytů, megakaryocytech a krevních destičkách (Li a spol., 1973).

Specifické esterázy

Ke specifickým esterázám se řadí chloracetátsteráza (CHAE), která se nachází v granulocytech. Jako substrát je používán naftol AS-D chloracetát. Buňky myeloidní řady mají výraznou pozitivitu, většinou se barví i myeloblasty. Slabá poziti-

vita se může nalézt i u monocytů a bazofilů. Červené krvinky, lymfocyty, plamocyty a megakaryocyty se nebarví.

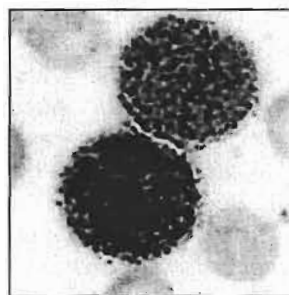
➤ *Normální myeloblasty na rozdíl od leukemických myeloblastů vykazují výraznější pozitivitu. Pozitivní reakci dávají rovněž Auerovy tyčky.*

- **Princip stanovení:** Chloracetátesteráza hydrolyticky štěpí substrát naftol AS-D chloracetát na naftol, který kopulací s diazoniovou solí Fast Blue BB poskytuje v místech výskytu enzymu modrou ve vodě nerozpustnou sloučeninu.

Nespecifické esterázy (NE)

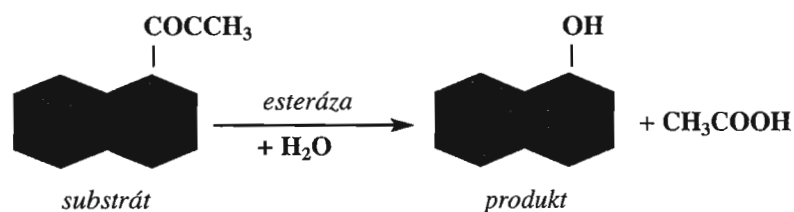
Jako substráty se u těchto stanovení používají α -naftyl estery (acetát nebo butyrát).

- **Princip stanovení:** Isoenzymy nespecifických esteráz v zásaditém prostředí hydrolyticky odštěpují ze substrátu přidaného do reakce (α -naftylacetát) α -naftol, který kopuluje s diazoniovou solí na černou sloučeninu nerozpustnou ve vodě.

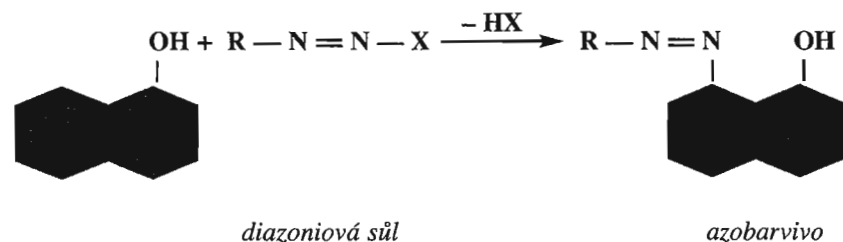


Nespecifická esteráza

PŘEMĚNA SUBSTRÁTU NA PRODUKT



KOPULACE



- **Klinické použití:** cytochemického průkazu lze využít k přesnějšímu zařazení akutních leukemií (k rozlišení M4 a M5 typů akutních myeloidních leukemií – FAB klasifikace). Výrazněji vyšší aktivitu nespecifické esterázy vykazují isoenzymy přítomné v monocitech, kdežto isoenzymy přítomné v neutrofilní linii mají aktivitu nižší. Isoenzymy přítomné v monocitech jsou navíc inhibovány fluoridem sodným. Leukemické buňky ALL vykazují velmi slabou granulární pozitivitu isoenzymů nespecifických esteráz, která není blokovatelná NaF. Podobně i erytroblasty u erytroleukemie vykazují slabou pozitivitu nespecifické esterázy.

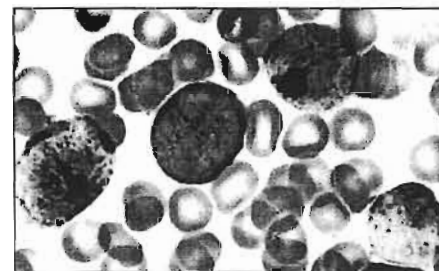
PEROXIDÁZY

Peroxidázy jsou enzymy, které mají ve své molekule zabudovanou **strukturu hemu**. Využívají se k **průkazu buněk granulocytární řady**. Na rozdíl od ostatních nespecifických peroxidáz se enzym přítomný v granulích buněk myeloidní řady nazývá **myeloperoxidáza**.

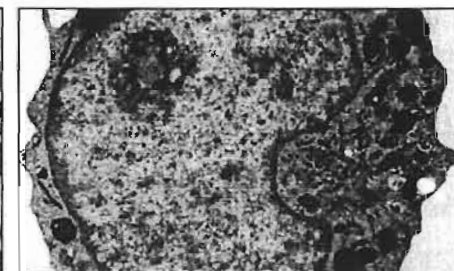
Myeloperoxidáza (MPO)

Myeloperoxidáza je lysozomální enzym **přítomný v primárních (azurofilních) granulích neutrofilů a monocytů**, nenachází se v buňkách červené řady a v lymfocytech. Specifická granula myeloperoxidázu neobsahují. Množství peroxidázy se zvyšuje s postupným vyzríváním buněk (nejvyšší aktivita je ve vyzrálých neutrofilech). V monocitech bývá přítomna jemná granulární pozitivita (Elias, 1980).

➤ *Auerovy tyčky se barví MPO pozitivně. Blastické formy bez granulace mohou poskytovat rovnoměrnou pozitivitu v celé části cytoplazmy.*

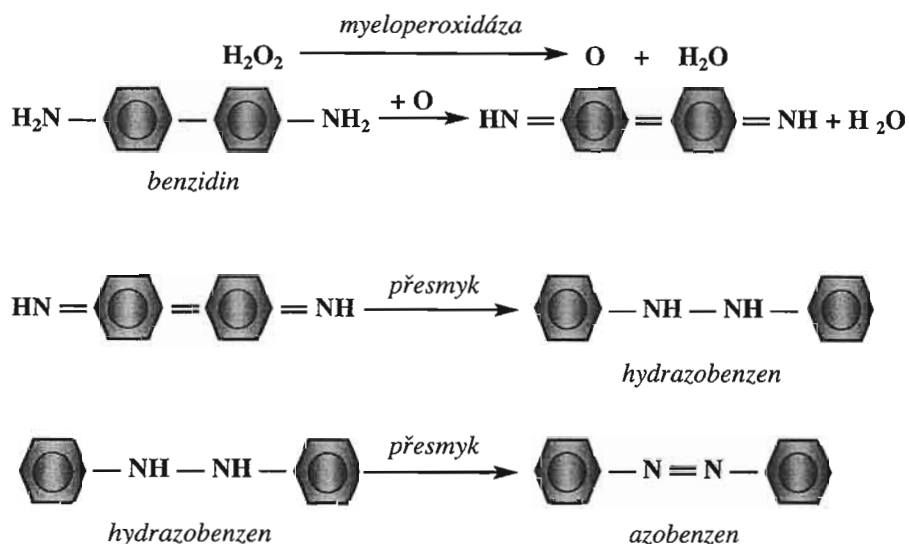


Myeloperoxidáza v leukemických buňkách – periferní krev



Myeloperoxidáza – el. snímek (černé granule v cytoplasmě)

- **Princip stanovení:** Peroxidázy obsažené v granulocytech katalyzují reakci při které se z peroxidu vodíku (H_2O_2) uvolní kyslík. Kyslík oxiduje některé složky za vzniku barevné komponenty (např. benzidin se oxiduje na azobenzen).



➤ K průkazu enzymu je možné použít řadu substrátů (benzidin, benzidin dichlorid, diaminobenzidin, o-tolidin, 4 chloro-1-naphtol atd.). V současné době se upřednostňují látky, které nemají karcinogenní účinek (Dacie a Lewis, 2001).

- **Klinické použití:** barvením lze odlišit myeloblastickou a monoblastickou formu AML od lymfoblastických leukemií. Aktivita MPO bývá snížena v neutrofilech u infekcí, myeloidních leukemií a MDS.

β-glukuronidáza

β-glukuronidáza je lysozomální enzym přítomný v primárních granulích leukocytů. Řadí se mezi kyselé hydrolázy.

- **Princip stanovení:** enzym katalyzuje přeměnu naftol AS-BI β-glukuronidu na naftol AS-BI a β-glukuronid. Naftol AS-BI kopulací s diazoniovou solí tvoří barevnou nerozpustnou sloučeninu lokalizovanou nitrobeničně v místech aktivity enzymu.
- **Klinické použití:** jde o enzym málo cytochemicky prozkoumaný. Rozdíly v jednotlivých buněčných liniích jsou málo charakteristické. Využívá se dnes již méně, dříve se používal hlavně při studiu různých lymfoproliferativních stavů bez využití pro diagnostiku.

➤ V minulosti se zdálo, že tento enzym by mohl být nápomocen při průkazu T-lymfocytů. Dnes vzhledem k nízké specifitě enzymu pro T-lymfocyty se tohoto průkazu nevyužívá.

INHIBICE NĚKTERÝCH ISOENZYMŮ

Většina buněčných enzymů prokazovaných cytochemickými reakcemi nejsou izolované produkty, ale jsou to epitopy několika isoenzymů. Zastoupení isoenzymů je v jednotlivých buněčných typech rozdílné. Některé isoenzymy jsou resistantní (necitlivé) k přítomnosti specifického inhibitoru. Podle citlivosti těchto isoenzymů k inhibitorům, lze pak usuzovat na charakter buňky.

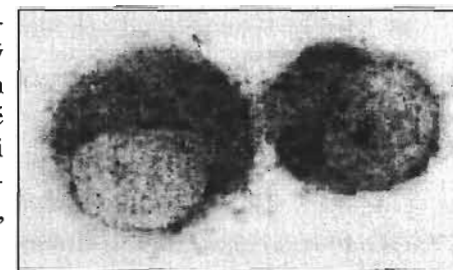
Inhibice nespecifické esterázy NaF

- **Princip stanovení:** Barvení na přítomnost isoenzymů nespecifických esteráz se provádí ve dvou různých prostředích s a bez přidání fluoridu sodného (NaF). Zjišťuje se přítomnost isoenzymu resistantního k NaF. Reakce v monocytech se oslabí, v granulocytech zůstává stejně intenzivní.

	monocyty	granulocyty
NE bez NaF	+++	+
NE s NaF	+	+

Tartarát resistantní kyselá fosfatáza

U vlasatobuněčné leukemie je přítomen isoenzym 5 kyselá fosfatázy, který je resistantní na inhibici L (+) vinanem (Yam a spol., 1971). Isoenzymy kyselá fosfatázy částečně resistantní na inhibici L (+) vinanem se vyskytují i u jiných stavů (infekční mononukleóza, CLL, u některých nehojinských lymfomů).



Průkaz kyselá fosfatázy u HCL

- **Princip stanovení:** Barvení na přítomnost isoenzymů kyselých fosfatáz se provádí ve dvou různých prostředích s vinanem sodným a bez přidání vinanu sodného. Zjišťuje se přítomnost isoenzymu resistantního k vinanu. Vinan sodný (tartarát) snižuje aktivitu kyselá fosfatázy v lymfocytech a lymfoblastech, ale nesnižuje aktivitu enzymu přítomného u leukemických buněk vlasatobuněčné leukemie (Hairy cell leukaemia).

NÁLEZY U AKUTNÍCH LEUKEMIÍ

a) Cytochemické rozlišení málo diferencovaných buněk

Typ buňky	PAS	Sudan B	MPO	NE
LYMFOBLAST	+	–	–	D
MYELOBLAST	–	+	+	*
MONOBLAST	–	*	*	+

b) Cytochemické rozlišení AML M1–M5 (FAB 1976)

Typ buňky	PAS	Sudan B	MPO	NE	NE s NAF
AML – M 1	–	+	*	D	D
AML – M 2	–	+	*	D	D
AML – M 3	–	*	+	D	D
AML – M 4	–	*	*	+	+
AML – M 5	–	*	+	+	D

+ vysoká pozitivita * nízká pozitivita
D difúzní rozptyl – negativní nález

3.2.2. Nespecifická a specifická buňkami zprostředkovaná imunita

Struktura a funkce organismu je neustále narušována vnějšími a vnitřními vlivy, proto hlavní úlohou bílých krvinek je ochrana organismu před cizorodými látkami, které:

- ☐ **vstupují do organismu zvenčí**
 - ve formě choroboplodných zárodků (bakterie, viry, plísňe, paraziti)
 - v podobě jiných látek (prach, potraviny, léky, očkovací látky aj).
- ☐ **vznikají přímo v organismu:**
 - při procesech látkové přeměny
 - při rozpadu tkání
 - při transplantacích

Zneškodňování látek probíhá dvěma způsoby:

- ◆ **fagocytozou** – tj. pohlcováním a rozkládáním pohlcených částic. Zúčastňují se zejména granulocyty (neutrofily a eozinofily), monocyty a makrofágy
- ◆ **imunitní odpověď:**
 - tvorba protilátek (B-lymfocyty, plazmocyty)
 - přímým působením krevních buněk na cizí buňky nebo částice, přičemž se tyto buňky usmrtí nebo rozloží (T-lymfocyty, NK buňky)

Mechanismy se často kombinují – usmrcení, fagocytoza, rozložení a zánět.

SCHOPNOST ROZPOZNÁVAT VLASTNÍ STRUKTURY „SEBEPOZNÁNÍ“ A NÁSLEDNĚ JE TOLEROVAT SE VYVÍJÍ JIŽ V EMBRYONÁLNÍ FÁZI. IMUNOKOMPETENTNÍ BUŇKY REAGUJÍCÍ S VLASTNÍMI STRUKTURAMI (AUTOANTIGENY) JSOU ELIMINOVÁNY PROCESEM PROGRAMOVANÉ SMRTI (APOPTÓZY).
HLAVNÍM CÍLEM IMUNITNÍHO APARÁTU JAKO KOMPLEXNÍHO HOMEOSTATICKÉHO SYSTÉMU JE UDRŽOVAT IDENTITU A INTEGRIU ORGANIZMU BĚHEM CELÉHO VÝVOJE JEDINCE.

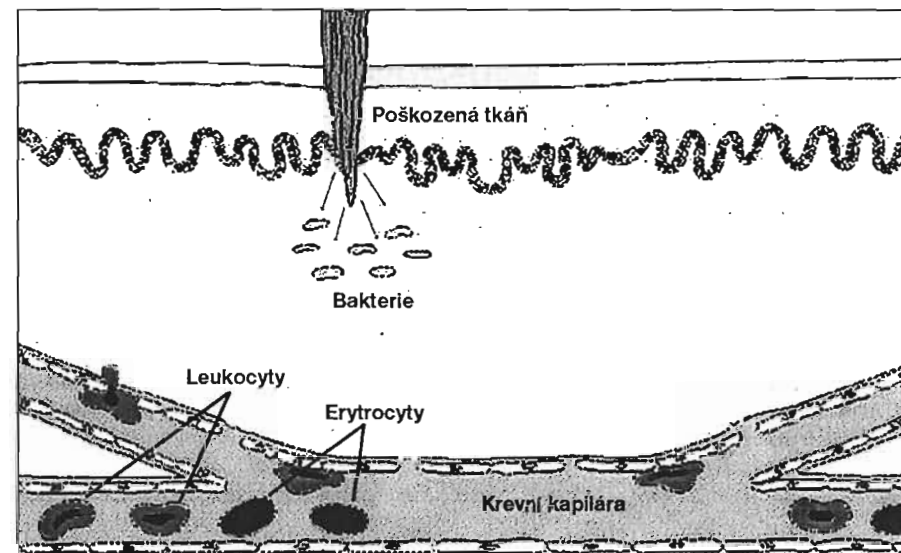
- Všichni mnohobuněční tvorové mají systém zajišťující jejich obranu proti invazi cizích organismů. Dokonce i houba zničit tkáňový štěp, přenesený na ni z jiné, nepříbuzné houby. Vrozený imunitní systém se poprvé objevil přibližně před 400–600 miliony let v průběhu vývoje obratlovců a pokročilejší systém s definovatelnými T- a B-lymfocyty se vyvinul u společného předchůdce savců a ptáků asi před 200–300 miliony let.

Imunitou nazýváme schopnost organismu bránit se proti:

- ☐ infekčním zárodkům
- ☐ cizím nebo organismu odcizeným buňkám (buňky transplantované od geneticky odlišného jedince a buňky vlastní – nádorové pozměněné nebo napadené viry)

Imunitní systém reaguje na přítomnost cizorodých látek procesem, který nazýváme **zánět**. Zánětová reakce může být **místní** (místo průniku patogenu je ohraničeno) nebo **systémová**. Je-li zánětová reakce fyziologická pak na konci procesu je eliminace cizorodého agens. Při nedostatečné imunitní reakci vzniká **chronický zánět**, který má charakter poškozujícího procesu (orgánové poškození). Průnik velkého množství antigenů nebo silně imunogenních podnětů vyvolá akutní poškozující systémovou reakci charakteru SIRS (systémová zánětová reakce), provázenou uvolněním velkého množství zánětových cytokinů, hemodynamickými a metabolickými změnami, končícími nevratným rozvrtem vnitřního prostředí – smrtí.

NAPADENÍ ORGANIZMU PATOGENY



Imunitní systém můžeme rozdělit na dva velké, vzájemně spolupracující systémy:

- ❑ **antigenně nespecifické** (imunita přirozená, vrozená) – zajišťují ji neutrofily, makrofágy, dendritické buňky, komplement, lysozym a další.
- ❑ **antigenně specifické** (imunita získaná, adaptivní) – zajišťují ji různé typy T-lymfocytů a protilátky produkované B-lymfocyty. Specifické složky jsou odpovědné za vznik imunitní paměti.

Nespecifická imunita

(Vrozený imunitní systém)

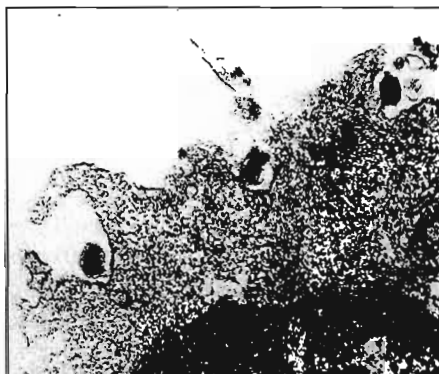
Vrozený systém sestává z fagocytujících buněk, které využívají různých receptorů a struktur k rozpoznání, pohlcení a zničení proniklých patogenů. U savců sestává vrozený imunitní systém z polymorfonukleárních, monocytů, makrofágů a dendritických buněk. Významnou úlohu zde mají zejména neutrofily. Pro schopnost fagocytozy, amébovitý tvar a rychlou mobilizovatelnost jsou schopny vychytávat cizorodé látky, odstraňovat je a odbourávat. Proto při granulocytopenii vznikají poruchy nespecifické imunity a obrany proti infekcím, které se projevují převážně bakteriálními záněty. Makrofágy a dendritické buňky předkládají fragmentované částice T- a B-lymfocytům.

Nespecifická imunita může být:

- ❑ **humorální:** (z řečtiny: *humor* = *tekutý*). Uplatňují se při ní látky, které se zúčastňují složitých imunitních pochodů (komplement, některé cytokíny, enzymy).
 - ❑ **buněčná:** využívá fagocytozy (neutrofily, monocyty, makrofágy, eozinofily)
- *Protilátková imunita (humorální) se uplatňuje zejména v obraně proti bakteriím a parazitům, buněčná nás ochrání především proti virovým a plísňovým onemocněním.*

Fagocytoza

Fagocytoza je pohlcování buněk nebo částic fagocytujícími buňkami – **fagocyty**. Fagocytující buňky představují základní obranný systém proti infekci. Mají na povrchu molekuly, které rozeznávají struktury přítomné na cizorodých buňkách. Navíc mají receptory, které umožňují rozeznávat částice s navázanými protilátkami.



Pohlčení infekčního agens makrofágem

Fagocyty rozdělujeme do 2 velkých skupin:

- ❑ **Neutrofily a eozinofily** – první obranná linie proti infekci
- ❑ **monocyty s makrofágy** – zajišťují definitivní odstranění mikroorganismů a předkládání fragmentovaných částic buňkám specifické imunitní odpovědi (T- a B-lymfocyty)

Jak neutrofily a eozinofily, tak i monocyty mají schopnost **chemotaxe** (shlukování a nahromadění se v místech mikrobiální invaze, nebo tkáňového zánětu). Aby fagocytoza mohla proběhnout je k tomu nezbytná řada přípravných pochodů, které:

- umožní přiblížení cizorodé částice k fagocytující buňce – **adherence**
- ulehčují fagocytozu – **opsonizace**

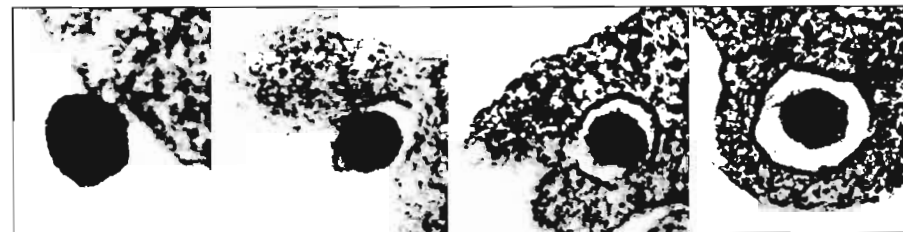
Po opsonizaci fagocytující buňka pohltí částici, uzavře ji do vakuoly opatřené membránou, do které je vypuštěn obsah granulí bohatý na trávicí enzymy (hydrolázy) – dojde k zabití a natrávení mikroorganismu.

➤ *Opsoniny jsou látky, které mají schopnost se jedním koncem své molekuly vázat na povrch bakterií, krevních buněk nebo jiných částic a druhým koncem na receptory na povrchu fagocytů. Tímto navázáním se usnadní vzájemný kontakt, který je potřebný pro uskutečnění fagocytozy. Opsoniny se nachází zejména v krevním séru a řadí se k nim:*

- *protilátky (působí prostřednictvím Fc receptorů)*
- *fragmenty složek komplementu C3b a iC3b (působí prostřednictvím CRI a CR3)*
- *protein vázající manózu a jiné lektiny*

Nejdůležitější složky jsou protilátky a fragmenty komplementu.

PRŮBĚH FAGOCYTOZY



➤ *Fagocytoza je spojena s činností mikrosomálního oxidázového komplexu (NADPH). Při fagocytoze prokazatelně stoupá příjem kyslíku buňkou.*

Pozitivní (negativní) taxy

Taxe je pohyb určitým směrem vyvolaný různými podněty (dotykovými, chemickými, elektrickými a j.). **Chemotaxe** je buněčný pohyb řízený chemickými sti-

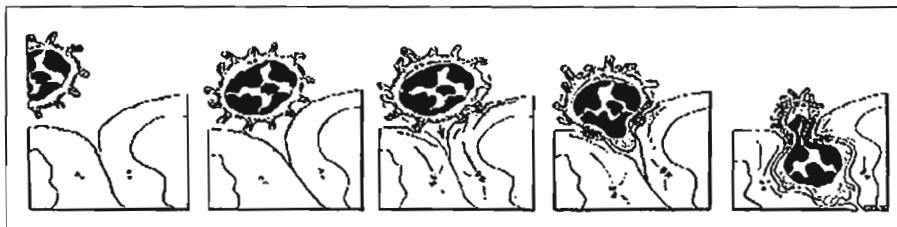
muly. Je zprostředkována některými kontraktilními bílkovinami neutrofilů (jsou podobné aktinu, myosinu a tubulinu).

- *Chemotaxi vyvolávají hlavně některé složky komplementu a složky fibrinolytického a koagulačního systému. Chemotaktické látky působí na fosfolipidovou strukturu buněčné membrány a je pravděpodobné, že snižují negativní náboj povrchu granulocyty.*

Schopnost taxie mají zralé formy **neutrofilních a eozinofilních granulocytů**, slabě je naznačena u **monocytů**. Tyto buňky reagují na podněty, které vycházejí:

- ☐ přímo z cizí buňky nebo částice
- ☐ z jejího okolí
- ☐ z imunologicky aktivních buněk v jejím okolí (např. z lymfocytů)

Při pohybu vytváří fagocyty buňka laločnaté výběžky cytoplazmy, do kterých se tato přelévá a to nejprve část bez granul, poté část s granulemi a nakonec se přemísť i jádro buňky.



- *Průměrná rychlost pohybu při chemotaxi leukocyty je 40 μm za minutu. Neutrofilní granulocyty se pohybují rychleji než eozinofilní a než monocyty. Pohyb urychluje zvýšená teplota a snížení pH.*

Monocyto-makrofágový systém (MFS)

Funkce MFS

- ☐ **ochrana** proti mikroorganizmům
- ☐ **odstraňování** starých a poškozených buněk případně jiných materiálů včetně anorganických
- ☐ **regulace** hematopoézy (produkce růstových faktorů)
- ☐ **úloha** při imunitních reakcích (aktivují proliferaci T a B lymfocytů)
- ☐ **ochrana** proti vzniku nádoru
- ☐ **syntéza** biologicky aktivních látek

Tkáňové makrofágy

Zralé monocyty mohou přecházet z cirkulující krve do tkání. Po fagocytóze sé-

rových bílkovin nebo cizorodého materiálu se zvětšují a mění se v aktivní formy fagocytů. Různé formy makrofágů vznikají z monocytů a případně i histiocytů a nediferencovaných mezenchymových buněk. Během přeměny monocytů na tkáňové makrofágy ztrácí monocyt myeloperoksidázovou aktivitu.

Makrofágy mohou však získat myeloperoksidázovou aktivitu:

- pinocytozou z vnějšího prostředí
- pohlcením neutrofilů

Tkáňové makrofágy představují **druhou obrannou linii** proti různým replikujícím se agens, včetně patogenních mikroorganizmů. Mimo to patří mezi důležité K-buňky (Killer cells) a mechanismem buňkami zprostředkované imunity a na protilátkách závislé cytotoxicity jsou schopné extracelulárně usmrcovat nebo poškozovat terčové buňky a tkáně. Jako buňky schopné prezentovat antigen se mohou zúčastnit i na iniciaci aktivace T-buněk. Makrofágy jsou též výkonné a regulační buňky zánětové reakce. Aby mohly plnit všechny tyto funkce produkují více než 100 různých látek.

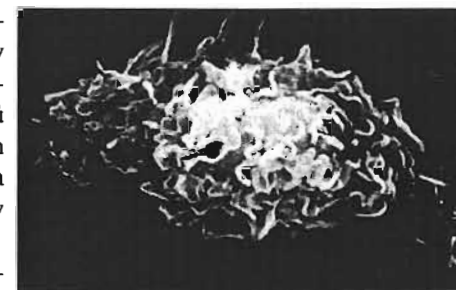
Makrofágy využívají při svých reakcích reaktivní mediátory dusíku. Počet tkáňových makrofágů mnohonásobně převyšuje množství kolujících monocytů a jejich největší množství je v lymfatických uzlinách, slezině, plicích a játrech. Makrofágy neopouštějí tkáň a mohou být v jednotlivých orgánech specializovány na určité funkce. Představují velmi heterogenní populaci buněk, které se vzájemně liší svým vývojem, funkční aktivitou a anatomickou lokalizací. Makrofágy v závislosti na lokalizaci v těle a na jejich funkčních požadavcích mohou žít dny, týdny, měsíce a i roky. Rozdělují se na makrofágy:

- ☐ **normální**
- ☐ **zánětlivé**

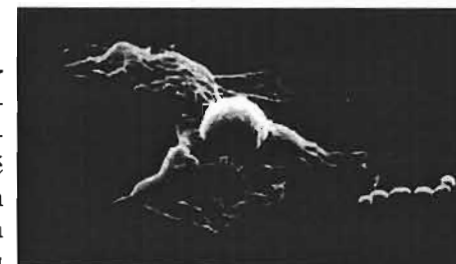
Normální tkáňové makrofágy

Podle uložení v orgánech rozlišujeme:

- **makrofágy plicní (alveolární)** – pohlcují a zadržují prachové částice
- **makrofágy jaterní (Kupfferovy buňky)** – pohlcují nadbytek Fe, žlučových barviv a odstraňují i jiné látky a buněčné fragmenty
- **makrofágy sleziny** – pohlcují rozpadající se erythrocyty a oxidují je



Makrofág – rastrovací el. snímek



Interakce mezi makrofágem (šedý) a lymfocitem (růžový), vede k potlačení infekce streptokokem (žlutý)

- **ledvin** (mesangiální buňky)
- **makrofágy pojivové tkáně** (histiocyty)
- **makrofágy kostí** (osteoklasty) a kostní dřeň
- **makrofágy podkoží a jiných tkání**
- **makrofágy lymfatických uzlin**
- **makrofágy CNS** (mikroglie)

Normální makrofágy jsou imunologicky „tiché“ buňky, mají nízkou spotřebu kyslíku, malý počet exprimovaných molekul HLA antigenů II. třídy na svém povrchu a malou nebo žádnou sekreci cytokinů. **Mají však fagocytární a chemickou schopnost a udržují si určitou proliferační kapacitu.** Makrofágy jsou primovány různými stimuly (cytokiny). Primované makrofágy odpovídají na sekundární stimul a stávají se plně aktivními. Aktivované makrofágy nejsou schopné proliferace, mají vysokou spotřebu kyslíku (prostřednictvím *NADPH oxidázy*), schopnost usmrčovat intracelulární parazitující bakterie, lyzovat nádory a mají maximální sekreci zánětových mediátorů (TNF α , IL-1, IL-6, PGE₂, ROI a RNI).

Zánětlivé tkáňové makrofágy

Zánětlivé makrofágy jsou přítomné v různých zánětlivých tekutinách, mají různé regulační funkce a vznikají skoro výlučně z krevních monocytů.

PORUCHY NESPECIFICKÉ IMUNITY

Poruchy motility

Schopnost fagocytů pohlcovat částice tělu cizí je poměrně vysoká, ale i tato schopnost se může vyčerpat. Potom dochází k ukládání cizích látek přímo ve funkčních buňkách orgánů (např. jater, sleziny, plic, ledvin atd.) To vede k poškození těchto orgánů.

- **Defekt adheze leukocytů (LAD – leukocyte adhesion defect „Syndrom líných leukocytů“)** – jde o autozomálně recesivní onemocnění s membránovým defektem myeloidních a lymfatických buněk, který neumožňuje jejich adhezi k endotelu. Defekt je spojen i s postižením dalších funkcí leukocytu. U tohoto syndromu granulocyty a lymfocyty neodpovídají adekvátně na chemotaktické faktory, je postižena chemotaxe, shlukovatelnost, fagocytoza, stimulace látkové výměny a v důsledku toho nedochází k hromadění imunokompetentních buněk v zánětlivém ložisku.

Příčina: molekulárním podkladem onemocnění je defektní syntéza CD 18. Tato složka je důležitou součástí adhezivních proteinů leukocytární membrány.

V důsledku této poruchy dochází k poruchám hojení rány, k nekrotizujícím bakteriálním a mykotickým zánětům kůže. Může docházet i k předčasnému odtržení pupečníku.

- *Podobná porucha chemotaxe a migrace se vyskytuje také v případech porušené aktivace složky C3 komplementu.*

- **Chediak-Higashiho syndrom** – u tohoto onemocnění je porušena fagocytoza a zpomaleno bakteriální zabíjení. V granulocytech, melanocytech, fibroblastech a jiných buňkách se vyskytují velké lysozomy. Infekce jsou způsobeny autodestrukci leukocytů, postižení melanocytů vede k hypopigmentaci. Blíže viz kapitola anomálie bílých krvinek.
- **Jobův syndrom** – toto onemocnění je způsobeno dysfunkcí aktinu, které vyvolá poruchu chemotaxe. Současně dochází k úbytku specifických granulí. Onemocnění se projevuje ekzematózní dermatitidou s recidivujícími infekty kůže. Bývá doprovázeno plicní infekcí. Laboratorně se nachází výrazné zmnožení eozinofilů, pokles gama globulinů a zvýšená hladina protilátek IgE.
- **Chronická granulomatóza (Chronic granulomatous disease)** – jde o větší skupinu onemocnění, u kterých dochází k poruše zpracování antigenů uvnitř buňky a následné tvorbě granulomů. Jde o nejčastější funkční poruchu neutrofilních a eozinofilních granulocytů, která se nedá zjistit morfolologicky. Defekt postihuje rovněž monocyty. Choroba je dědičná, vázaná i nevázaná na X chromozom a její příčinou je defektní aktivace oxidázy. U tohoto onemocnění je snížena baktericidnost granulocytů, tj. pohlcené bakterie se neusmrtí a nerozloží.
- *Schopnost fagocytovat bakterie je u tohoto onemocnění zcela zachována. Lysozomy jsou přítomny v normálním počtu a uvolňují své enzymy do fagozómů, ale tyto enzymy nepůsobí baktericidně. Je snižena produkce H₂O₂ v důsledku snížené aktivity oxidázy. V nepřítomnosti peroxidu není jodována bakteriální membrána a mikroorganismy zůstávají ve fagozómech neporušeny. Tyto okolnosti vedou u těchto nemocných k chronickým infekcím a k tvorbě masivních granulomů. Nemocní jsou nejvíce náchylní ke stafylokokovým a střevním infekcím, protože *Staphylococcus aureus* a *Enterobacter* nemohou být zneškodňovány peroxidem fagocytů. Streptokoky a pneumokoky vytvářejí samy uvnitř fagocytů dostatek peroxidu a způsobují si tím vlastní smrt.*

Poruchy s nadměrným ukládáním

Tezaurismózy – jsou to nemoci vyvolané nadměrným ukládáním zásobních nebo jiných látek v organismu v důsledku narušení metabolické cesty jejich degradace nebo včlenění do jiných struktur. Mezi látky, které se mohou v buňkách těmito cestami hromadit lze zařadit látky lipidové, glykolipidové nebo mukopolysacharidové povahy a dále některé jiné složky např. železo.

GAUCHEROVA NEMOC

Gaucherova nemoc je autozomálně recesivní onemocnění, vyskytující se hlavně u židovské populace Aškenázy.

Příčina: jedná se deficit lysozomálního enzymu beta-glukocerebrosidázy, který v normálních buňkách štěpí glykosylceramid na glukosu. Dochází k hromadění gly-

kosylceramidu v buňkách monocyto-makrofágového systému, což vede ke vzniku tzv. Gaucherových buněk, které pak nacházíme v kostní dřeni, slezině, játrech a lymfatických uzlinách.

Gaucherova buňka

Buňka kulatého nebo oválného tvaru.

Průměr: 20–70 μm

Jádro: uloženo většinou excentricky s hutnější strukturou

Cytoplazma: cytoplazma se barví při použití panoptického barvení bledě modrošedě s vláknitými strukturami a zaujímá většinu objemu buňky

● Laboratorní nález

- ☐ *KO:* mírná normocytární anémie, leukopenie, trombocytopenie, vzácně se objevuje retikulocytoza
- ☐ *Krevní nátěr:* polychromázie

NIEMANNOVA-PICKOVA CHOROBA

Je to autozomálně recesivní onemocnění, vyskytující se podobně jako Gaucherova choroba u židovské populace Aškenázy.

Příčina: defekt spočívá v deficitu fosforylcholinceramidázy (sfingomyelinázy). Tento enzym se podílí na hydrolyze fosfocholinceramidu, který hydrolyzuje na fosforylcholin a ceramid. Vznikají tzv. Niemannovy-Pickovy buňky s pěnivitou strukturou cytoplazmy, které se vyskytují v podobných orgánech jako Gaucherovy buňky.

Niemannova-Pickova buňka

Průměr: 20–80 μm

Jádro: většinou polyploidní, nachází se i dvoujaderné formy

Cytoplazma: v cytoplasmě se často nachází i kulovité inkluze

● Laboratorní nález

- ☐ *KO:* mírná mikrocytární anémie, trombocytopenie, počet leukocytů proměnlivý
- ☐ *Krevní nátěr:* lymfocyty a monocyty obsahují jemné vakuoly

HEMOCHROMATOZA (HEMOSIDEROZA)

Hemosiderozy jsou stavy, při kterých dochází k nadměrnému ukládání železa v jiných buňkách než v erytroblatech a to z důvodu narušení cesty jeho přirozeného metabolismu.

- *Člověk je velmi špatně uzpůsoben pro metabolismus železa. Rovněž jeho schopnost vstřebat železo je 50–100krát nižší, než možnosti většiny savců. Z těchto důvodů má člověk jen omezené možnosti optimálně vyrovnávat hladinu železa. Někteří savci mají na kg hmotnosti až 10krát větší ztráty železa než člověk.*

Stavům, kdy je organismus přetížen železem byla donedávna na rozdíl od stavů se sideropenií věnována nepoměrně menší pozornost (*Andrews a Levy 1998*). Podle stupně přetížení rozlišujeme tyto fáze:

- **prelatentní** – nárůst zásob železa v některých orgánech bez překročení zásobní kapacity
- **latentní** – nárůst zásob železa v některých orgánech s překročením zásobní kapacity bez poškození
- **manifestní** – nárůst zásob železa v některých orgánech s orgánovým poškozením

Stavy z přebytku železa:

Tyto stavy můžeme rozdělit na:

- ☐ **hemochromatozu (hemosiderozu)**
- ☐ **akutní intoxikaci železem**

- *V lidském organismu neexistuje fyziologický systém, který by jej zbavoval železa, proto je omezována a regulována spíše jeho resorbce (příjem).*
- *Fe^{3+} může velmi pomalu vytvářet komplexy s hydroxidovými anionty, které jsou v tkáních přítomné. Tyto komplexy mohou být někdy tak veliké, že překročí limit své rozpustnosti, shlukují se a precipitují v příslušných tkáních, což vede k poškození těchto tkání (*Barton a Bertoli, 1996*).*

Hemosideroza

Zvýšené vstřebávání Fe v trávicím traktu či jeho nadměrný přívod při opakovaných transfuzích vede k postupnému nárůstu zásob Fe v organismu. Nadbytek Fe se ukládá v tkáních, a to zejména v játrech, srdečním svalu, kloubech a endokrinních žlázách. Toto Fe může katalyzovat chemické reakce, vedoucí k tvorbě volných radikálů, jež svým toxickým účinkem na buněčné proteiny a lipidy, mohou vést k porušení buněčných membrán, nukleových kyselin a enzymatických systémů, k poškození buňky a v konečném následku k vážné poruše postižených orgánů – **organová hemosideroza** (*Powel a spol., 1994*).

Rozlišuje se:

- ☐ primární (idiopatická) hemosideroza
- ☐ sekundární hemosideroza

Primární hemosideroza

Hemosideroza (primární hemochromatoza) souvisí s mutací genu HFE na 6. chromozomu blízko A lokusu, zejména genu C282 Y (dochází k záměně G za A v pozici 845, což vede na úrovni proteinu k záměně cysteinu za tyrozin v místě 282 proteinového řetězce). Výsledný produkt syntetizovaný tímto genem tzv. **HFE protein** se uplatňuje v jemné regulaci hladiny železa v nízkomolekulární formě, zejména v časném enterocyty. HFE protein soutěží o vazbu železa s apotransferinem, což vede k hromadění železa v časném enterocyty (*Ganz, 2003*).

- *Mutace C 282 T vznikla pravděpodobně před 60–70 generacemi u jedince v keltské populaci na území střední, či západní Evropy. V komunitě žijící se převážně potravou a častým deficitem resorbovatelného železa umožňovala maximální využití železa. Zabraňovala tak rozvoji sideropenie a představovala pro svého nositele nespornou výhodu.*

Sekundární hemosideroza

Sekundární přetížení železem vzniká zejména u anémií s výraznou inefektivní erytropoézou (např. talasemie) a u anémií v rámci MDS (Bottomley, 1998). Při opakovaném podání transfuzí erytrocytů dochází k rozvoji orgánového přetížení železem se všemi negativními důsledky již po podání 50 transfuzních jednotek erytrocytů.

Specifická imunita

(Získaný imunitní systém)

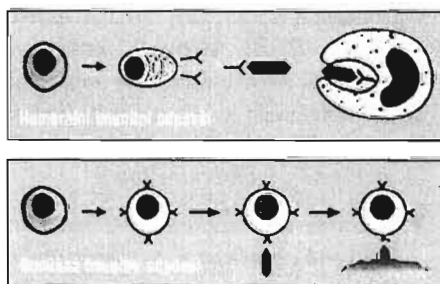
Specifická imunitní reakce je druh obrany, který vzniká jako odpověď organismu na poruchu homeostázy způsobenou specifickým cizím antigenem. Specifická imunita je zprostředkována cirkulujícími protilátkami, bíkovinami globulinové povahy a imunologicky kompetentními buňkami.

- *Celkově imunologický systém disponuje přibližně těmito počty: 10^{12} lymfocytů a 10^{20} molekulami protilátek.*

Charakteristickou vlastností tohoto systému je exprese specifických receptorů na membránách T- a B-lymfocytů. Tyto specifické membránové receptory rozpoznávají vždy pouze jedinou cílovou strukturu (antigen). Za nasměrování imunitní odpovědi, sestávající z rozpoznání a následného zničení buněk poškozených toxiny nebo viry, jsou primárně odpovědné T-lymfocyty.

Specifická imunita může být:

- ❑ **Humorální.** B lymfocyty produkují **protilátky (imunoglobuliny)** zaměřené specificky proti jednotlivým původcům chorob (např. bakteriím) a některým antigenním systémům krevních buněk (např. tvorba protilátek proti erytrocytům nesouhlasné krevní skupiny).
- ❑ **Buněčná.** Aktivují se specifické lymfocyty. Tento druh imunity využívá **cytotoxické a pomocné T-lymfocyty** senzibilizované proti jednotlivým antigenům jako efektorový mechanismus.
- *Poruchy specifické imunity se projevují nedostatečnou nebo nadměrnou tvorbou protilátek nebo defektem mechanismů buněčné obrany.*



Aktivace systémů spojených se specifickou imunitou

K aktivaci specifické imunity je potřebné, aby **části patogenu byly předloženy buňkami prezentujícími antigen** v lymfatických uzlinách, kde jsou v důsledku toho stimulovány specifické T-lymfocyty a aby se dostatečně **namnožily efektorové buňky**, které pak proti infekci bojují.

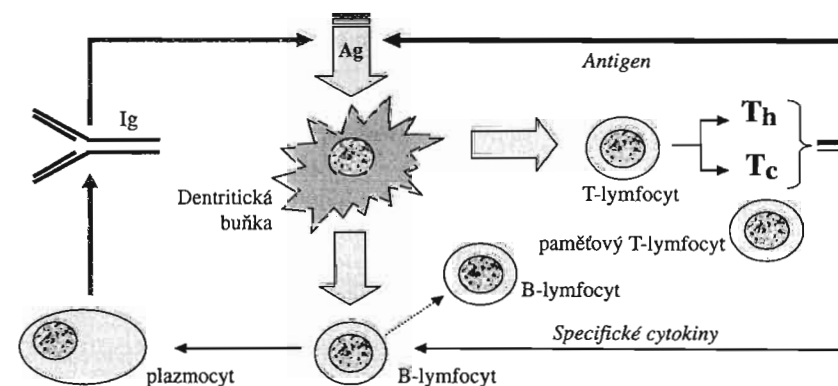
Účinná specifická imunitní odpověď se rozvíjí zpravidla 4–7 dní po průniku patogenu do organismu. Buňky prezentující antigen jsou tedy určitým spojujícím článkem mezi antigenně nespecifickou a antigenně specifickou částí imunitního systému.

Mezi buňky prezentující antigen patří monocyty (makrofágy) a **dentritické buňky**. Jsou přítomny v plicích, kůži, střevech a lymfatických uzlinách. Tyto buňky fagocytují bakterie a rozštěpí je na malé části – antigenní fragmenty. Antigeny vystaví prostřednictvím MHC-molekul I. a II. třídy. Dentritické buňky pak putují lymfatickými cestami do lymfatických uzlin. Cestou vyžrávají a aktivují ostatní buňky imunitního systému. Vážou se k pomocným a cytotoxickým T-lymfocytům a pravděpodobně i k B-lymfocytům. Pomocné T-lymfocyty navázané na dentritické buňky uvolní cytokiny, které aktivují cytotoxické T-lymfocyty. Uvolněné cytokiny společně s aktivovanými makrofágy také ovlivňují lymfocyty B, které transformují až na úroveň plazmocytů. V rozmezí několika dnů se v lymfoidních orgánech lymfocyty pomnoží a vytvoří klon buněk **se stejnou antigenní specifi- tou**.

Část těchto buněk (výkonné buňky) se zúčastní následné imunitní reakce – **primární imunitní odpověď**. Vzniklé protilátky a cytotoxické T-lymfocyty putují do místa vniku patogenu. Produkované specifické protilátky vyvazují přítomný cizí antigen. Na jeho likvidaci se též přímo podílí subpopulace cytotoxických T-lymfocytů.

Jiné buňky zůstávají jako skupina paměťových buněk v záloze pro – **sekundární imunitní odpověď**. Tyto buňky se uplatňují dojde-li k opětovnému styku se stejným antigenem (opakování infekce stejným agens).

IMUNITNÍ ODPOVĚĎ NA PATOGENNÍ AGENS



- **Nezralá dentritická buňka** pohltí téměř všechno, co se nalézá v jejím okolí (odumřelé buňky zdravé tkáně, či jejich částí a molekuly rozpuštěné v mezibuněčné tekutině). Pohlcené molekuly zpracuje, vystaví je na svém povrchu a zpřístupní je specifickým T-lymfocytům. Jestliže dentritická buňka pohltí nějaký patogen a receptory rozpoznají přítomnost patogenu, začne dentritická buňka zrát a v průběhu zrání je „přeprogramována“ (Špíšek a Bartůňková, 2003).
- **Zralá dentritická buňka** je nejučinnější buňkou prezentující antigen. Dokáže aktivovat naivní (panenské) T-lymfocyty. Jakmile je dentritická buňka aktivována, přestane pohlcovat molekuly a buňky z okolí. To co pohltila rozštěpí a vystaví na svém povrchu. Komplexy MHC I. třídy aktivují cytotoxické Tc-lymfocyty a komplexy MHC II. třídy aktivují pomocné Th-lymfocyty. Současně dojde k exprimování velkého množství adhezivních molekul na povrchu buňky které umožní pevný kontakt mezi buňkou prezentující antigen a lymfocyty. V průběhu těchto změn se zralé dentritické buňky přesouvají do lymfatických uzlin, kde čekají na setkání s lymfocyty specifickými pro vystavené antigeny. Po nastartování aktivace dentritická buňka do 48 hodin odumírá (Špíšek a Bartůňková, 2003).

Imunitní reakce může být:

- **prospěšná** – vznik imunity
- **inertní** – imunologická tolerance
- **škodlivá** – reakce z přecitlivělosti, autoimunita

Patologicky změněná imunologická reaktivita

Imunitní odpověď nemusí být pro organismus vždy užitečná. Styk organismu s antigenem může také za určitých okolností vést ke vzniku **různých patologických stavů se závažnými až letálními následky**. Poruchy specifických imunitních mechanismů můžeme rozdělit do čtyř skupin:

- ❑ **Imunodeficitní stavy:** neschopnost produkovat účinné protilátky nebo senzibilizované lymfocyty proti běžnému spektru antigenů – hypofunkce až afunkce imunologického systému.
- ❑ **Hypersenzitivní stavy:** poruchy jednotlivých typů imunitních reakcí v důsledku změny aktivity různých článků imunokompetentního systému – hyperfunkce imunobiologického systému.
- ❑ **Autoimunitní stavy:** poruchy imunologické tolerance, změna spektra antigenů proti kterým může daný systém tvořit protilátky – zvrácená funkce imunobiologického systému.
- ❑ **Imunoproliferativní stavy:** blastomatózní bujení imunokompetentních tkání.

BUŇKY IMUNITNÍHO SYSTÉMU

Mezi buňky imunitního systému se mimo jiné řadí lymfocyty, neutrofile, **makrofágy** (monocyty) a **mikrofágy**:

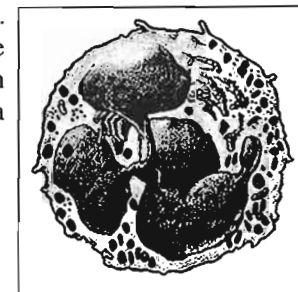
- **Neutrofile** – buňky první obranné linie proti infekci, zajišťují „úklidovou“ reakci.

- **Mikrofágy** – společně s NK buňkami zajišťují přirozenou cytotoxickou reakci.
- **Makrofágy** – nesou na svém povrchu celou řadu receptorů, které jim umožňují spolupracovat s jinými buňkami (např. T- a B-lymfocyty). Pro aktivitu makrofágů je důležitý příjem specifických signálů od T-lymfocytů.
- **Lymfocyty** – mají řadu specifických funkcí. Pomocí specifických membránových receptorů rozlišují cizorodé antigenní struktury od vlastních a vytváří proti nim obranné mechanismy.

Funkce neutrofilů

Neutrofile představují obrannou linii proti infekci. Primární funkcí granulocytů je lokalizace a destrukce mikroorganismů nebo alespoň omezení rychlosti jejich rozmnožování. Pro tuto funkci jsou vybaveny několika specifickými vlastnostmi:

- ◆ **chemotaxe**
- ◆ **pohyblivost** (migrace)
- ◆ **adheze** leukocytů k endotelu
- ◆ **fagocytoza a degranulace**
- ◆ **zabití** mikroorganismu



Neutrofile mohou fagocytovat bakterie, houby, protozoa, některé viry, buňky infikované viry, nádorové buňky, drobné částice a amorfni hmotu. Při svém cytotoxickém působení využívají zejména reaktivní mediátory kyslíku ve spolupráci s myeloperoxidázou a volnými anionty Cl⁻. Reakcí vznikají velmi toxické chlornany.

Nestimulovaný neutrofil žije v průměru 8 hodin, tato doba se aktivací zkracuje. Podle různých kritérií se u neutrofilů rozlišuje několik subpopulací. Nejdůležitější je jejich dělení podle funkční kapacity:

- ❑ neutrofile v **neaktivním stavu** (resting)
- ❑ neutrofile v **aktivním stavu**

- *Existuje však řada přechodných stavů mezi těmito 2 krajními stadii. Jako primované označujeme neaktivované neutrofile, které získali již schopnost odpovídat na aktivaci pohotovější a silnější odpovědí.*

Rozhodující význam pro funkční aktivitu neutrofilů mají jejich granula. Podle funkce a obsahu přítomných látek se granula lidských neutrofilů rozdělují na 3 hlavní skupiny:



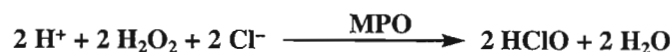
Neutrofil fagocytuje
STREPTOKOKUS PYOGENES

- **azurofilní**
- **specifická**
- **malá zásobní**

Jejich funkcí je podobně jako u klasických lysozomů poskytnout enzymatickou výbavu pro rozklad různých makromolekul a jiných složitých substrátů, případně usmrcovat pohlcené bakterie za účelem regulace fyziologických a patologických procesů, včetně zápalu. Neutrofilní granula obsahují:

- antimikrobní nebo cytotoxické látky
- neutrální proteázy
- kyselé hydrolázy
- cytoplasmatické membránové receptory

Typickou součástí azurofilních granul je **myeloperoxidáza (MPO)**. Je to klíčový enzym, který se zúčastní na reakci H_2O_2 s Cl^- za vzniku kyseliny chlorné:

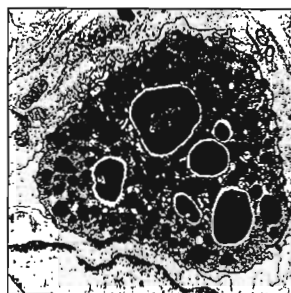


Myeloperoxidázový systém je neúčinnější antimikrobiální a cytotoxický mechanismus savčích leukocytů. Mimo MPO obsahují azurofilní granula též **defenziny** (řadí se k perforinům). Jde o látky, které podobně jako komplement poškozují cytoplasmatickou membránu cílových buněk.

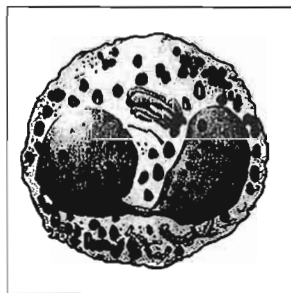
Funkce eozinofilů

Hlavní funkcí eozinofilů je cytotoxická reakce namířená hlavně proti parazitárním (helmintickým a jiným vícebuněčným) infekcím. Eozinofily mají svá specifická eozinofilní granula, ale mají mnoho společných rysů s granulocyty. **Obsahují speciální eozinofilovou peroxidázu (EPO)**. V granulích je dále obsažen zásaditý protein (bazický protein – MBP), kationtový protein, arylsulfatáza B, fosfolipáza D, histamin a neurotoxin. Tyto proteiny po uvolnění do okolí poškodí či přímo zabijí parazita ne jenom v larválním stadiu. Bohužel tyto látky mohou poškodit i zdravé tkáně hostitele. V eozinofilech je přítomen plazminogen, proto eozinofily mají též schopnost odstraňovat fibrinová depozita.

Eozinofily mohou fagocytovat bakterie, kvasinky a prvky. Jejich fagocytární schopnost a schopnost chemotaxe je v porovnání s neutrofily mnohem nižší. Zvy-



Ultratenký řez granulocytem



Ultratenký řez eozinofilem

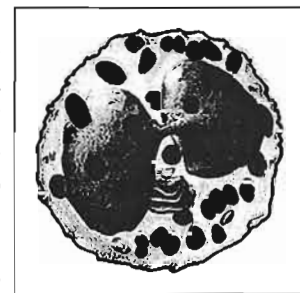
šují ji histamin a komplexy antigen – protilátka. Proto eozinofily sehrávají důležitou úlohu:

- ◆ při **detoxikaci** (likvidace chemických mediátorů zánětu)
- ◆ u hypersenzitivních reakcí se podílí na chronických alergických reakcích (např. zčervenání kůže, kopřivka a pod.).
- ◆ při **poškození tkáně**

Poločas eozinofilů v krevním oběhu před migrací do tkání, kde jich je mnohočetkrát více než v periferní krvi, se pohybuje kolem 6–12 hodin. Nejvíce eozinofilů se nachází v orgánech s epitelialním povrchem, který se dostává do styku se zevními alergeny (respirační, gastrointestinální a dolní genitouretrální trakt). Zde eozinofily přežívají i několik týdnů.

Funkce bazofilů

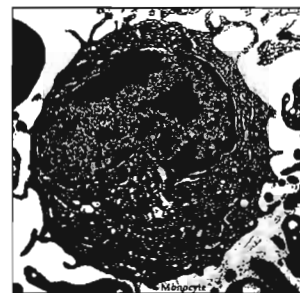
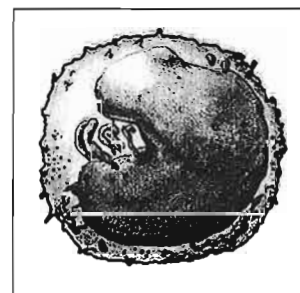
Bazofily jsou nefagocytující buňky, které po aktivaci uvolňují ze svých granul různé látky. Velká granula bazofilů obsahují histamin, serotonin, leukotrieny a heparin, který se pravděpodobně v nich vytváří. Bazofily hrají důležitou roli při alergické odpovědi, u hypersenzitivních reakcí a podléhají se na tukovém metabolismu. Svými vlastnostmi se podobají žírným buňkám. Prostaglandiny se tvoří v bazofilech de novo, až po jejich aktivaci s odstupem 6–8 hodin.



Funkce monocytů

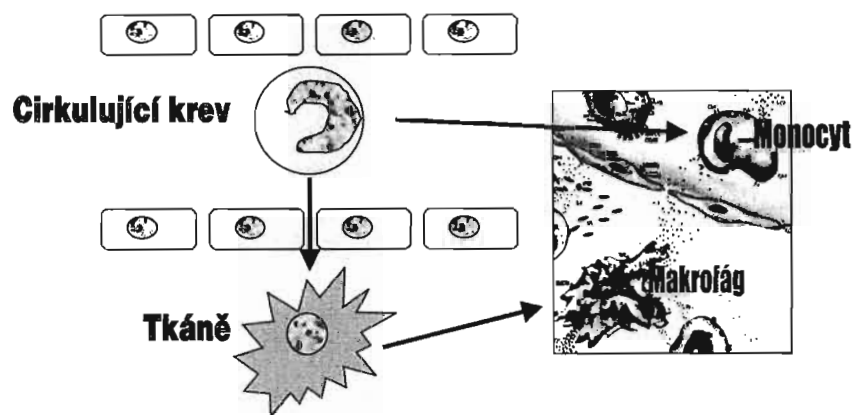
Monocyty se nachází nejen v krvi a krvetvorných orgánech, ale i v pojivu jednotlivých orgánů, ve kterém přizpůsobují svůj tvar okolí. Vznikají v kostní dřeni z progenitorové kmenové buňky (CFU-GM) společně pro monocyty a granulocyty. Monocyty jsou vyplavovány do krve, kde pobývají určitou dobu (24–36 hodin) a pak cestují (migrují) do tkání. Zde se transformují na volné nebo vázané makrofágy a stávají se součástí **mononukleárního fagocytárního systému – MFS**.

V případě zánětu monocyty migrují k zánětlivému ložisku, kde projevují intenzivní fagocytární aktivitu. Monocyty vykazují také silnou sekreční aktivitu – jsou schopné syntetizovat více než 50 různých proteinů. Produkují IL-1 a INF α a některé další látky, které modulují funkčnost ostatních buněk. Monocyt patří k hlavnímu obrannému fagocytujícímu systému a mění svůj tvar podle pohlcené částice.



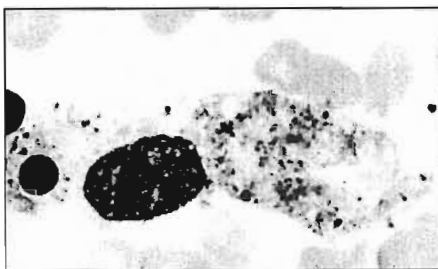
Monocyt – el. snímek

PŘESTUP MONOCYTŮ DO TKÁNÍ



Monocyty (makrofágy) se zúčastňují obranných mechanismů:

- fagocytováním cizorodých látek – pohlcují celé buňky (erytrocyty), parazity a jiné větší anorganické (prach) a organické částice.
- rozložením fagocytovaného materiálu na antigenní peptidy – povrchové molekuly monocyty váží antigenní peptidy na molekuly HLA a předkládají je T-lymfocytům.



Makrofág

Funkce NK buněk

- **NK buňky (natural killer):** jsou odpovědné za přirozenou cytotoxicitu, zajišťují na antigenech nezávislou protinádorovou imunitu.

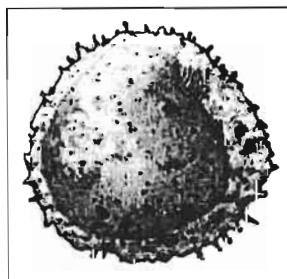
Funkce lymfocytů

Lymfocyty plní rozličné funkce při imunitních reakcích:

- **lymfocyty B:** mimo jiné zodpovídají za specifickou protilátkovou imunitu
- **lymfocyty T:** mimo jiné odpovídají za specifickou buněčnou imunitu



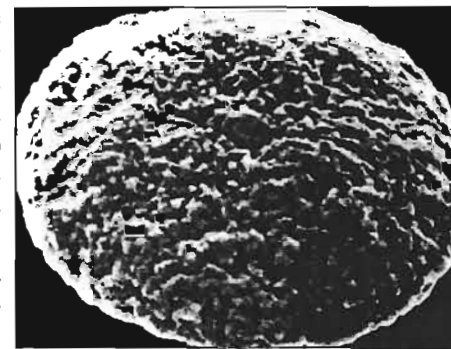
Ultratenký řez lymfocylem



3.3. Fyziologie a funkce krevních destiček

Poprvé popsal krevní destičky v roce 1842 Donné a Osler. Pojem „krevní destička – trombocyt“ zavedl Bizzozero, který je popsal v r. 1882 jako samostatné elementy.

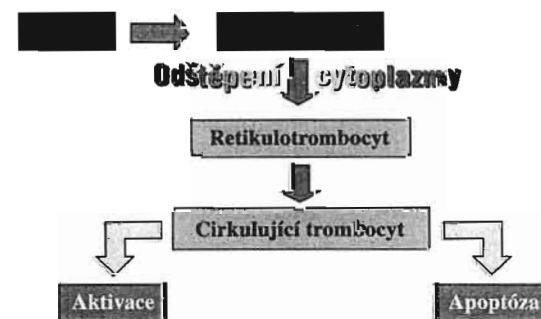
Krevní destička je nejmenší částice v krvi. Cirkulující krevní destičky představují heterogenní populaci složenou z trombocytů různé velikosti, tvaru a hustoty. V nativním nátěru se jeví jako silně světlolomná okrouhlá, nebo protáhlá granulární bezjaderná tělíska tvaru oválných disků o průměru kolem 1.5–3.5 μm , tloušťky 1–1.5 μm a objemu 8–12 fl. V panopticky obarveném nátěru představují bazofilní granulární tělíska.



Trombocyt v elektronovém mikroskopu

- **Mladší destičky** mají oproti starším odlišnou ultrastrukturu, metabolismus a funkci. Jsou větší s lepší funkcí. Mají hutnější cytoplazmu a vyšší obsah granulí obsahujících serotonin. Na membráně mají větší počet vazebných míst.
- **Starší destičky** jsou menší a méně funkční. Stárnutím se snižuje jejich denzita a klesá aktivita nitrobuňkových procesů.
- **Trombocyty jsou poměrně labilní a povrchově aktivní elementy.** Po vyplavení z kostní dřeně jsou mladé destičky 1–2 dny zadržovány ve slezině (10–30 % jejich celkového počtu). Po uvolnění z megakaryocytů podléhají krevní destičky procesu stárnutí. Za normálních okolností přežívají destičky v krevním oběhu 8–14 dní. Zestárlé nefunkční trombocyty jsou odbourávány mononukleárním fagocytárním systémem ve slezině, játrech a kostní dřeni.

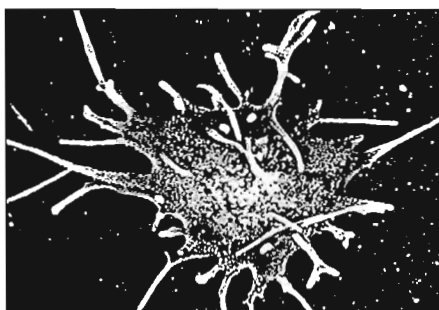
POHYB KREVŇÍCH DESTIČEK V ORGANISMU



- **Retikulotrombocyty (RT)** jsou mladé krevní destičky obsahující zbytky RNA (Ault a Knowles, 1995). Trombocytopenie vyvolané sníženým přežíváním krevních destiček by měly vykazovat zvýšené procento RT. Zvýšené zastoupení RT u normálního počtu destiček ukazuje na jejich zvýšený obrát (Rinder a spol., 1998).

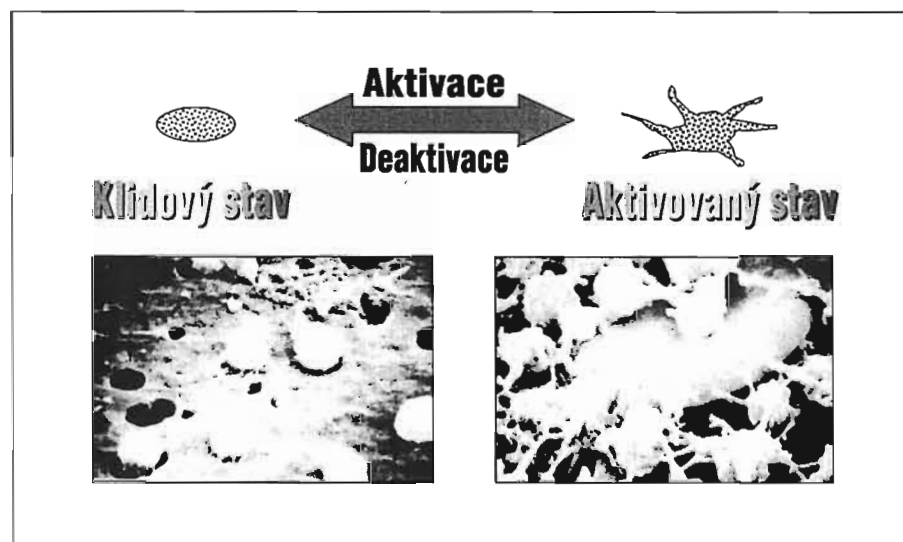
Krevní destička je v organismu součástí krve a za normálních okolností je obklopena mimobuněčnou tekutinou. Na rozdíl od ostatních krevních buněk má některé metabolické a strukturální zvláštnosti, které jsou ve vztahu k jejím specifickým hemostatickým schopnostem.

Krevní destičky podléhají řadě **interakcí** a to buď s rozpustnými složkami krevní plazmy nebo s narušeným povrchem endotelu. Výsledkem těchto interakcí může být jejich **aktivace**, při které se mění tvar destičky, metabolismus i látková přeměna (Kroll a Schafer, 1995).

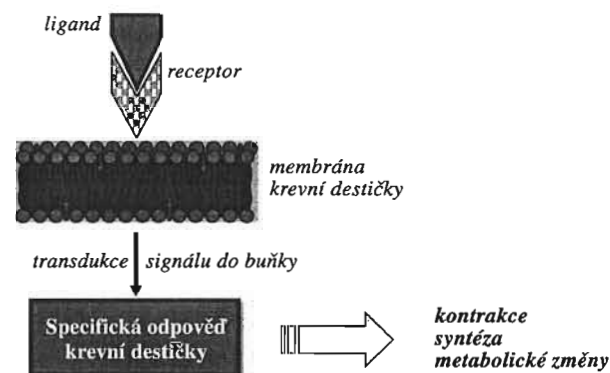


Aktivovaný trombocyt

KREVŇÍ DESTIČKA V KLIDOVÉM A AKTIVOVANÉM STAVU



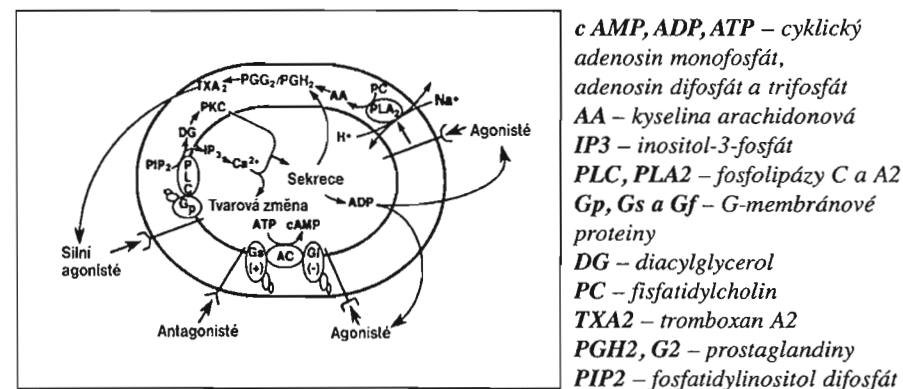
SCHEMA LIGAND-RECEPTOROVÉ INTERAKCE A PŘENOS SIGNÁLU DO TROMBOCYTU



Extracelulární stimuly odpovědné za funkční změny krevní destičky mohou být zařazeny do několika skupin:

- **Silní agonisté** – trombin, kolagen, prostaglandíny, endoperoxidy, TXA₂ a PAF.
- **Mírní agonisté** – ADP, vasopresin, serotonin. Jejich účinek se projeví až po sekreci granul destiček.
- **Slabí agonisté** – adrenalin
- **Antagonisté** – PGI₂, PGD₂ a EDRF.

RŮZNÉ CESTY AKTIVACE KREVŇÍ DESTIČKY (SILNÍ AGONISTÉ, AGONISTÉ A ANTAGONISTÉ)



Aktivaci destičky je možné chápat jako proces, který probíhá v těchto fázích:

- ☐ *ligand-receptorová interakce*
- ☐ *přenos (transdukce) signálu do destičky*
- ☐ *specifická odpověď stimulované krevní destičky*

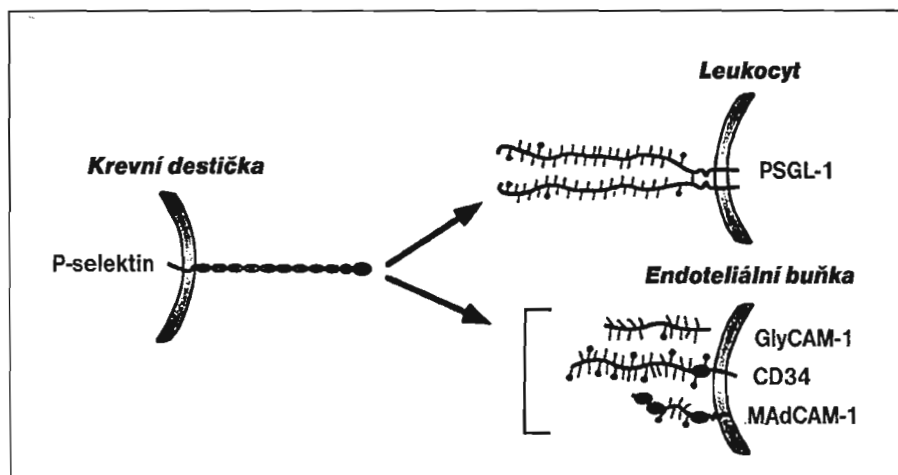
3.3.1. Aktivace krevní destičky

Krevní destičky mohou být aktivovány:

- stykem se *subendoteliálními strukturami* (např. při poškození cévní stěny)
- některými látkami (*aktivátory*) vyplavenými do krevního oběhu.

Aktivované destičky mohou reagovat s některými dalšími buňkami (leukocyty, aktivovanými endotelovými buňkami aj.).

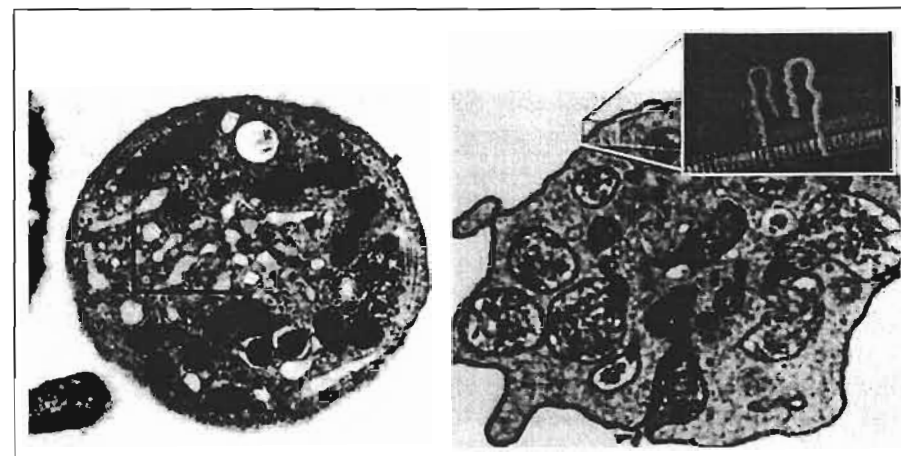
ADHESE KREVNÍCH DESTIČEK K AKTIVOVANÝM POVRCHŮM ZPROSTŘEDKOVANÁ P-SELEKTINEM



PSGL-1: leukocytární glykoproteinová liganda k P-selektinu na krevních destičkách
GlyCAM-1, CD 34, MAdCAM-1: glykoproteinové ligandy aktivovaných endotelových buněk k P-selektinu krevních destiček.

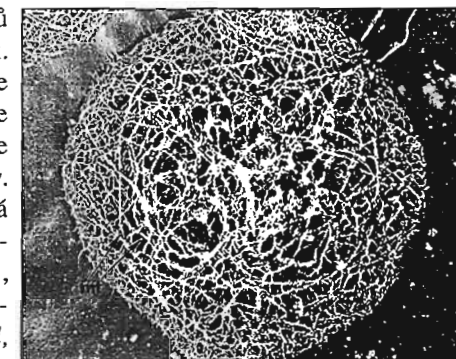
Destičky jsou aktivovány v organismu silnými aktivátory – kolagenem a trombinem. Při aktivaci jde o komplexní proces, na němž se podílí řada podnětů, četné transdukce signálů a efektorové mechanismy a to jak aktivace fosfolipázy C, metabolismus fosfoinositidů, mobilizace Ca^{2+} , tak i cyklus kyseliny arachidonové.

Při aktivaci dochází k deformaci destiček, extruzi pseudopodií, degranulaci,



Destička v klidové fázi (el. snímek) a aktivovaná krevní destička

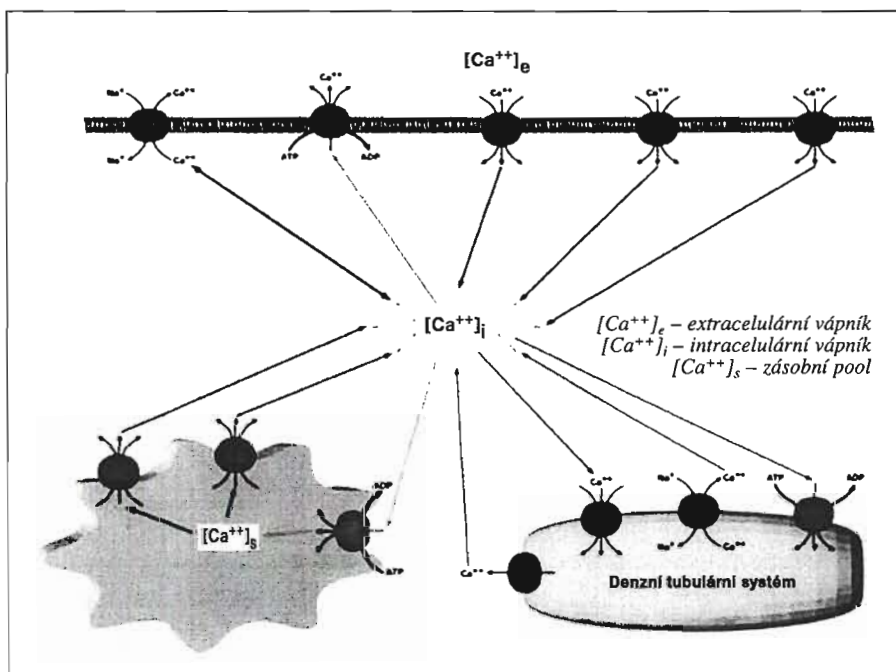
uvolnění prokoagulačních faktorů a k sekreci dalších aktivátorů destiček. Z destičkových granulí se uvolňuje ADP a TXA_2 . Deformaci destiček se zvětšuje plocha, na níž se uskutečňuje interakce faktorů koagulační kaskády. Důležitou regulační úlohu sehrává i fosfolipidová membrána povrchu destiček díky svému negativnímu náboji, který výrazně urychluje interakce koagulačních faktorů (Lapetina a Siegel, 1983).



Aktivovaný cytoskelet po mobilizaci nitrobuněčného vápníku

Při aktivaci krevní destičky dochází uvnitř buňky:

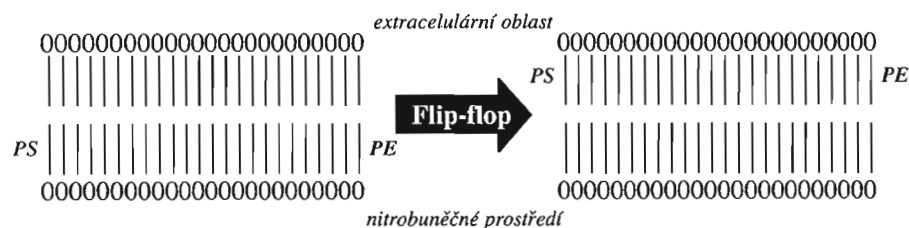
- ☐ **k přesunům nitrobuněčného vápníku** (uvnitř buňky se zvyšuje koncentrace volných Ca^{2+}) a to z těchto 3 kompartmentů:
 - **denní tabulární systém (DTS)** – vlastně jde o transformované endoplazmatické retikulum
 - **mitochondrie**
 - **extracelulární vápník**
- ☐ **ke změnám membránové struktury** (Schroit a Zwaal, 1991):
 - fenomén **flip-flop**, přetočení membrány
 - poškození membrány s následnou tvorbou membránových mikročástic (**microvesicle**).



- Oba děje vedou k odhalení membránových fosfolipidů vnitřních struktur membrány (PS – fosfatidylserin, PE – fosfatidyletanolamin. Tyto děje jsou jedny z posledních při aktivaci krevní destičky (Schroit a Zwaal, 1991).

Fenomén flip-flop

Jde o projev aktivované krevní destičky, při kterém dochází k přetočení fosfolipidové dvojvrstvy cytoplazmatické membrány krevní destičky v horizontální rovině tak, že fosfolipidy vnitřní části dvojvrstvy se dostávají do vnějších částí buněčné membrány a opačně. Dochází tedy k expozici záporně nabitých fosfolipidů (fosfatidylserin – PS, fosfatidyletanolamin – PE) na vnějším povrchu cytoplazmatické membrány. Tyto složky jsou pak v koagulačním procesu využívány jako podkladové matrix pro tvorbu **koagulačně aktivních komplexů** (Schroit a Zwaal, 1991).



Aktivace trombocytů fyziologickými agonisty (ligandy) je sledem řetězovitě narůstajících reakcí, které zprostředkují **kompletní biologickou odpověď** – tvorbu **destičkové zátky**.

Zesílení může nastat:

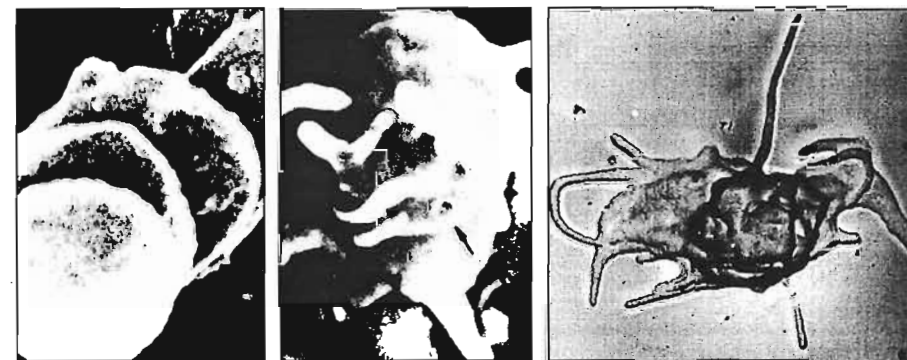
- **uvolněním obsahu granulí** do mimobuněčného prostoru
- „de novo“ **syntézou aktivních sloučenin** (např. cyklus kyseliny arachidonové – syntéza TXA₂)

MORFOLOGICKÉ PROJEVY AKTIVACE

- **změna tvaru**
 - **adheze** k jiným, než destičkovým povrchům
 - **agregace** – vzájemné shlukování krevních destiček
 - **retrakce** (smršťování) adherovaných a agregovaných krevních destiček
- Při adhezi a agregaci může dojít k uvolnění obsahu granulí – **uvolňovací reakce**.

Změna tvaru krevní destičky

Aktivace trombocytů je většinou spojována se změnou tvaru krevní destičky. **Změna tvaru** je morfologickým projevem **aktivace kontraktálního aparátu** krevní destičky. Destičky vytvářejí **pseudopodie** a rozprostírají se po povrchu).



Krevní destička v klidovém stavu (vlevo) a aktivované krevní destičky (vpravo)

- **Změna tvaru probíhá velmi rychle. 15 s po podnětu depolymerují mikrotubuly, které udržují diskoidní tvar, zároveň dochází k polymeraci aktinu. Následuje tvorba pseudopodií (obvykle 5–6 výběžků). Děj vyžaduje vydatný přísun energie (ATP) a přítomnost Ca²⁺. Změny tvaru krevní destičky lze laboratorně sledovat imunofluorescenčními metodami, nebo pomocí elektronového mikroskopu.**

Adheze krevních destiček

(přilnavost krevních destiček)

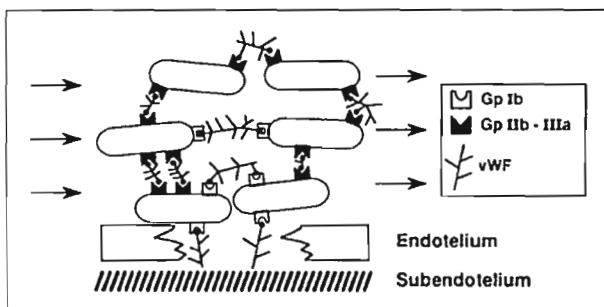
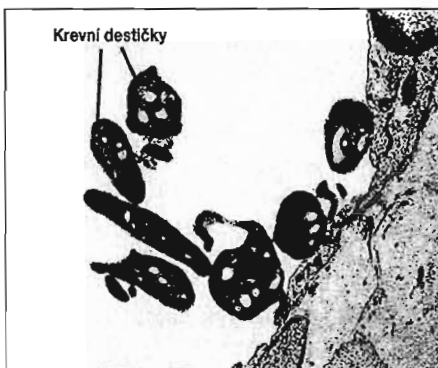
Adheze destiček je proces, který obráží přilnutí destiček na jiné než destičkové

povrchy (Roth, 1991). Adheze krevních destiček na subendotel poraněné cévy je komplexní proces, který **vyžaduje přítomnost několika adhezivních proteinů**. Vedle trombocytů se na adhezi podílejí struktury endotelu, plazmatické adhezivní proteiny a hemodynamické změny (smyskové rychlosti, množství a viskozita krve, velikost a tvar cév). **Adhezivita je lineárně závislá na počtu trombocytů**. Uplatňuje se zde zejména **vWF, dále fibronektin, fibrinogen** a částečně i Ca^{2+} . vWF má vazebná místa pro GP Ib, GP IIb/IIIa a pro kolageny typu I, III a VI. Tato vazebná místa jsou důležitá pro navázání vWF na obnažené subendoteliální struktury (kolagenní vlákna) a následné připojení krevních destiček vyvázáním vWF na GP Ib v komplexu GP Ib/V/IX (Nieuwenhuis a spol., 1985). **Krevní destičky však mohou adherovat ke kolagenním vláknům přímo pomocí receptorového komplexu GP Ia/IIa.**

Adheze krevních destiček k subendoteliálním strukturám je při **vyšších střižných silách** (více než přibližně $25\text{--}30 \text{ dyn/cm}^2$) závislá na přítomnosti vWF, na rozdíl od adheze při **nízkých střižných silách**, která je na tomto faktoru nezávislá (Kroll a spol., 1996). Adheze při vysokých střižných silách je umožněna vazbou vWF na receptory na GP Ib v komplexu GP Ib/V/IX) následovaná agregací pomocí vWF na rozdíl od adheze při **nízkých střižných silách** (adheze v místech s denudovaným endotelem a vytvořením monolayeru krevních destiček), která je závislá jen na vazbě vWF na komplex GP Ib/V/IX. Adheze pak může probíhat i v případě úplné blokady GP IIb/IIIa nebo u nemocných s Glazmannovou nemocí.

Krevní destička po styku s kolagenními nebo subendotelovými strukturami změní během několika sekund svůj tvar a pomocí vytvořených výběžků (pseudopodií) přilne k povrchu. Destičky se během tohoto procesu **mohou zvětšit až desetinásobně**. Přítomnost Mg^{2+} zvyšuje adhezi trombocytů na kolagen až 5krát. Hlubší vrstvy stěny především větších

Adheze trombocytů na obnažený cévní endotel – (el. mikroskop)



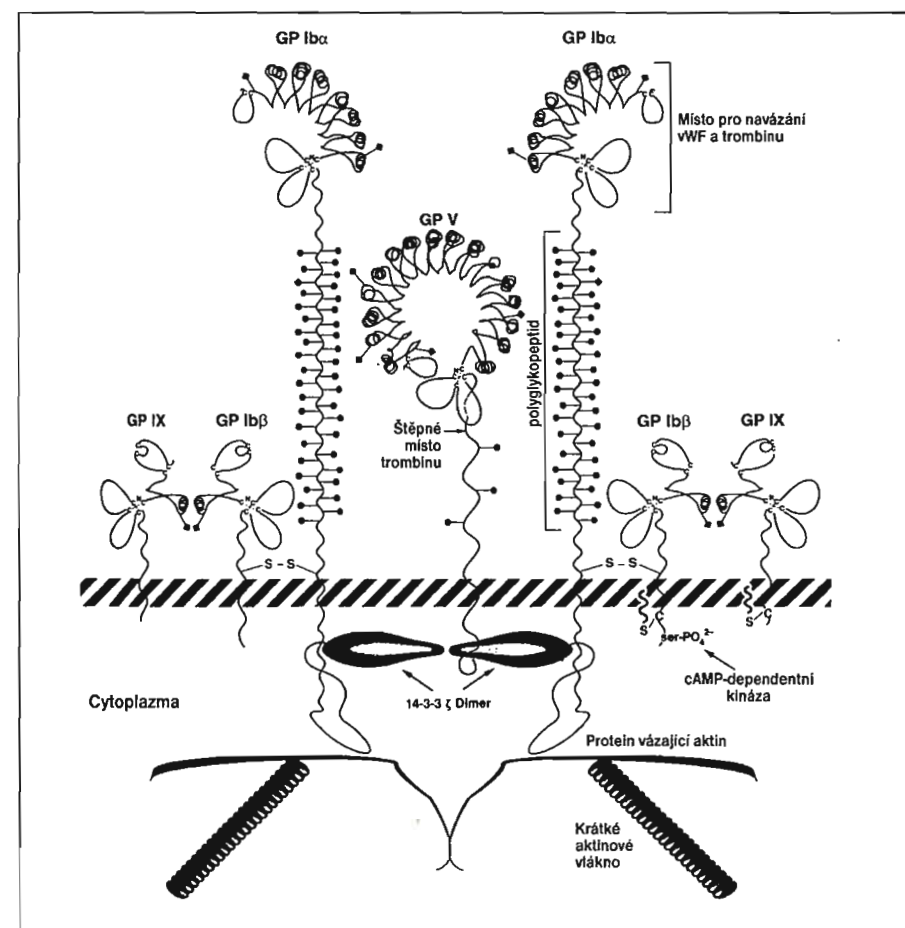
Adheze krevních destiček při vysokých střižných silách

cév, tvořené elastinem, svalovými buňkami, subendoteliálními mikrofibrilami a kolagenem váží velmi rychle krevní destičky (Kroll a spol., 1991).

Při obnažení cévní výstelky adherují krevní destičky prostřednictvím **komplexu [GP Ib-V-IX]**, který se naváže na vWF obnažené cévní stěny. Komplex je složen ze 4 glykoproteinových jednotek: GP Ib α , GP Ib β , GP IX a GP V. Komplex má také vazebné místo pro trombin, které moduluje odpověď destičky k trombinu.

► Určitou úlohu při adhezi krevních destiček může sehrávat i **fibronektin**, který je přítomen v α granulích krevních destiček. Fibronektin vytváří pravděpodobně jakési přemostění mezi Gp Ib/VI/IX a vWF.

STRUKTURA GLYKOPROTEINOVÉHO KOMPLEXU I/II/IX



Adheze komplexu GP Ib-V-IX

Je zprostředkována vazbou GP Ib na A1 doménu vWF, který je přes doménu A3 vázán ke kolagenním strukturám. Navázání k A1 podjednotce proběhne asi 3x rychleji v přítomnosti α -trombinu.

- Neaktivované krevní destičky se mohou vázat na fibrin nebo na povrchově vázaný fibrinogen.

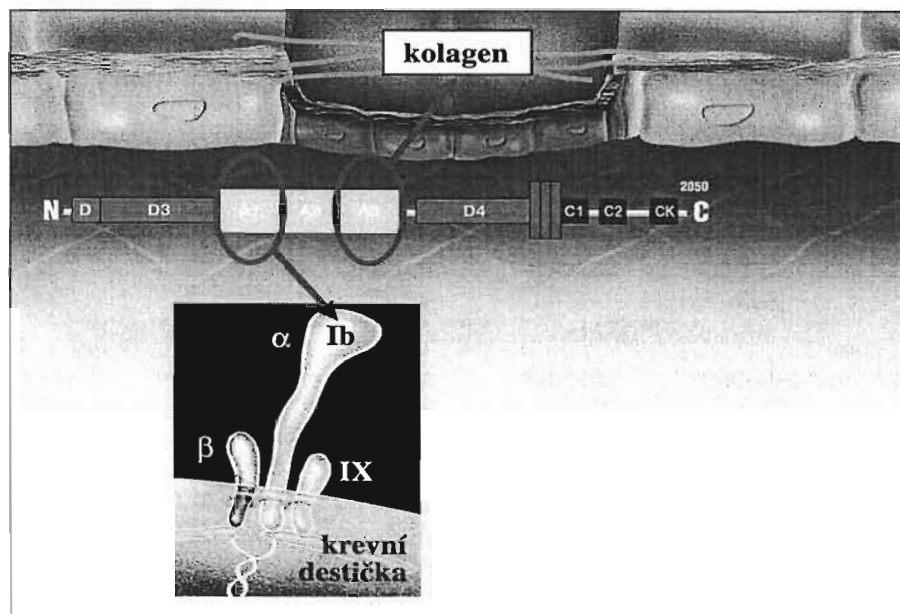
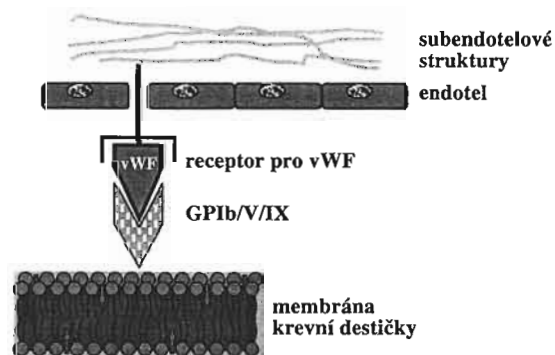


SCHÉMA ADHEZE KREVŇÍ DESTIČKY POMOCÍ KOMPLEXU MEMBRÁNOVÝCH GLYKOPROTEINŮ



- Spojení jednotlivých krevních destiček mezi sebou prostřednictvím vazby receptorů glykoproteinového komplexu Ib/V/IX na molekuly vWF lze napodobit in vitro v plazmě bohaté na destičky **ristocetinem**. Těto reakce se využívá při monitorování funkce krevních destiček při agregometrii.

Laboratorní metody

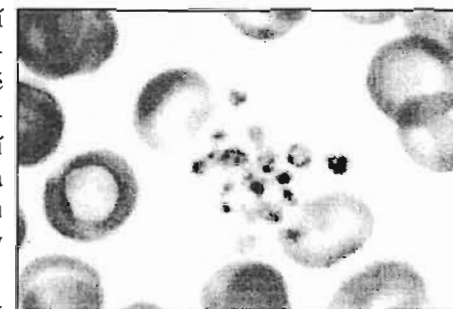
- ❑ ke sledování adheze krevních destiček se využívá plazma bohatá na destičky (Platelet Rich Plasma – PRP) nebo plná krev. Používají se adhezivní povrchy nefyziologické povahy (nejčastěji sklo – kuličky, vlákna), nebo fyziologické povahy (kolagenová vlákna). Lze zjišťovat buď **přímou adhezi destiček**, nebo tzv. **retenci** (projevuje se současně adheze i agregace).

Agregace krevních destiček

Agregace je vzájemné shlukování krevních destiček. Dochází k němu vlivem změny konformace glykoproteinové struktury GP IIb/IIIa po obsazení receptorových míst na membráně krevní destičky agonisty. Konformační změna umožní vyvázání molekuly fibrinogenu nebo vWF mezi dvěma receptory GP IIb/IIIa na dvou různých destičkách.

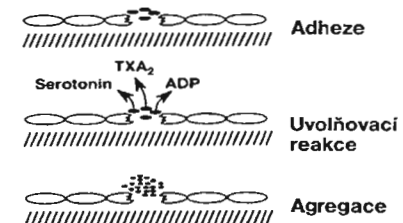
Při agregaci vlivem některých vnějších podnětů dochází nejprve ke spojování trombocytů většinou přes receptory na jejich výbězcích (pseudopodiích). Tento děj popisujeme jako **primární agregaci**. V průběhu primární agregace dochází jen k částečnému spojování trombocytů menším počtem glykoproteinových struktur GP IIb/IIIa. Při silnějším aktivačním impulsu k sobě destičky přilnou těsněji, dochází k tzv. **sekundární agregaci**. Při tomto ději se obnaží větší počet glykoproteinových receptorů a dochází k řadě nevratných změn v krevní destičce. Jednotlivé agregované destičky se rozprostírají, rozplývají a postupně splývají navzájem – dochází k **viskózní metamorfóze (přeměně) trombocytů**.

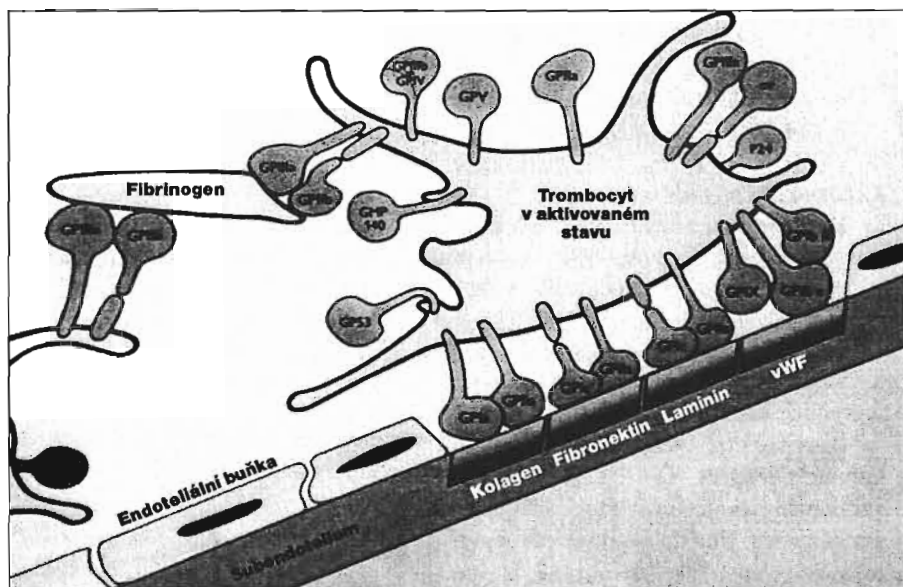
Agregace je většinou následným krokem po adhezi, ale může být vyvolána přímo působením řady induktorů (ADP, TXA₂, kolagen, adrenalin, trombin, serotonin, vasopresin, kys. arachidonová, PAF a jiné). Fyziologickými induktory jsou zřejmě jen ADP a TXA₂.



Agregované trombocyty – periferní krev

Funkce krevní destičky

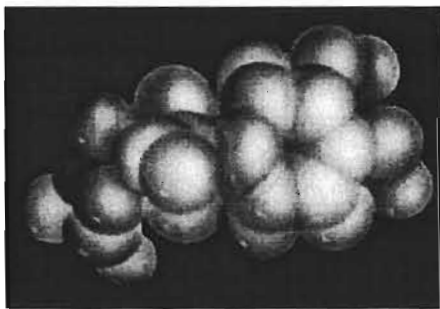




Agregace krevní destičky k adherované destičce (vpravo)

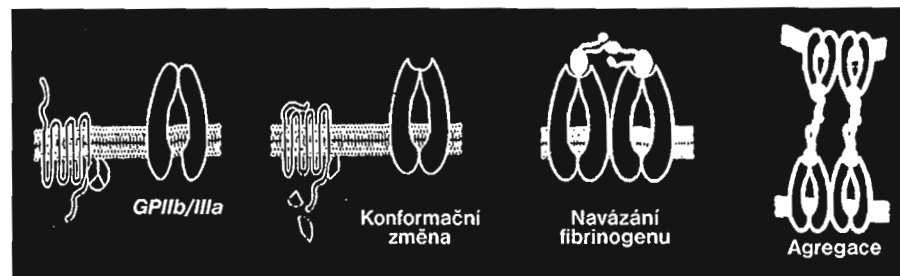
Induktory vyvolávající agregaci krevních destiček

- ☐ Receptorem zprostředkujícím aktivaci buněk po ADP jsou receptory P2. Jedná se o receptory podobné GP IIIa. ADP působí synergicky s celou řadou dalších látek.
- ☐ **TXA2** může působit přes dva různé receptory
- ☐ **Kolagen** aktivuje destičky jen tehdy, je-li ve formě polymeru a je nezbytná přítomnost ADP. Nejprve dochází k adhezi destiček ke kolagenovým vláknům a pak následně k vyvolání agregačního signálu po obsazení příslušných receptorů.
- ☐ **PAF** a **destičkové lipidy** indukují agregaci v závislosti na dávce.
- ☐ **Trombin** vzniká na povrchu krevních destiček účinkem protrombinázy na protrombin. Aktivuje krevní destičky prostřednictvím proteázy aktivovaného receptoru PAR-1 a působí i na GP Ib.
- ☐ **Adrenalin** vyvolává agregaci sám o sobě je-li v dávkách, které výrazně překračují jeho fyziologickou koncentraci. Adrenalin působí přes α_2 – adrenergní receptor prostřednictvím G proteinu. Dochází k inhibici adenylycyklázy. Výsledkem je především zesílení účinku jiných destičkových aktivátorů.



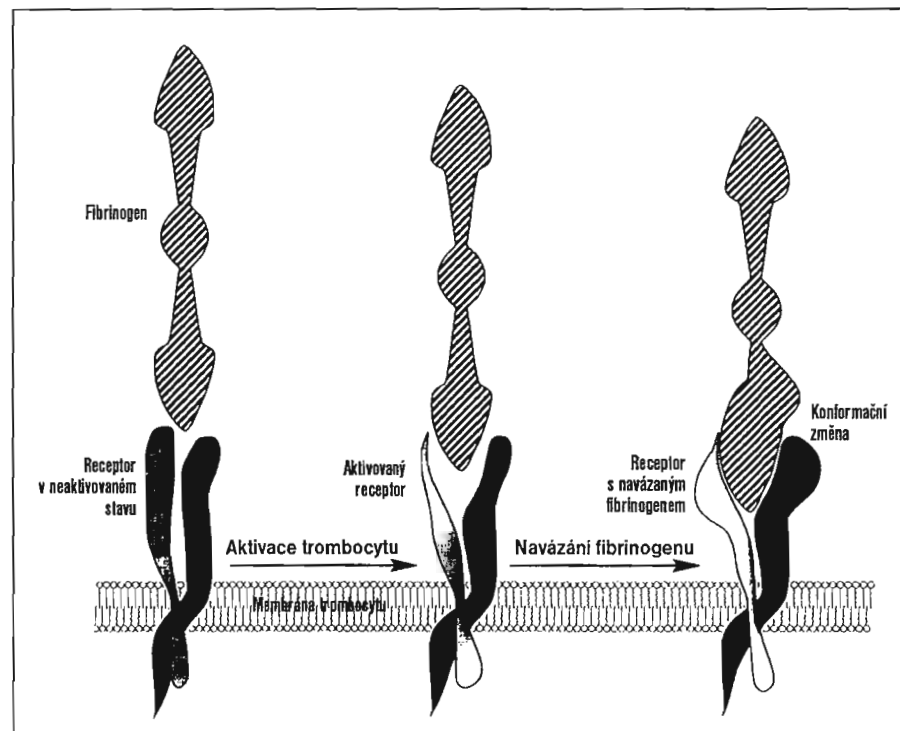
Prostorový model molekuly adrenalinu

Navázáním aktivátoru na jeho membránový receptor se na membráně krevní destičky odhalí vazebná místa integrinového receptoru Gp IIb/IIIa. Glykoproteiny jsou v neaktivované destičce uspořádány volně. Po stimulaci destiček a po uvolnění Ca^{2+} se glykoproteiny aktivují, dojde ke konformační změně.



Během konformační změny vzniká komplex receptorů GpIIb/IIIa a tím se vytvoří podmínky pro vazbu fibrinogenu (Philips a spol. 1988).

PRŮBĚH KONFORMAČNÍ ZMĚNY A NAVÁZÁNÍ FIBRINOGENU



Glykoproteinový komplex IIb/IIIa (GP IIb/IIIa)

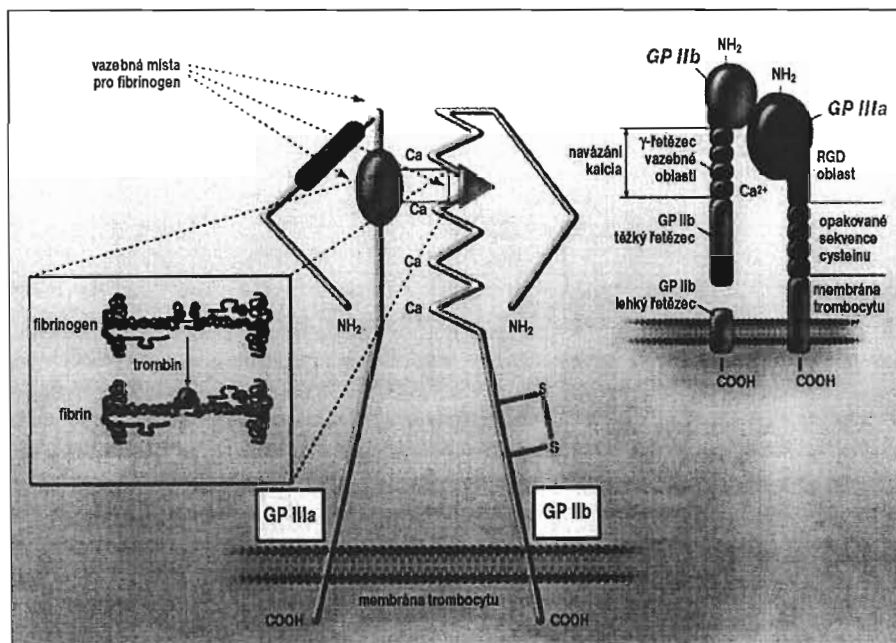
Komplex GpIIb/IIIa je členem rodiny destičkových adhezivních integrinových receptorů uvolněných při adhezivních reakcích (Hynes 1992). Receptor má doménu intracelulární, transmembránovou část a extracelulární doménu. Extracelulární doména je tvořena 2 řetězci – α_{IIb} a β_3 .

V klidovém stavu destičky má receptor jen velmi malou afinitu k fibrinogenu. Po aktivaci dochází ke zvýšení povrchové denzity receptorů GP IIb/IIIa – receptory jsou uvolňovány z α granulí a denzních granulí krevní destičky. Aktivace receptoru GpIIb/IIIa je důsledkem konformačních změn jeho dvou extracelulárních ramének.

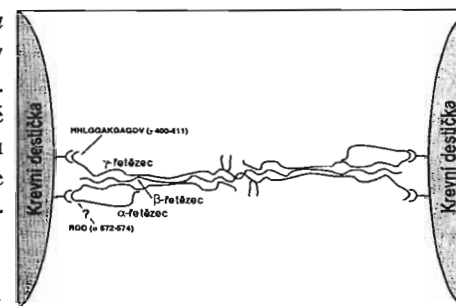
Na integrinový receptor GP IIb/IIIa se váží domény fibrinogenu obsahující sekvence **Arg-Gly-Asp** (tzv. RGD sekvence) a dodekapeptid karboxylové části γ -řetězce molekuly fibrinogenu. Kromě fibrinogenu je RGD sekvence přítomna i na dalších ligandech, jako vWF, vitronectin, trombospondin a fibronectin. Tyto ligandy mohou být rovněž navázány na receptor GP IIb/IIIa (Mayo a spol., 1996).

- Jakmile fibrinogen pokryje povrch poraněné cévy, destičky k němu adherují a váží se na tyto sekvence. Adheze je zprostředkována zprvu neaktivovanými destičkami a teprve „outside-in-signaling“ vede k jejich aktivaci. Sekvence RGD a dodekapeptid se váží na různá místa integrinového receptoru.

STRUKTURA INTEGRINOVÉHO RECEPTORU IIb/IIIa



Destičky se **spojují přes molekulu fibrinogenu** vazebnými můstky (GP IIb/IIIa – fibrinogen – GP IIb/IIIa). Pro vazbu jsou zejména důležité koncové karboxylové skupiny gama řetězců v D-doméně fibrinogenu. Na 1 destičce je kolem **40 000 vazebných míst pro fibrinogen**.



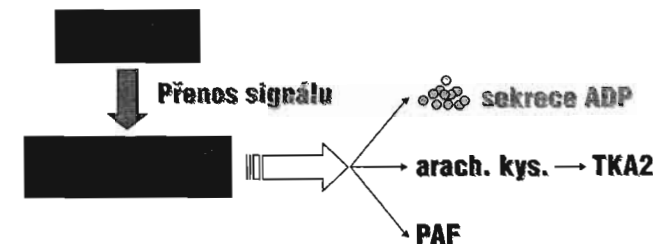
Vazba přes fibrinogenový můstek

- Vedle vazby na ligand má receptor GP IIb/IIIa ještě schopnost ovlivňovat některé intracelulární pochody předáváním řady signálů do buňky (tzv. outside-in-signaling). Jedná se mimo jiné o přeskupení cytoskeletonu, vytvoření pseudopodií, metabolismus kys. arachidonové a inositolfosfátů.

Možnosti přenosu a amplifikace agregačního signálu

V současné době známe 3 cesty, kterými lze vyvolat zesílení agregačního signálu a jeho přenos na další trombocyty:

- uvolnění ADP
- uvolnění TXA_2
- účinkem PAF



- PAF – Platelet Activating Factor – destičkový aktivací faktor

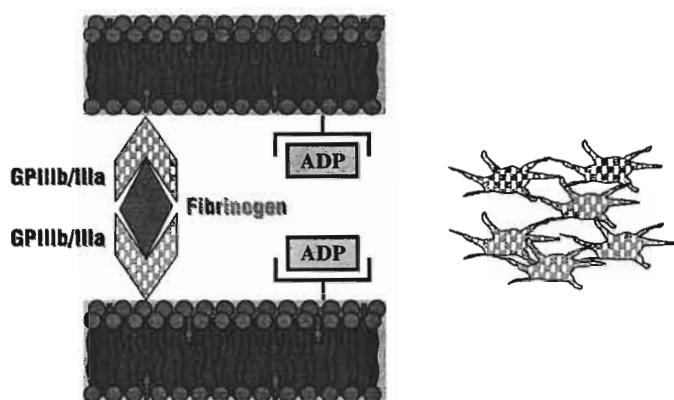
AGREGACE STIMULOVANÁ ADP

Primární agregace

Primární agregace je vyvolaná **ADP uvolněným z porušených tkání** (vnější ADP). Tato agregace má **vrátý (reverzibilní) průběh**. V první fázi dochází ke spojování krevních destiček přes aktivované glykoproteinové oblasti (GP IIb/IIIa), které není-li impuls ADP dostatečný se znovu oddělí a navrátí se do původního stavu (destičky deagregují).

Reakce krevních destiček na ADP je zprostředkována membránovými receptory P2, ty se dále dělí na P2X a P2Y. Podtyp P2X1 receptor slouží jako iontový kanál pro vápník a nezúčastňuje se agregace destiček. Pro odpověď krevní destičky je důležitý podtyp receptoru P2Y1 (Hechler a spol., 1998).

SCHÉMA SPOJOVÁNÍ TROMBOCYTŮ BĚHEM PRIMÁRNÍ AGREGACE

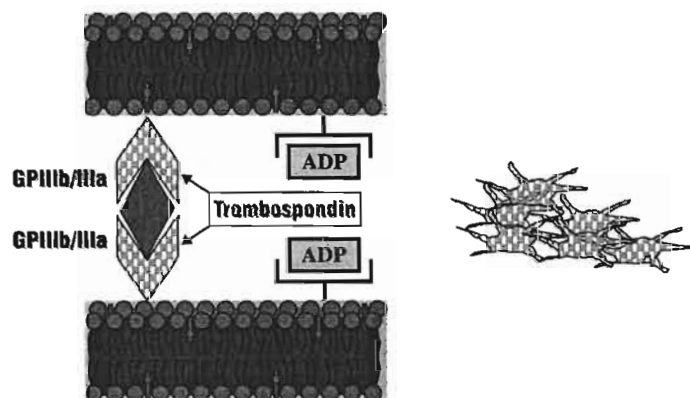


- Primární agregace slouží zřejmě k tomu, aby po změně konformace membránových fosfolipidů proniklo co nejvíce Ca^{2+} do nitra buňky. Vápníkové ionty vyvolají aktivační procesy uvnitř trombocytu. Dochází k aktivaci fosfolipázy A_2 (phospholipase A_2 – PLA_2). Jde o enzym, který je součástí cyklu kyseliny arachidové, při kterém probíhá syntéza TXA_2 .

Sekundární agregace

Při dostatečně velké koncentraci vnějšího ADP, nebo po jiné stimulaci (obsazením receptorů jinými induktory), dojde k sekreci obsahu denzních granulí, které obsahují zásobní ADP a ke spuštění mechanismu přeměny kyseliny arachidonové na TXA_2 . Dochází k těsnému kontaktu krevních destiček. Tato agregace má průběh *nevratný (ireverzibilní)*.

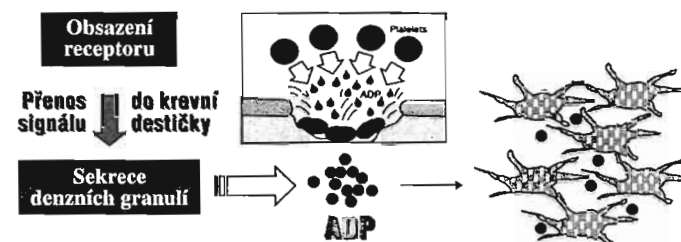
SCHÉMA SPOJOVÁNÍ TROMBOCYTŮ BĚHEM SEKUNDÁRNÍ AGREGACE



Podmínkou sekundární agregace po ADP je uvolnění obsahu α granulí s obsahem trombospondínu a fibronektínu. Trombospondín stabilizuje vazbu fibrinogenu na destičky a fixuje receptorové vazby přes fibrinogenové můstky.

- Při vysokých smykových rychlostech je adheze a agregace trombocytů zprostředkována vazbou vWF na GPIIb/IIIa a to i v nepřítomnosti fibrinogenu.

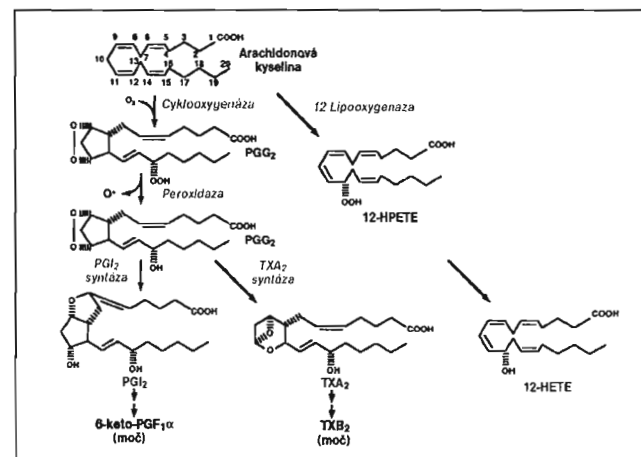
ZESÍLENÍ AGREGAČNÍHO SIGNÁLU U AGREGACE PO ADP



AGREGACE ZESÍLENÁ TXA_2

Některé *prostaglandiny* mohou do značné míry ovlivňovat funkce krevní destičky. V krevní destičce se prostaglandiny mohou tvořit v procesech, při kterých se kyselina arachidonová uvolňuje z membránových fosfolipidů deacylací zprostředkovanou fosfolipázami, nejčastěji fosfolipázou A_2 . Uvolňování kyseliny arachidonové z buněčné membrány je stimulováno vazopresinem, bradykininem a noradrenalinem. Inhibováno je např. kortikosteroidy.

CYKLUS Kyseliny ARACHIDONOVÉ – SYNTÉZA PROSTAGLANDINŮ

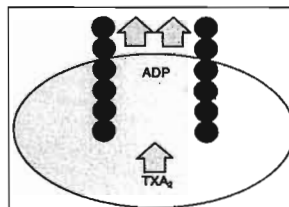


- Prostaglandiny jsou deriváty kyseliny arachidonové, která je součástí fosfolipidů buněčných membrán. Kyselina arachidonová je metabolizována více cestami, které mohou vést buď ke vzniku leukotrienů a lipoxinů, nebo ke vzniku prostaglandinů (Hamberg a spol., 1975).

Prvním krokem v syntéze prostaglandinů je konverze kyseliny arachidonové v přítomnosti enzymu s dvojí aktivitou cyklooxygenázy (prostaglandin – H₂ syntázy) na endoperoxidy (Prostaglandin G₂–PGG₂ a Prostaglandin H₂–PGH₂). PGH₂ je poté za účasti specifických syntáz transformován na prostaglandiny D₂, E₂, F₂, I₂ (prostacyklin) a TXA₂ (Vane, 1971).

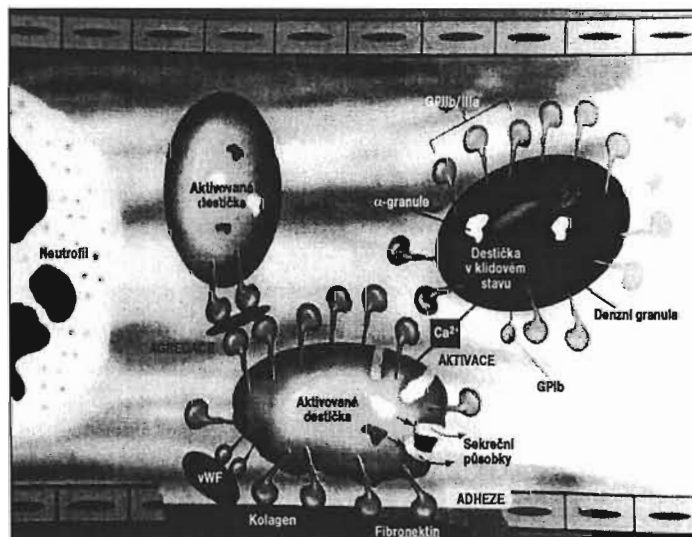
- Metabolismus kyseliny arachidonové spojený s odbouráváním membránových fosfolipidů je nastartován různými stimuly (kolagen, trombin, ADP) vede ke zvýšené produkci TXA₂ a ve svém konečném důsledku k amplifikaci agregace destiček a k vazokonstrikci. Naopak prostacyklin – PGI₂ produkovaný endoteliálními buňkami, má efekt antiagregační a vazodilatační (Awtry a Loscalzo, 2000).

Uvolněný TXA₂ působí jako aktivátor dalších destiček (podobně jako ADP) tím, že se váže na své specifické receptory na membráně destičky a vyvolává agregační signál.



TXA₂ po obsazení receptorů stimuluje uvolnění ADP

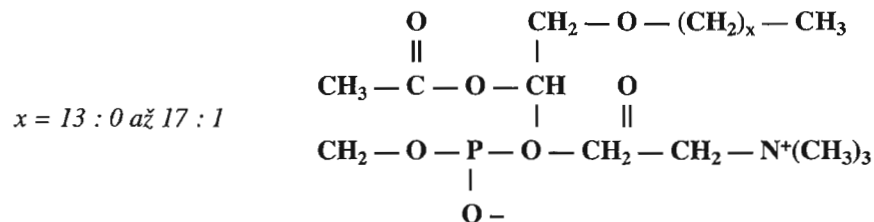
SCHEMA ADHEZE A AGREGACE KREVNÍCH DESTIČEK



AGREGACE VYVOLANÁ PAF

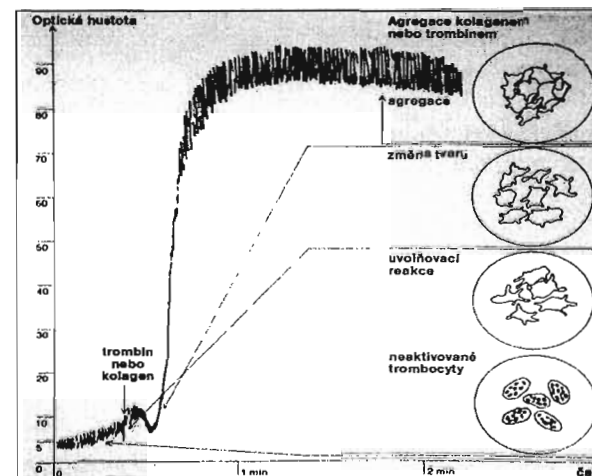
Faktor aktivující destičky (platelet activating factor – PAF) je produkován řadou buněk a také krevními destičkami. Je tvořen po stimulaci buňky. Způsob syntézy PAF není dosud přesně známý. PAF aktivuje krevní destičky způsobem nezávislým na ADP a TXA₂. Má pravděpodobně dvojí účinek membránový a nitrobuněčný.

STRUKTURNÍ VZOREC PAF



Pomocí průtokové cytometrie je možné měřit cirkulující aktivované destičky, agregáty destiček s leukocyty, destičkové agregáty nebo destičkové prokoagulační mikropartikelky. Tato metoda je rovněž vhodná k posuzování účinnosti protideštičkové léčby. Metoda průtokové cytometrie spočívá v inkubaci celé krve s monoklonálními nebo polyklonálními protilátkami proti nejrozličnějším destičkovým glyko-proteinům, jako je PAC1, receptor fibrinogenu, P-selektin, GpII_b/III_a, nebo proti ligandům, např. fibrinogenu. Protilátky jsou potom detekovány strapťadlinem konjugovaným s fluorescein isothiocyanátem (Vojáček, 2003).

AGREGACE VYVOLANÁ KOLAGENEM – AGREGAČNÍ KŘIVKA



Laboratorní stanovení agregace krevních destiček

V roce 1962 O'Brien a Born popsali metodu vyšetření krevních destiček jako alternativní metodu ke zjišťování jejich funkčního stavu.

Laboratorně lze sledovat agregaci v destičkami bohaté plazmě, nebo v plné krvi. Sledujeme-li agregaci bez přidání stimulujících látek mluvíme o tzv. **samovolné (spontánní) agregaci**. Přidáváme-li látky, které mohou vyvolat adhezi nebo agregaci jako je ADP, kolagen, trombin, adrenalin, ristocetin aj., mluvíme o tzv. **stimulované agregaci**. Agregaci zjišťujeme pomocí speciálních přístrojů – agregometrů. Výsledkem vyšetření je **agregační křivka**.

Uvolňovací reakce

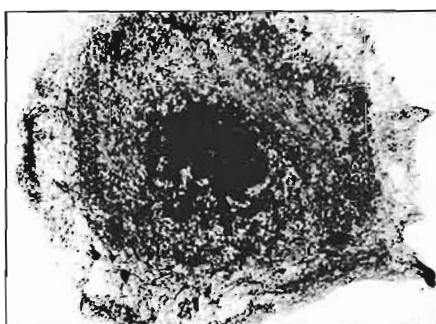
(release reaction)

Při **uvolňovací reakci** dochází k vypuzování (sekreci) obsahu nejprve *alfa* granulí a při silnějším podnětu i denzních granulí, ven z krevní destičky. Krevní **destička se centruje nabývá kulovitého tvaru**. Granule se přesouvají do centra trombocytu (na rozdíl od jiných buněk, u kterých se granule dostávají na okraj buněk) a přes kanálkový systém je vypuzován obsah granulí ven z destičky. Předpokládá se, že membrána α -granulí splyne s membránou kanálkového systému.

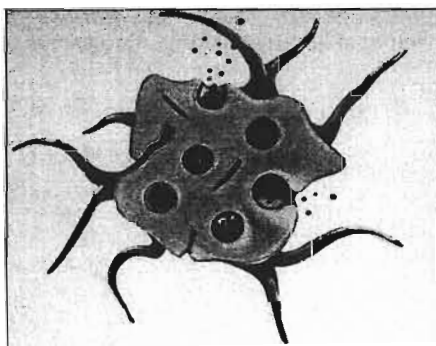
Současně dochází k syntéze a uvolnění dalších aktivačních látek. Na těchto změnách se podílí kontraktilní systém.

Jedná se o látky:

- ◆ **zesilující agregační efekt** (ADP, TXA₂)
- ◆ **vazokonstrikční** (adrenalin, serotonin)
- ◆ **zasahující do procesu srážení krve** (např. PF4)

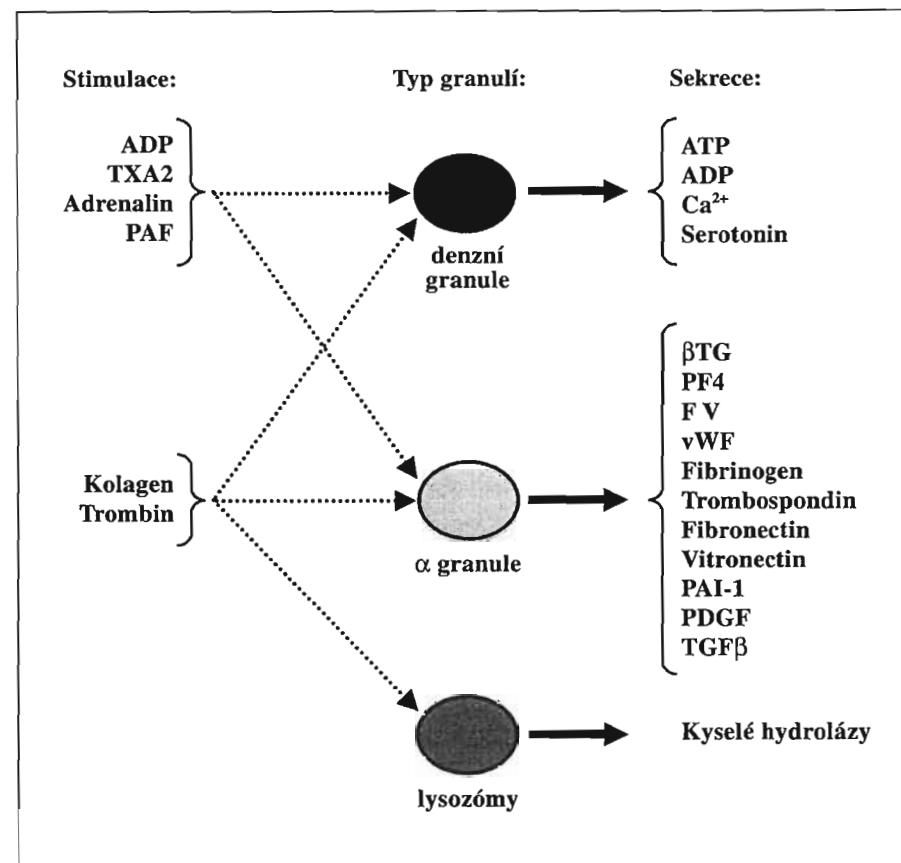


Centrování granulí v trombocyту



- **Některé působky (PF4, β TG), uvolněné během této reakce lze detekovat laboratorně LIA nebo ELISA testy.**

LÁTKY UVOLNĚNÉ Z JEDNOTLIVÝCH GRANULÍ PO STIMULACI

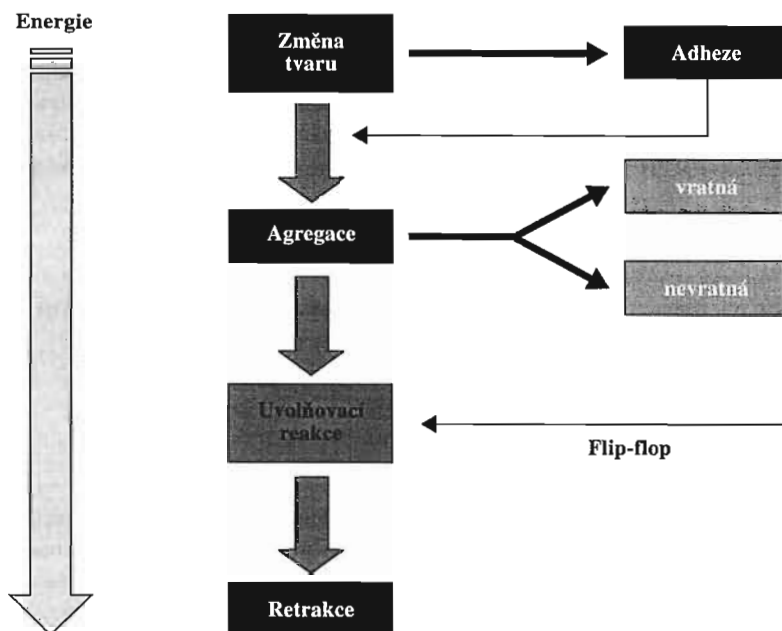


Retrakce krevní destičky

Po určité době dochází ke stažení (kontrakci) destičkového trombu působením cytoskeletárního systému krevní destičky. Tím se obnovuje průchodnost poraněné cévy uzavřené primární hemostatickou zátkou. Retrakce jsou schopné jen živé a funkčně zdatné destičky, které vyžadují značný přísun energie (ATP). Při retrakci dochází k vytlačení séra ze smršťujícího se koagula. Retrakci koagula a také kontrakci cévních stěn podporuje vazba fibrinogenu krevních destiček na destičkový aktin prostřednictvím GpIIb/IIIa.

- **Retrakci koagula lze stanovit buď v plné krvi (měří se množství vytlačené tekutiny), nebo v plazmě bohaté na destičky (měří se schopnost smrštění sloupce vytvořeného z krevních destiček).**

SCHÉMA AKTIVAČNÍCH DĚJŮ V KREVNI DESTIČCE



SLOŽKY PODÍLEJÍCÍ SE NA AKTIVACI KREVNI DESTIČKY

Kolagen

Kolagen je hlavní složka extracelulární matrix a existuje v řadě typů podle struktury a pořadí aminokyselin. Všechny molekuly kolagenu jsou složeny ze tří aminokyselin v tripletní helikální konformaci:

[– Gly – Pro – Hyp –]

Glycin Prolin Hydroxyprolin

–Gly–Pro–Hyp–Gly–Pro–Hyp–Gly–Pro–Hyp–

Tato konformace je umožněna vodivými vazbami mezi aminokyselinami tripletu. Tato formace je nezbytná k **aktivaci krevních destiček**.

➤ Dnes je známo celkem 19 různých kolagenů, které můžeme rozdělit na kolageny tvořící fibrily a kolageny, které fibrily netvoří. Některé kolageny obsahují větší



Struktura kolagenu

úseky nekolagenních složek. V cévní stěně se nachází kolageny: I, III–VI, VIII, XII–XIV. Kolageny jsou hlavně obsaženy v subendoteliálních strukturách a určují trombogenitu poškozené cévní stěny. Dále mají důležitou úlohu při vyvolání aktivace krevních destiček, jejich agregaci a při nastartování reparačních pochodů (Clementson, 1998). Monomerní a fibrilární kolageny efektivně usnadňují adhezi krevních destiček, zatímco k agregaci jsou nutné tripletní helikální struktury kolagenu. **Jako nejúčinnější aktivátor agregace se ukazuje kolagen typu III.**

Adhezivní proteiny

Fyziologická úloha trombocytů je rozhodující mírou zajišťována adhezivními interakcemi aktivovaných trombocytů s:

- solubilními **plazmatickými molekulami**, které jsou součástí koagulační kaskády.
- **membránovými molekulami** exprimovanými na povrchu aktivovaných endotelových buněk
- **molekulami mezibuněčné hmoty bazální membrány** subendoteliální vrstvy

Adhezivní proteiny patří ke skupině plazmatických proteinů, které jsou vyžadovány pro interakce buněčných povrchů. Jde o reakce receptorů, kolagenů nebo jiných strukturálních bílkovin. V hemostáze se uplatňuje řada adhezivních proteinů, mezi které patří: vWF, fibrinogen, fibronectin, trombospondin, vitronectin a jiné.

Adhezivní molekuly jsou na základě strukturální podobnosti členěny do rodin. Na aktivované destičce lze nalézt adhezivní molekuly patřící do selektinové, imunoglobulinové a integrinové rodiny a dále nezařazené adhezivní molekuly. Adhezivní molekuly představují funkčně významný systém, který zajišťuje přenos aktivních signálů do nitra trombocytu.

Faktor von Willebrandův (vWF)

Byl poprvé popsán v r. 1971 Zimmermanem a spol

- MW: 260 kDa – monomer (až 10 000 kDa – multimer)
- Biologický poločas: 6 hodin
- Koncentrace v plazmě: $1,3 \pm 0,3$ IU/ml 10 mg/l

vWF je glykoprotein, tvořený a skladovaný v endotelových buňkách a v α -granulích krevních destičkách (přechází do nich z megakaryocytů). Z endoteliálních buněk je vylučován jednak subendoteliálně a jednak do plazmy (Nieuwenhuis a spol., 1985). U endoteliálních buněk začíná syntéza v endoplazmatickém retikulu a pokračuje v Golgiho aparátu. Předpokládá se, že endotelový a destičkový vWF nejsou funkčně a strukturálně rovnocenné. Nachází se v α granulích krevních destiček, plazmě a subendotelu. V endotelu jej můžeme prokázat v tzv. **Weibelových-Paladeho tělíscích**. Ze zásobních granulí (α granule krevních destiček, Weibel-Paladeho tělíska a subendotel) je vWF uvolňován humorálními podněty.

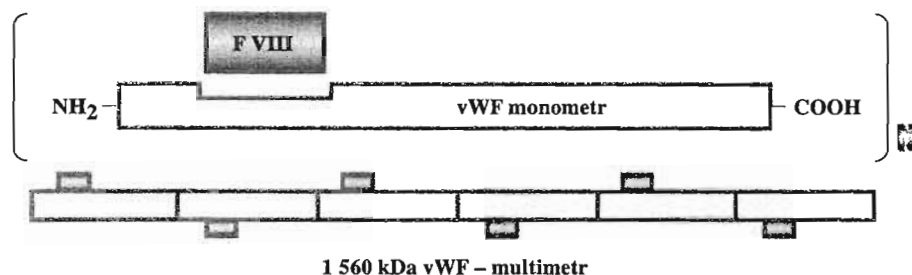
vWF patří k největším molekulám v plazmě, kde tvoří tzv. **multimery**. Základní strukturou vWF je dimér, který vzájemným spojováním vytváří makromolekulární

struktury. vWF tvoří multimery vyvázáním přes disulfidickou vazbu, tak že se připojují konec ke konci stejných částí (buď NH_2 nebo COOH koncem). Směs multimerů je heterogenní od dimerů až po molekuly o MW kolem 10 000 kDa. Multimery vWF jsou největšími lidskými rozpustnými plazmatickými proteiny. Extrémně velké multimery se nachází v endoteliálních buňkách, subendotelu a krevních destičkách a jen ojediněle se vyskytují v periferní krvi. Tyto velké molekuly se uplatňují v systémech adheze a agregace krevních destiček. Plasmin proteolyticky štěpí vWF na 3 různé fragmenty.

Multimery o malé MW jsou uvolňovány z endotelu bez stimulace. Multimery vWF mění tvar své molekuly jsou-li uvolněny do krevního toku. Za normálních okolností zaujímají většinou kulovitý tvar, v krevním toku se molekula protahuje a získává elipsoidní tvary.



Molekula vWF má řadu vazebných míst pro F VIII, heparin, GP komplexy Ib/V/IX a IIb/IIIa a dále pro kolagen (typ I, III a VI). Během normální hemostázy multimery zprostředkují tvorbu destičkové zátky a sice zajišťují propojení destiček přes GP Ib a kolagen v subendoteliálních vrstvách. Abnormity, které vedou ke snížené tvorbě nebo funkčnosti vWF nebo jeho multimerů jsou známy jako *von Willebrandova nemoc*.



vWF také zajišťuje *transport F VIII v plazmě* - je vázán v komplexu s F VIII. F VIII se váže na část molekuly, která je blíže NH_2 konci. Multimery váží na 1 subjednotku jednu molekulu F VIII (poměr 1 : 1), poměr MW je 50 : 1.

Funkce vWF:

vWF hraje podstatnou úlohu v primární hemostáze, ve formaci trombu a v koagulaci. Má dvě podstatné funkce:

- **V primární hemostáze** - spojuje specifická vazebná místa mezi destičkami a cévní stěnou (adheze) a destičkami navzájem (agregace). Podmínkou je správné složení a struktura multimerů - pouze velké multimery jsou schopny plnit funkce

v primární hemostáze. vWF přítomný v subendotelu odpovídá pravděpodobně za více než 50 % adhezivních procesů u krevních destiček. vWF destiček odpovídá za adhezi destiček na kolagen, agregaci destiček a formaci trombu. Molekula GP IIb/IIIa je hlavním vazebným místem pro vWF uvolněný z destiček.

- **V koagulaci** - funkce není závislá na velikosti multimerů. Je nosičem, který váže a stabilizuje FVIII (in vivo a in vitro). Vazba zabráňuje inaktivaci FVIII aktivovaným PC nebo F Xa (pravděpodobně brání interakci molekul s fosfolipidy). vWF zajišťuje přísun F VIII do míst, ve kterých dochází ke srážecím procesům.

Laboratorní stanovení

V plazmě se vyšetřují následující ukazatele:

- ☐ vWF:Ag - vWF antigen
- ☐ RiCo - ristocetinový kofaktor jako funkce aktivity (dříve FVIII:RCO)
- ☐ RIPA - agregace krevních destiček vyvolaná ristocetinem
- ☐ vWF multimery - stanovení multimerů vWF

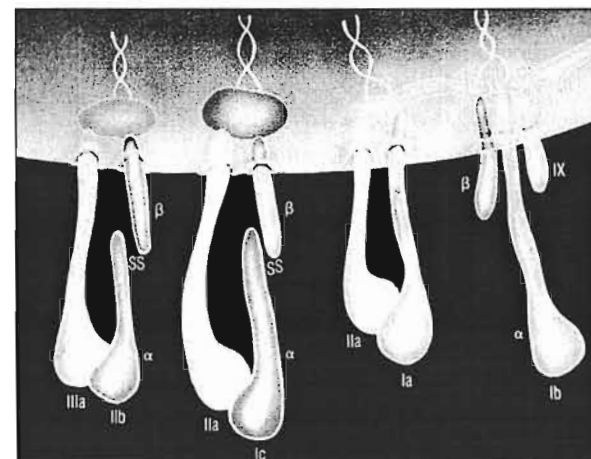
Glykoprotein I (GP I)

MW: 54,2 kDa

Koncentrace v plazmě: 100–200 mg/l.

GP I je jednořetězcový glykosylovaný protein, syntetizovaný v játrech. Proteinový řetězec o 326 aminokyselinách obsahuje 5 opakujících se podobných domén spojených disulfidickými můstky tzv. *Sushiho domény*. GP I je schopen vázat se k aniontovým povrchům jako jsou např.: aniontové vesikuly, krevní destičky, DNA, mitochondrie a heparin. Navázáním na aktivovanou destičku inhibuje s destičkami spojenou protrombinázovou aktivitu a aktivitu adenylátcyklázy. Předpokládá se, že GP I by mohl inhibovat fázi kontaktu v krevní koagulaci.

GLYKOPROTEINY DESTIČKOVÉ MEMBRÁNY



- *GPIb zahrnuje 2 podjednotky α (140 kDa) a β (27 kDa) spojené disulfidickým můstkem (Ault a Knowles, 1995). Terminální aminokyselina domény podjednotky α obsahuje vazebné místo pro vWF (Nieuwenhuis a spol., 1985).*

Glykoprotein V (GPV)

MW: 82 kDa

Koncentrace v plazmě: $32 \pm 8,5 \mu\text{g/l}$.

- *Při užívání orálních antikoagulancií se zvyšuje hladina rozpustného GPV až na hodnoty $112 \pm 28 \text{ mg/l}$.*

GPV je transmembránový glykoprotein, který se nekovalentně váže ke GPIb a GPIX a vytváří komplex v destičkové membráně (Rinder a spol., 1998, Clementson, 1998). Trombin štěpí GPV na 2 fragmenty:

- *f 1* – rozpustný GPV o MW 69 kDa s NH_2 koncem
- *f 2* – o MW 20 kDa, který se váže k membráně destiček

- *Rozpustná forma GPV se nachází u izolovaných destiček po stimulaci trombinem nebo vzniká spontánně během skladování destičkových koncentrátů pro terapeutické účely.*

CHEMOKINY

Platelet factor 4 – PF4

MW: monomer 7 800 Da

tetramer 29 000 Da

Koncentrace v plazmě: $8,3 \pm 5,2 \text{ mg/l}$

Koncentrace/ 10^9 destiček: 11,2–12,4 μg

PF4 je nízkomolekulární protein vázající heparin, který reprezentuje tzv. antiheparinovou aktivitu. Heparin vázající doména je lokalizována na C-konci molekuly, kde jsou lokalizovány lysinové struktury.

STRUKTURA PLATELET FACTOR 4 (PF4)

(domény) – monomer



Heparin vm: vazebné místo pro heparin

V nativním stavu je PF4 homotetramer existující v komplexu s vysokomolekulárním proteoglykanovým proteinem. Zvýšená koncentrace PF4 v plazmě ukazuje na zvýšenou aktivitu krevních destiček in vivo. Jedná se o specifický CXC-chemokin, který je uvolňován z α granulí krevních destiček po jejich aktivaci.

- *Chemokiny jsou peptidy o počtu 70–100 aminokyselin, které mají 4Cys zakončení. Rodina chemokinů se dělí na 2 skupiny:*
 - *CXC chemokiny – α -chemokiny (PF4, β TG) - inhibují proliferaci in vitro*
 - *CC chemokiny – β -chemokiny*

PF4 uvolněný z destiček bývá skladován v hepatocytech a v endotelu. Z hepatocytů může být uvolněn heparinem.

Funkce PF4:

- ☐ váže se na glykozaminoglykanové struktury na povrchu endotelu a neutralizuje tak jejich antikoagulační aktivitu
- ☐ stimuluje připojení fibroblastů k substrátu
- ☐ stimuluje uvolnění histaminu z bazofilů
- ☐ potencuje agregaci krevních destiček
- ☐ podporuje štěpení elastinu elastázou

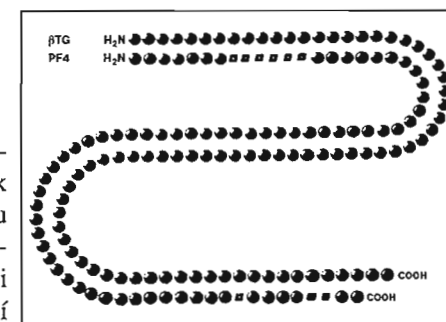
β -tromboglobulin (β TG)

MW: monomer 8 800 Da

tetramer 35 800 Da

Koncentrace/ 10^9 destiček: 8,1–24,2 μg

β -TG je nízkomolekulární protein uvolněný z α granulí krevních destiček a vázající heparin (jeho afinita k heparinu je asi 5krát nižší než afinita PF4). Je podobný PF4, jak strukturou, tak svými vlastnostmi. β -TG je tetramer zahrnující čtyři identické proteinové řetězce o MW 8,8 kDa. Vzniká proteolytickým štěpením prekurzorové molekuly „Low Affinity PF4“ (LAPF-4). Z N-konce molekuly LAPF4 se odštěpí peptid o 4 AMK (NLAK).

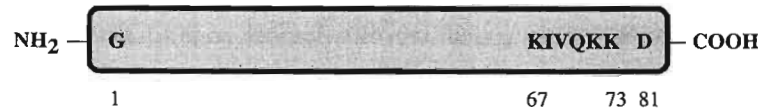


STRUKTURA LAPF-4

(domény)



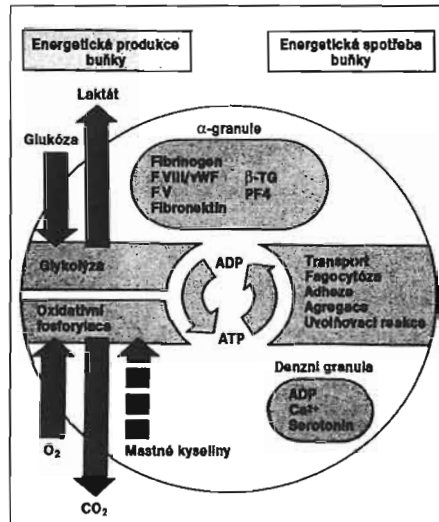
STRUKTURA β TROMBOGLOBULINU (β TG) (domény) – monomer



POPSANÉ ZMĚNY A MECHANISMY, KTERÉ PROBÍHAJÍ V KREVNI DESTIČCE, NELZE VĚTŠINOU PŘESNĚ OHRANIČIT. DOCHÁZÍ K ŘADĚ VZÁJEMNÝCH INTERAKCÍ (INHIBIČNÍHO NEBO AKTIVAČNÍHO CHARAKTERU). VĚTŠINA DĚJŮ PROBÍHÁ SOUBEŽNĚ (ADHEZE, ZMĚNA TVARU, AGREGACE, UVOLŇOVACÍ REAKCE).

3.3.2. Metabolizmus krevní destičky

Krevní destička nemá jádro, proto nemůže syntetizovat DNA a neprobíhá v ní buněčné dělení. Jinak *může vykonávat většinu buněčných funkcí*. K tomu potřebuje krevní destička velké množství energie. Tuto energii získává v mitochondriích. Hlavním zdrojem energetické přeměny je *glykogen*, který je přítomen v krevních destičkách ve značném množství. Produkty glykolytického štěpení jsou dále oxidovány v mitochondriích za vzniku ATP (Philips a Shuman, 1986).



➤ ATP se ze 2/3 ukládá v *zásobním poolu* a z 1/3 je přítomen v *poolu metabolickém*. Ze zásobního poolu se po stimulaci uvolňuje společně se serotoninem. Metabolický pool je lokalizovatelný v cytoplasmě, mitochondriích a membráně. Nemetabolický pool je lokalizován v denzních granulích. Tento pool se nezúčastňuje na metabolismu krevní destičky a při sekreci je vypuzen do vnějšího prostředí. Značné množství energie je potřebné pro viskózní metamorfózu a retrakci. Jestliže obsah ATP v krevní destičce klesne pod 50 % normálního stavu, retrakce probíhá nedostatečně. *Množství uvolněného ADP lze sledovat na speciálně upravených přístrojích – agregometrech po přidání luminiscenčních látek.*

Vyšetřování zaměřené na krevní destičky

Metody zaměřené na vyšetřování krevních destiček a jejich funkce v organismu můžeme rozdělit do těchto bloků:

- počet a parametry krevních destiček
- vyšetření dysfunkce krevní destičky
- vyšetření aktivačních dějů v krevní destičce
- stanovení kinetiky krevních destiček

3.3.3. Funkce krevních destiček v organismu

Krevní destičky plní v organismu více úloh:

- mají vliv na *správnou funkci endotelových buněk*
- účastní se *při zástavě krvácení*: primární hemostatická zátka a aktivace plazmatických koagulačních faktorů
- hrají podstatnou úlohu při chorobném uzavírání nebo ucpání cévy krevní sraženinou – *trombogeneze*
- vykazují *fagocytární aktivitu*

TROMBOCYTY HRAJÍ VÝZNAMNOU ÚLOHU PŘI ZÁSTAVĚ KRVÁCENÍ (HEMOSTÁZE) A PŘI UZÁVĚRU CÉV KREVNI SRAŽENINOU (TROMBÓZE).

Literatura

ANDREWS, N. C., LEVY, J. E. Iron is hot: Update on the pathophysiology of hemochromatosis. *Blood*, 1998, roč. 96, č. 6, s. 1845–1851.

AULT, K. A., KNOWLES, C. In vivo biotinylation demonstrates that reticulated platelets are the youngest platelets in circulation. *Exp. Hematol.*, 1995, roč. 23, s. 996.

AWTRY, H. A., LOSCALZO, J. Aspirin. *Circulation*, 2000, roč. 101, s. 1206–1218.

BARTON, J. C., BERTOLI, L. F. Hemochromatosis: The genetics disorder of the twenty-first century. *Nat. Med.*, 1996, roč. 2, s. 394.

BEUTLER, E., BLUME, K. G., KAPLAN, J. C., et al. International Committee for

Standardization in Haematology. Recommended screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency. *Brit. J. Haematol.*, 1979, roč. 43, s. 465.

BOTTOMLEY, S. S. Secondary iron overload. *Semin. Hematol.*, 1998, roč. 35, č. 1, s. 77–86.

CLEMENTSON, K. J. Platelet collagen receptors: a new target for inhibition. *Haemostasis*, 1998, roč. 28, suppl. 2, s. 84.

CROSBY, W. H. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. A specific test for the disease based on the ability of thrombin to activate the hemolytic factor. *Blood*, 1950, roč. 5, s. 843.

- DACIE, J., LEWIS, S. J. **Practical haematology**. Ninth edition. London: Churchill Livingstone, 2001. 633 s.
- DACIE, J., LEWIS, S. M., TILLS, D. Comparative sensitivity of the erythrocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria to haemolysis by acidified normal serum and by a high-titre cold antibody. *Brit. J. Haematol.*, 1960, roč. 6, s. 362.
- ELIAS, J. M. A rapid sensitive myeloperoxidase stain using 4-chloro-1-naphthol. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1980, roč. 73, s. 797.
- GANZ, T. Hepcidin a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*, 2003, roč. 102, č. 3, s. 783–788.
- GOLDBERG, A. F., BARKA, T. Acid phosphatase activity in human blood cells. *Nature*, 1962, roč. 195, s. 297.
- LI, C. Y., YAM, L. T., LAM, K. W. Esterases in human leucocytes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1973, roč. 21, č. 1.
- GRÜNEBERG, H. Siderocytes a new kind of erythrocyte. *Nature*, London, 1941, roč. 148, s. 469.
- HAM, T. H., DINGLE, J. H. Studies on destruction of red blood cells. II. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: certain immunological aspects of the hemolytic mechanism with special reference to serum complement. *J. Clin. Invest.*, 1939, roč. 18, s. 657.
- HAMBERG, M., SVENSSON, J., SAMUELS-SON, B. Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, roč. 72, s. 2994–2998.
- HARTMANN, R. C., JENKINS, D. E. The „sugar water“ test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *New Engl. J. Med.*, 1966, roč. 275, s. 155.
- HAYHOE, F. G. J., QUAGLINO, D. Cytochemical demonstration and measurement of leucocyte alkaline phosphatase in normal and pathological states by modified azo-dye coupling technique. *Brit. J. Haematol.*, 1958, roč. 4, s. 375.
- HAYHOE, F. G. J., QUAGLINO, D. **Hematological Cytochemistry**. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1988.
- HECHLER, B., LEON, C., VIAL, C., et al. The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood*, 1998, roč. 92, s. 152–159.
- HOTCHKISS, R. D. A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Arch. Biochem.*, 1948, roč. 16, s. 131.
- HYNES, R. O. Integrins: Modulation and signaling in cell adhesion. *Cell*, 1992, roč. 69, s. 11.
- KAPLOW, L. S. Cytochemistry of leukocyte alkaline phosphatase. Use of complex naphthol AS phosphates in azo-dye coupling techniques. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1963, roč. 39, s. 439.
- KROLL, M. H., HARRIS, T. S., MOAKE, J. L., et al. Von Willebrand factor binding to platelet GP Ib initiates signals for platelet activation. *J. Clin. Invest.*, 1991, roč. 88, s. 1568–1573.
- KROLL, M. H., SCHAFER, A. I. The analysis of ligand-receptor interactions in platelet activation. In Joseph, M. (ed). *Immunopharmacology of platelets*. London: Academic Press, 1995, s. 31–65.
- KROLL, M. H., HELLUMS, J. D., MCINTYRE, L. V., et al. Platelets and shear stress. *Blood*, 1996, roč. 88, s. 1525–1541.
- LAPETINA, E. G., SIEGEL, F. L. Shape change induced in human platelets by platelet-activating factor. Correlation with the formation of phosphatidic acid and phosphorylation of a 40,000-dalton protein. *J. Biol. Chem.*, 1983, roč. 258, s. 7241–7244.
- LI, C. Y., YAM, L. T., LAM, K. W. Acid phosphatase isoenzyme in human leukocytes in normal and pathologic conditions. *J. Histochem. Cytochem.*, 1970, roč. 18, s. 473.
- MAYO, K. H., FAN, F., BEAVERS, M. P., et al. RGD induces conformational transitions in purified platelet integrin GP IIb-IIIa-SDS system yielding multiple binding states for fibrinogen gamma Chin C-terminal peptide. *FEBS Lett.*, 1996, roč. 378, s. 79–82.
- MIWA, S., FUJII, H., TAKEGAWA, S., et al. Seven pyruvate kinase variants characterized by the ICSH recommended methods. *Brit. J. Haematol.*, 1980, roč. 45, s. 575.
- NAKAO, M., NAKAO, T., YAMAZOE, S. ATP and maintenance of shape of the human red cells. *Nature*, 1960, roč. 187, s. 945–946.
- NIEUWENHUIS, H. K., AKKERMAN, J. W., HOUDIJK, W. P., SIXMA, J. J. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoproteins Ia. *Nature*, 1985, roč. 318, s. 470–472.
- PARPART, A. K., LORENZ, P. B., PARPART, E. R., et al. The osmotic resistance (fragility) of human red cells. *J. Clin. Invest.*, 1947, roč. 26, s. 636.
- PECKA, M. Laboratorní hematologie v přehledu I., Buňka a krevetvorba. Český Těšín, Finidr, 2002, stran 160.
- PHILLIPS, D. R., SHUMAN, M. A. **Biochemistry of platelets**. Orlando: Academic Press, 1986.
- PHILIPS, D. R., CHARO, I. F., PARISE, L. V., FITZGERALD, L. A. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood*, 1988, roč. 71, s. 831.
- POPPEMA, S., ELEMA, J. D., HALIE, M. R. Alkaline phosphatase positive lymphomas: A morphologic, immunologic and enzyme histochemical study. *Cancer*, 1981, roč. 47, s. 1303.
- POWEL, L. W., JAZWINSKÁ, E., HALLIDAY, J. W. Primary iron overload. In Brock, J. J., Halliday, J. W., Piprard, M. J., Powel, L. W. (Eds). *Iron metabolism in health and disease*. London: Saunders, 1994, s. 227.
- RESSE, J. M., DACIE, J. Complement lysis sensitivity test. *J. Clin. Invest.*, 1966, roč. 45, s. 736–748.
- RINDER, H. M., SCHUSTER, J. E., RINDER, C. S., et al. Correlation of thrombosis with increased platelet turnover in thrombocytosis. *Blood*, 1998, roč. 91, č. 4, s. 1288–1294.
- ROSNER, F., LEE, S. L. Endocrine relationships of leukocyte alkaline phosphatase. *Blood*, 1965, roč. 25, s. 413.
- ROTH, G. J. Developing relationship: Arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib and leucine-rich glycoproteins. *Blood*, 1991, roč. 77, s. 5.
- SELVYN, J. G., DACIE, J. V. Autohemolysis and other changes resulting from the incubation in vitro of red cells from patients with congenital hemolytic anemia. *Blood*, 1954, roč. 9, s. 414.
- SHEEHAN, H. L., STOREY, G. W. An improved method of staining leukocyte granules with Sudan Blaf B. *J. Pathol. Bacteriol.*, 1974, roč. 49, s. 580.
- SCHROIT, A. J., ZWAAL, R. F. A. Transbilayer movement of phospholipids in red

cell and platelet membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, roč. 1071, s. 313–329.

SMETANA, K. Nucleoli in maturing blood cells. *Topic. Rev. Haematol.*, 1980, roč. 1, s. 115–137.

ŠPÍŠEK, R., BARTŮŇKOVÁ, J. Dendritická buňka v imunitě – její role při regulaci imunitní reakce. *Vesmír*, 2003, roč. 82, č. 4, s. 212–214.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for

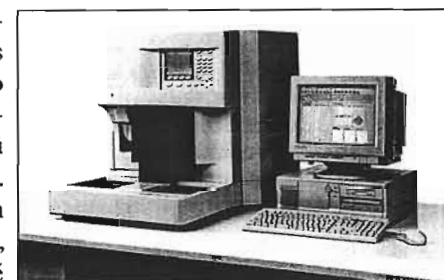
aspirin – like drugs. *Nat. New Biol.*, 1971, roč. 231, s. 232–235.

VOJÁČEK, J. Inhibitory destičkových glykoproteinových receptorů typu IIb/IIIa. *Remedia*, 2003, č. 2, s. 84–92.

YAM, L. T., LI, C. Y., LAM, K. W. Tartrate-resistant acid phosphatase isoenzyme in the reticulum cell of leukemic reticuloendotheliosis. *New Engl. J. Med.*, 1971, roč. 284, s. 357.

4. PARAMETRY KREVNÍCH BUNĚK

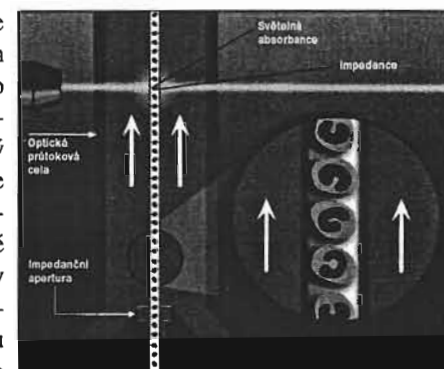
Počet krvinek se v současné době měří na analyzátech krvinek, které dnes poskytují podle typu přístroje od 24 do 48 parametrů včetně diferenciálního počtu leukocytů, histogramů a scategramů erytrocytů, leukocytů a trombocytů. Výhodou těchto analyzátorů je jejich rychlost (100–120 vyšetření/hodina), přesnost, spolehlivost a poměrně malé množství krve potřebné k vyšetření (Groner a Simson, 1995).



Automatický analyzátor krvinek

➤ Dříve se tyto počty zjišťovali ve speciálně upravených komůrkách. Používaly se roztoky, které zvýraznily počítané krvinky a buď lyzovaly nebo nezvýraznily ostatní. Při hodnocení se zjišťovaly počty krevních buněk v jednotlivých částech komůrky a ty se pak buď přepočítávaly nebo přímo vyjadřovaly v odpovídajících jednotkách.

V analyzátech dochází nejprve k tomu, že se buňky pomocí speciálních systémů řadí tak, aby byla pokud možno měřena jen jedna buňka. Současně dochází k naředění krevního vzorku, který se rozdělí do dvou cest. V jedné cestě se počítají erytrocyty a trombocyty (výraznější ředění), ve druhé cestě se po určité úpravě vzorku počítají leukocyty a zjišťuje se jejich rozpočet (méně výrazné ředění). Erytrocyty a trombocyty jsou izovolumetricky sférovány pro jejich snadnější zpracování v analyzátoru. Některé z parametrů se měří přímo, jiné se zjišťují výpočtem z hodnot měřených parametrů (Dacie a Lewis, 2001).



Řazení krevních buněk v analyzátoru krvinek

K měření parametrů krevních buněk se na automatických analyzátech používá buď kapilární nebo žilní krev, která se odebírá za standardních podmínek (International Committée, 1982). Jako antikoagulační přísady se využívá solí kyseliny etylendiaminotetraoctové (K₃EDTA a K₂EDTA). Rozdíl mezi těmito substancemi je v pH, které tyto látky vytváří v systému odebrané krve. pH K₃EDTA se blíží fyziologické hranici pro pH krve, zatímco pH K₂EDTA se pohybuje lehce nad hodnotou 5. Rozdíly jsou i ve fyziologickém působení na krevní buňky a v rozpustnosti obou solí (Goosens a spol., 1991).

- *Nevýhodou solí EDTA je v případě jejich použití, možnost ovlivnění počtu krevních destiček. Soli EDTA mohou v některých případech vyvolat přímou **agregaci krevních destiček** působením na jejich membránové glykoproteiny nebo ovlivní membránu neutrofilů, která pak může vázat krevní destičky na svém povrchu – tzv. **destičkový satelitismus** (International Council, 1993).*

Z měřitelných parametrů krvinek v obvodové krvi lze přímo zjišťovat u:

■ **červené krvinky**

- ◆ počet erytrocytů (RBC)
- ◆ hematokrit (Hct)
- ◆ střední objem erytrocytu (MCV)
- ◆ histogram erytrocytů podle objemu
- ◆ střední průměr erytrocytu (MCD)
- ◆ šíře distribuce erytrocytů (RDW)

Výpočtem:

- ☐ střední tloušťka erytrocytu (MCT)
- ☐ povrch erytrocytu

■ **bílé krvinky**

- ◆ počet leukocytů (WBC)
- ◆ rozpočet leukocytů (diferenciální počet leukocytů)
- ◆ histogram leukocytů podle objemu

■ **krevní destičky**

- ◆ počet krevních destiček – trombocytů (Plt)
- ◆ střední objem trombocytu (MPV)
- ◆ histogram trombocytů podle objemu

Výpočtem:

- ☐ šíře distribuce trombocytů (PDW)
- ☐ destičkový hematokrit (Pct)

- *Stanovení koncentrace hemoglobinu v krvi, střední koncentrace hemoglobinu (MCHC), barvivo v erytrocytu (MCH) a relativní a absolutní počty retikulocytů (Pecka, 2002).*

POČET KRVINEK

Počet krvinek se vyjadřuje počtem krvinek v 1 l krve. Zjišťují se počty:

- ☐ **červených krvinek** (Red Blood Cells – RBC)
- ☐ **bílých krvinek** (White Blood Cells – WBC)
- ☐ **krevních destiček** (Platelets – Plt)

Počítání krvinek

Krvinky lze počítat pomocí:

- ☐ **mikroskopu**
- ☐ **analýzátorů krvinek** (poloautomaty a automaty)

4.1. Principy počítání krevních částic na analyzátorech

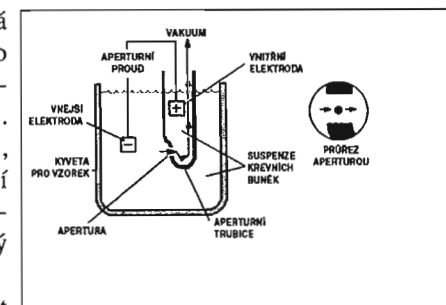
Impedanční princip

U impedančního principu se naředěná suspenze krevních částic násilně vrhá do měřicí kyvety. Vně i uvnitř kyvety je polarizované stejnosměrné elektrické pole. Vnikne-li částice do vstupního otvoru, změní se měrný odpor prostředí a vybudí se určité napětí, které se měří na voltmetru. Napěťový impuls je přímo úměrný objemu částice.

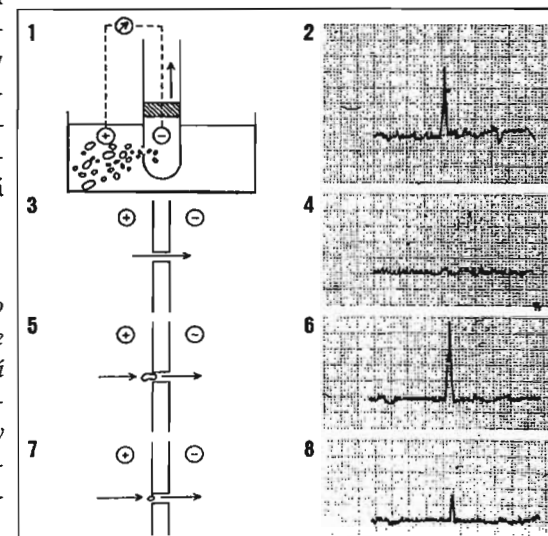
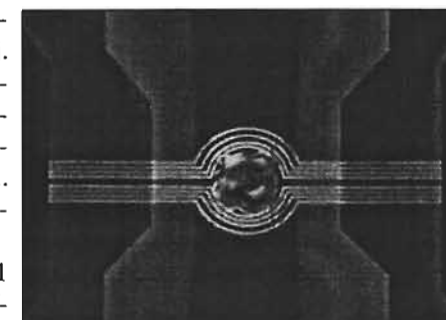
Stejnoseměrný proud nemůže pronikat do vnitřních struktur krevní buňky, protože na buněčné membráně se udržuje poměrně silný záporný elektrický náboj. Dochází k tomu, že buňka je stejnosměrným proudem obtékána, jak je znázorněno na obrázku. Změna napětí vybudí impuls, který lze měřit pomocí voltmetru. Každá buňka vybudí jen jeden impuls, jehož velikost odpovídá objemu částice.

Na dalším obrázku je pod číslem 1 znázorněno schéma impedančního měřicího systému. Vstup větší a menší částice do měřicí soustavy je možné vidět pod čísly 5 a 7. Záznamy příslušných impulsů napětí jsou v částech 2 – běžná částice, 4 – žádná částice, 6 – větší částice a 8 – malá částice.

- *Nevýhoda impedančního systému spočívá v tom, že je měřena prakticky každá částice nebo změna prostředí v daném systému, tedy i prachové částice, krystalky v roztoku nebo vzduchové bubliny.*

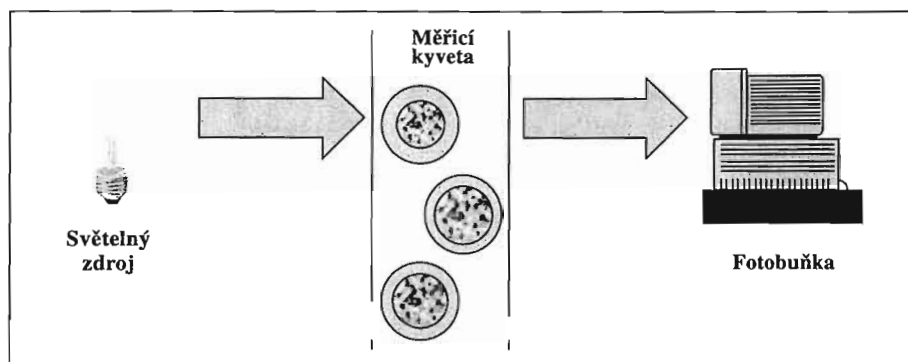


Měřicí apertura s elektrodami a voltmetrem



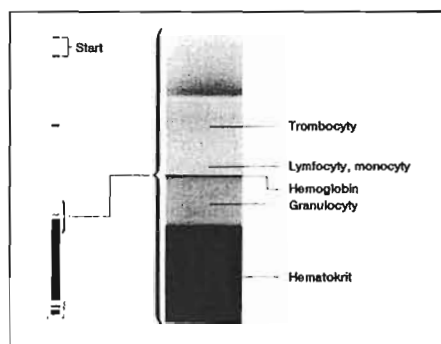
Detekce pomocí světelného paprsku

V systému dochází k násilnému nasávání suspenze krevních buněk, které jsou ve speciálním zařízení řazeny jednotlivě za sebou. V detekční části je umístěn zdroj monochromatického záření nebo slabý laserový zdroj. Buňka, která vstoupí do cesty světelnému záření snižuje jeho optickou hustotu dopadající na fotobuňku a je zaznamenána jako částice.



Centrifugační princip s fluorescencí

Tento detekční systém využívá centrifugačního principu k oddělení jednotlivých buněčných typů. Nejrychleji se usazují nejtěžší krevní buňky – erytrocyty. Na ně postupně nasedají lehčí částice v tomto pořadí: granulocyty, monocyty + lymfocyty a nakonec krevní destičky. Ke snadnějšímu rozlišení jednotlivých buněčných vrstev se používá fluorescenční barvivo, které je součástí měřicí kapiláry. K odečítání koncentrace hemoglobinu slouží skleněné vnitřní centrifugační tělísko, na jehož vnější straně dochází k hemolýze erytrocytů a následně lze odečíst sloupec hemoglobinu jako funkci jeho koncentrace.



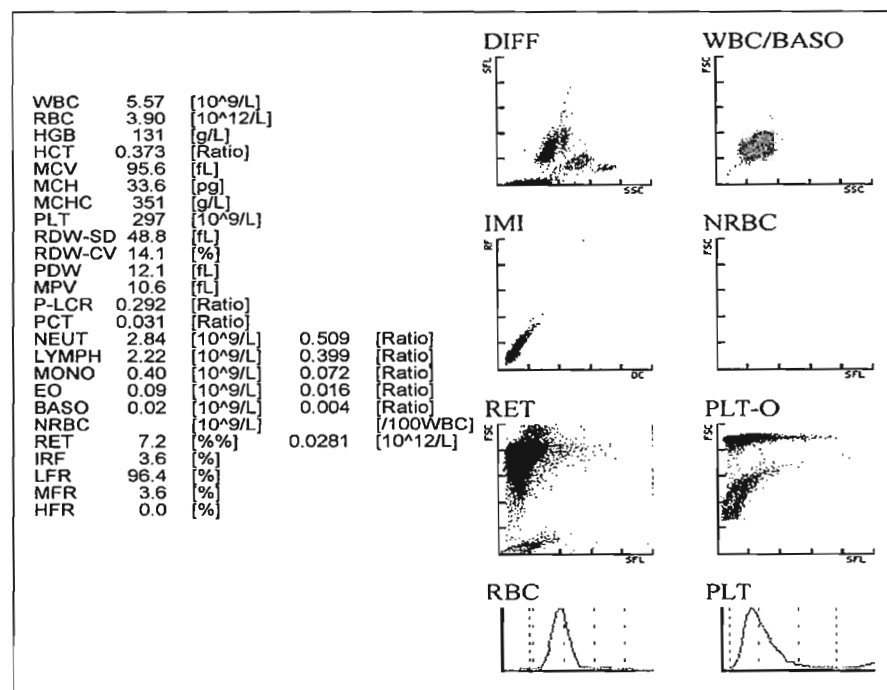
Kapilára a jednotlivá rozhraní pro krevní elementy

➤ Na analyzátoch krevních částic stanovujeme počet červených a bílých krvinek většinou jen impedančně.

Počet krevních destiček lze stanovit 3 různými způsoby:

- **impedančně**
- **opticky**
- **imunologicky** (využívá se specifické protilátky proti povrchovému antigenu CD 61. Jde o specifický glykoprotein GP IIIa z komplexu GPIIb/IIIa (ICSH, 2001).

PŘÍKLAD VÝSLEDKU Z ANALYZÁTORU KREVŇÍCH BUNĚK



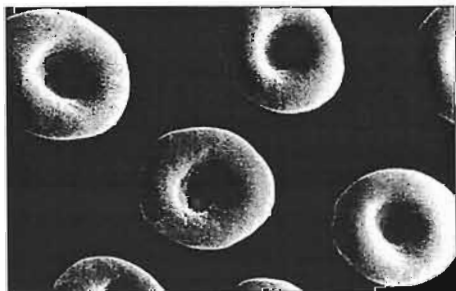
Interference spojené s měřením na analyzátoch krevních buněk

- ❑ Stanovení na analyzátoch krvinek má i svá úskalí a určitá omezení, na která se musí během stanovení pamatovat. Vzorky mohou obsahovat složky nebo látky, které brání přesnému stanovení jednotlivých parametrů na krevních analyzátoch. Při vyšetření parametrů na analyzátoch krvinek se vyskytuje těsná provázanost jedné parametru s jinými (některé se dokonce vypočítávají z měřených parametrů), může pak docházet k tomu, že nepřesné stanovení jedné složky může mít vliv na stanovení jiné složky. Některé interference přitom přímo závisí na vyšetřovací technologii daného analyzátoru (impedanční, optická, imunologická), jiné jsou na způsobu stanovení nezávislé. Poznat možné ovlivnění (interferenci) znamená vydávat správné výsledky, naopak nepoznané interference mohou mít negativní klinické následky.
- ❑ Rozlišujeme **interference plazmatického a buněčného původu**, které mohou ovlivnit jak absolutní počty krevních buněk, ale i diferenciální počet leukocytů. Z látek plazmatického původu jsou to nejčastěji kryoproteiny, paraproteiny, lipidy a heparin (Howard, 1994). Mezi buněčné složky, které ovlivňují převážně počet a rozpočet leukocytů, patří normoblasty, erytrocyty rezistentní na

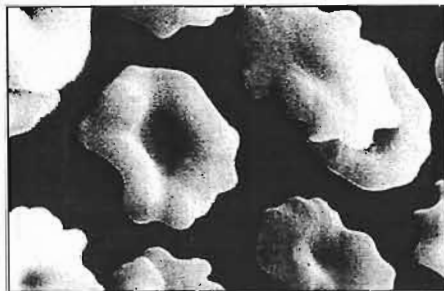
lýzu, velké trombocyty nebo bakteriální kontaminace (i reagensií). Dále se vyskytují jevy, které se projeví v přítomnosti některých složek (např. EDTA): agregace trombocytů, aglutinace neutrofilů a erytrocytů, satelitní fenomén aj. Aglutinaci neutrofilů je možné eliminovat zahřátím vzorku na 37 °C.

- ❑ **Impedanční systémy:** při měření leukocytů se do jejich počtu zahrnují všechny jaderné elementy, tedy i normoblasty, kdežto **optické systémy** normoblasty eliminují a jsou schopny vydat jejich absolutní počty.
- ❑ Za některých, většinou patologických stavů (dědičné i získané abnormality: terčovité erytrocyty – onemocnění jater, talasemie, hemoglobinopatie, novorozenci, sférocytóza) mohou být v krvi přítomny tzv. **na lýzu rezistentní erytrocyty (RRBC)**.
- ❑ Problémy při počítání trombocytů působí přítomnost **agregátů trombocytů** tzv. „clumbs“. Jde buď o nedostatečně promíchaný vzorek s protisrážlivým činidlem nebo se jedná o přítomnost protilátek či může jít o změny na membráně krevních destiček vyvolané přítomností EDTA (pokles je patrný v čase). U všech analyzátorů způsobují destičkové agregáty snížení počtu krevních destiček. V některých případech mohou ovlivnit i počty leukocytů a erytrocytů. Většina analyzátorů na tyto problémy upozorní vydáním hlášky „clumbs“ a atypickými histogramy leukocytů a krevních destiček. U impedančních systému mohou ovlivnit počet krevních destiček i malé erytrocyty (mikrocyty), fragmenty erytrocytů (schizocyty či schistocyty), Howell-Jollyho tělíska, bazofilní tečkování, fragmenty leukocytární cytoplazmy, makrotrombocyty, hypogranulární trombocyty. Na interference s jinými elementy mohou upozornit distribuční křivky trombocytů a erytrocytů. Přítomnost těchto forem ve vzorku vyžaduje následnou mikroskopickou kontrolu. Optické systémy dokáží většinu těchto problémů ošetřit (Dacie a Lewis, 2001).
- ❑ Podstatnou roli hraje i čas, který uplyne od odběru vzorku do jeho zpracování. Dochází ke změnám metabolismu krevních buněk spojený s nedostatečnou tvorbou makroenergetických látek, které udržují funkci a tvar buněk. Tyto změny se pak mohou promítnout do výsledku vyšetření.

ZMĚNA TVARU ERYTROCYTU VE SKLADOVANÉ KRVÍ (ANTIKOAGULANT K₃EDTA)



Normocyty – těsně po odběru



Normocyty – 18 hodin po odběru

Fyziologické hodnoty

Červené krvinky:

Novorozenci:	5 . 10 ¹² /l (počet erytrocytů klesá až do 3. měsíce)
Roční dítě:	4,4 . 10 ¹² /l (počet erytrocytů stoupá pozvolna až do dospělosti)
Muži:	4,3–5,7 . 10 ¹² /l
Ženy:	3,8–4,9 . 10 ¹² /l

- Je nezbytné, aby si referenční hodnoty vytvořila každá laboratoř sama. Hodnoty uvedené v této části je nutné brát jen jako orientační hodnoty vzestupu a poklesu počtu krvinek v závislosti na věku a pohlaví.

Bílé krvinky:

Novorozenci:	20–30 . 10 ⁹ /l
Kojenci:	10–11 . 10 ⁹ /l
1. rok života:	8–10 . 10 ⁹ /l (tento počet se udržuje až do 8–10 let věku)
Dospělí:	4–9 . 10 ⁹ /l (stejný u mužů i žen).

- Fyziologicky počet leukocytů stoupá: po namáhavé práci, po duševním rozrušení, při bolesti, v horku (při úžehu), v těhotenství. U některých jedinců stoupá počet leukocytů i po jídle a v odpoledních hodinách.

Krevní destičky:

Fyziologické hodnoty: 130–380 . 10⁹/l

- U novorozenců je počet destiček vyšší, postupně klesá a kolem 16 roku dosahuje hodnot dospělých osob. Počet destiček se za normálních okolností výrazně **nelíší u mužů a žen**. U žen těsně před menstruací se může počet destiček lehce snížit, ke konci menstruace dosáhne obvykle normálních hodnot. Vyšší počty krevních destiček se pozorují u lidí žijících delší dobu ve vyšší nadmořské výšce (ICSH, 2001).
- V **arteriální krvi** je počet destiček lehce vyšší než v **žilní krvi**. Zjistí-li se počet destiček v **kapilární krvi**, je výsledek zatížen značnou chybou (20–30 %).
- Po **značném fyzickém vypětí** může počet destiček stoupnout až na dvojnásobek normálního počtu.

4.2. Charakteristiky červené krvinky

Hematokritová hodnota (hematokrit)

(Hematocrite – Hct)

Hematokrit udává poměr objemu erytrocytů, které tyto zaujímají k celkovému objemu krve (England a spol. 1972).

Hematokrit se může zjistit:

- **centrifugací nesrážlivé krve** – za standardních podmínek odečtením vrstvy erytrocytů (hematokrit točený v kapilárách se nazývá **mikrohematokrit**)
- **na analyzátoch krevních buněk** – jako integrál impulsů nebo po vynásobení ($Hct = RBC \times MCV$).

- **Fyziologické hodnoty:** muži 0.42–0.52 , ženy 0.37–0.47
- **Klinická interpretace:** hodnota hematokritu může být zkreslena u makrocytární anémie, sférocytozy, talasemie, hypochromní anémie a u srpkovité anémie. U těchto stavů jde o pozměněné formy erytrocytů, u kterých dochází ke změně sedimentačních parametrů oproti normálním hodnotám normocytového hematokritu.

Střední objem erytrocytu

(Mean Cell Volume – MCV) *cell = corpuscular*

Vyjadřuje průměrný objem buňky v hodnocených erytrocytech

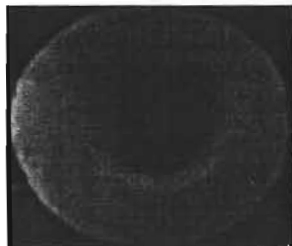
MCV se zjišťuje:

- **přímým měřením na analyzátoch krvinek**
- **výpočtem**

$$MCV = \frac{Hct}{RBC} \text{ (fl)}$$

Hct = hematokrit

RBC = počet erytrocytů

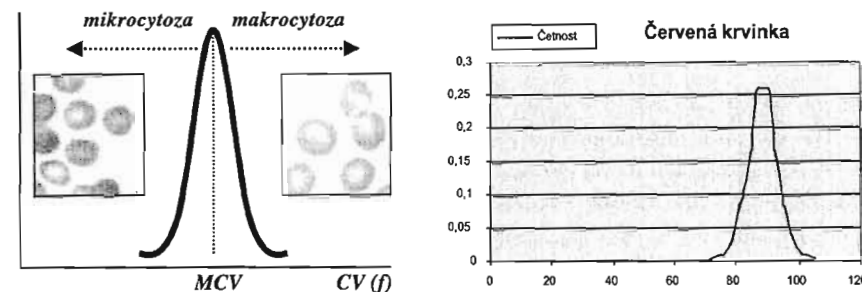


- **Fyziologické hodnoty:** 84–98 fl

- *V porovnání s erytrocyty dospělých jsou erytrocyty novorozenců o něco větší a erytrocyty starších dětí o něco menší.*

Histogram erytrocytů podle MCV

Reprezentuje křivku závislosti středního objemu erytrocytů (MCV) na jejich četnosti.



- **Klinická interpretace:** histogram informuje o normocytoze, mikrocytoze a makrocytoze, případně o přítomnosti erytoblastů.

Šíře distribuce erytrocytů

(Red cell Distribution Width – RDW)

Jde o šíři nejčetnějších populací erytrocytů v histogramu RBC podle MCV.

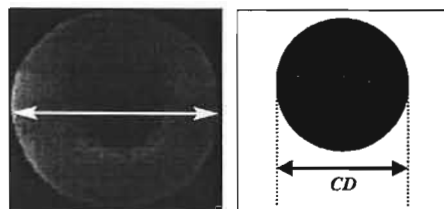


- **Fyziologické hodnoty:** 0,11–0,16
- **Klinický význam:** Informuje o anizocytoze
Většina automatických analyzátorů kalkuluje RDW jako variační koeficient v %, ev. jako RDW-SD (směrodatnou odchylku) ve fl (Bessman a spol., 1983).

Střední průměr erytrocytu
(Mean Cell Diameter – MCD)
cell = corpuscular

Reprezentuje aritmetický průměr speciálním mikroskrobem měřených průměrů erytrocytových terčů v panopticky obarveném krevním nátěru.

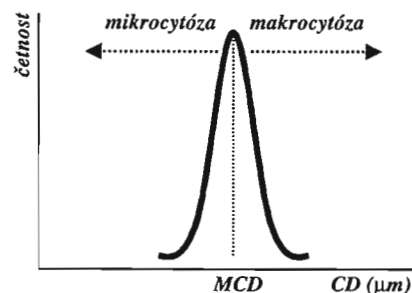
- **Fyziologické hodnoty:** 6,7–7,7 μm



Price-Jonesova křivka

Křivka závislosti průměrů erytrocytu na jejich četnosti

- Dnes v době analyzátorů pro počítání krevních buněk význam tohoto parametru zaniká.



Střední tloušťka erytrocytu
(Mean Cell Thickness – MCT)
cell = corpuscular

Vyjadřuje průměrnou tloušťku měřených erytrocytů

Zjistí se výpočtem:

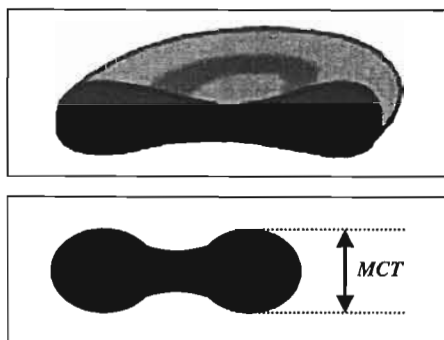
$$MCT = \frac{MCV}{\pi \left[\frac{MCD}{2} \right]^2}$$

*MCD – střední průměr erytrocytu
MCV – střední objem erytrocytu*

- **Fyziologické hodnoty:** 1,7–2,5 μm

Povrch erytrocytu
(Red cell surface area)

- **Fyziologické hodnoty:** 128–160 μm²



4.3. Charakteristiky bílé krvinky

Rozpočet leukocytů

(Diferenciální počet leukocytů – „diferenciál“)

Techniku rozpoznávání různých typů bílých krvinek poprvé zavedl Ehrlich v roce 1898 (rozpoznával krvinky obarvené pomocí anilínových barviv).

Rozpočet leukocytů lze stanovit na:

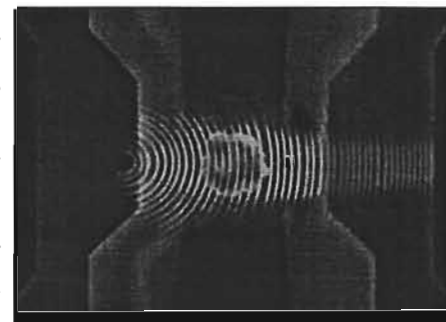
- **analyzátořech krvinek**
- **mikroskopicky** v obarveném nátěru

Analyzátoř krvinek

Analyzátoř krvinek poskytují buď tzv. „**třípopulační diferenciál**“ nebo „**pětipopulační diferenciál**“. Pětipopulační doferenciál rozlišuje v bílé řadě lymfocyty, monocyty, bazofily, eozinofily a neutrofilů. Není schopen odlišit nesegmentované formy neutrofilů (tyče) od segmentovaných forem. Toto odlišení lze v současné době provést jen mikroskopickým hodnocením, pokud se nezvažují jiné drahé techniky (např. imunofenotypizace). Třípopulační diferenciál rozliší populaci krevních buněk s malým, středně velkým a velkým jádrem (Dacie a Lewis, 2001).

- *Třípopulační diferenciál tedy v žádném případě nedokáže přesně odlišit lymfocyty, neutrofilů a tzv. střední populaci krevních buněk (bazofily, eozinofily, monocyty), jak je v řadě učebnic a literárních odkazů často citováno.*

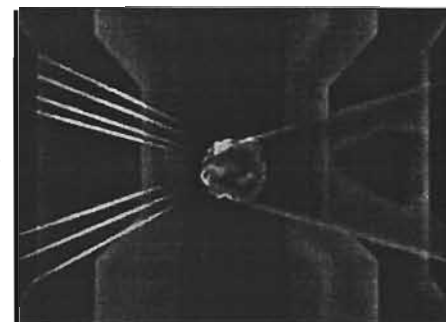
Rozlišení bílých krvinek se provádí v naředěném krevním hemolyzátu, ve kterém jsou bílé krvinky zbavené cytoplazmy, hodnotí se vlastně holá jádra leukocytů.



Vysokofrekvenční elektrické pole

K rozlišení holých jader se používá těchto technik:

- vysokofrekvenční střídavé elektrické pole
- fluorescence a imunofluorescence
- laser – optická analýza (světelný paprsek a rozptýl světelného paprsku)
- cytochemické metody
- průtoková cytometrie



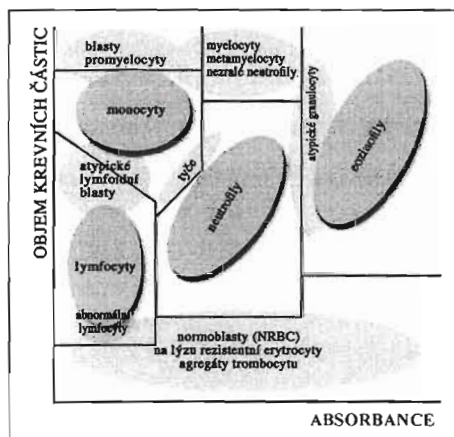
Laserová technika

- spektrofotometrie
- hydrodynamická fokusace
- softwarová analýza

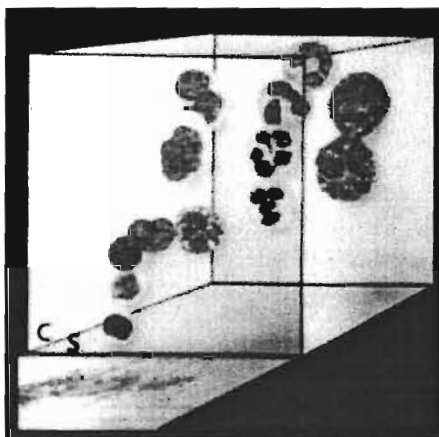
Některé automaty s pětipopulačním rozpočtem leukocytů poskytují i počty normoblastů (NRBC – normoblast red blood cell), případně kvantitativní zastoupení atypických nebo velkých lymfocytů. Současně formou „hlášek“ upozorňují na přítomnost nezralých granulocytů, blastických forem a některých atypických forem v červené, bílé a destičkové řadě (Hoffmann, 2004, van der Meer a spol., 2004). Jsou dále schopny upozornit a oddělit populaci tzv. *erytrocytů rezistentních na lýzu* (rezistant red blood cells – RRBC), jejichž přítomnost v krvi ovlivňuje jak počet erytrocytů (RBC), tak i leukocytů (WBC) spolu s diferenciálním rozpočtem (snížení RBC, zvýšení hodnot WBC a lymfocytů). Některé z analyzátorů mají speciální ochranné systémy, které mohou po určité době, která zahrnuje delší hemolýzu vzorku v analyzátoru, tyto počty upravit (Mellors, 1995).

Hodnocení rozpočtu bílých krvinek na analyzátozech krvinek

Analyzátozy krvinek využívají k rozlišení jednotlivých morfologických typů krvinek dříve vyjmenované principy, pomocí nichž speciálně upravenými softwarovými programy pomyslně distribuují krvinky do určitých prostorových oblastí – vytváří prostorové histogramy tzv. scategramy.



Scategram leukocytů podle MCV a absorpce

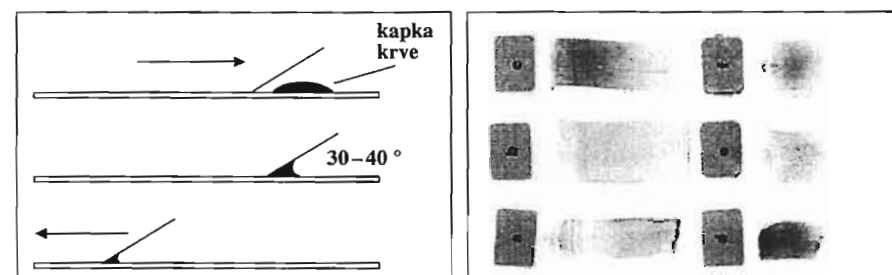


Prostorové rozdělení leukocytů

Mikroskopická stanovení

Krevní nátěry se provádí z kapilární nebo žilní krve. Jako antikogulační přísady se používá solí EDTA.

PŘÍPRAVA KVALITNÍCH NÁTĚRŮ PERIFERNÍ KRVE



Příprava nátěru periferní krve

K hodnocení vhodné nátěry (c, f)

Nátěry je nezbytné provést do 3–4 hodin po odběru, jinak může dojít ke změnám v některých krevních buňkách. K hodnocení je nutné připravit kvalitní nátěry. Ke sledování morfologie erytrocytů se používají tenké nátěry, zatímco u leukopenií jsou vhodnější nátěry silnější (Marthy a Koepke, 1974).

- Sílu nátěru u manuální metody lze ovlivnit úhlem, který svírá roztěrové sklíčko s podložním sklíčkem. V současné době nejvhodnější nátěry se standardní a srovnatelnou úrovní se získávají na barvicích automatech. Některé z automatů při zhotovení nátěru berou v úvahu hodnotu hematokritu.

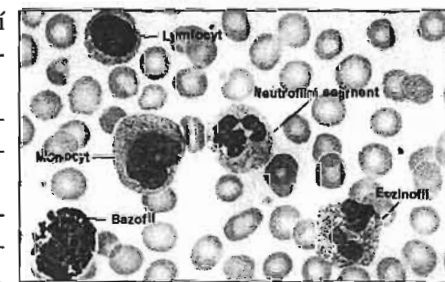
Při diferencování se zjišťuje zastoupení morfologických typů buněk bílé řady v obarveném nátěru obvodové krve.

Zásady pro morfologické hodnocení jednotlivých buněčných typů

Prohlíží a hodnotí se zvlášť buňka, jádro a plazma.

Hodnotí se:

- ❑ **buňka** – velikost, tvar, vzhled, umístění v nátěru, porovnání s ostatními buňkami.
- ❑ **jádro** – velikost, uložení, tvar, uspořádání chromatinu, dále počet, velikost a vzhled jaderek.
- ❑ **plazma** – množství, vzhled, barvitelnost, výběžky, vakuolizace, perinukleární vyjasnění, granulace a inkluze.



- Přechody mezi jednotlivými vývojovými stadii buněk jsou plynulé a proto není vždy snadné zařadit určitou buňku do příslušné kategorie. Musíme si uvědomit i to, že žádná charakteristika dané buňky není pro ni přísně specifická.

V rámci hodnocení periferního krevního obrazu se dále zjišťuje:

- **zastoupení normoblastů** (je nutný následný přepočet leukocytů)
- **posun v rámci vyzářování buněčných forem** (posun k mladším nebo starším vývojovým formám)
- **anomálie v buňkách jednotlivých krvetvorných řad** (červené, bílé a destičkové)
- **výskyt některých dalších buněčných forem** (holá jádra megakaryocytů, nezralé vývojové formy krvetvorných řad)
- **výskyt parazitů** (v erytrocytech, makrofázích, krvi)
- někdy se provádí **odhad počtu trombocytů**

VÝVOJ ZASTOUPENÍ JEDNOTLIVÝCH BUNĚČNÝCH TYPŮ OD NOVOROZENCE DO DOSPĚLOSTI

Novorozenci

nesegmentované granulocyty:	0,20–0,40
segmentované granulocyty:	0,35–0,55

Celkem neutrofilny: 0,75

- Od 4. dne po narození počet neutrofilních granulocytů klesá a 8. den je jejich diferenciální počet již jen 0,45. Současně stoupá počet lymfocytů. Jejich relativní počet může ve 3. až 6. měsíci dosáhnout až dvojnásobku relativního počtu granulocytů. V porovnání s dospělými bývá u novorozenců zvýšen podíl velkých lymfocytů.
- V dalším období dochází k poklesu lymfocytů.
- Ve 4–5 letech převažují již opět granulocyty nad lymfocyty.

Dospělí

Typ leukocytu	Relativně	Absolutně
Nesegmentované granulocyty	0,01–0,02	0,2–0,4 . 10 ⁹ /l
Segmentované granulocyty	0,54–0,69	2,5–5,6 . 10 ⁹ /l
Eozinofilní granulocyty	0,03– 0,05	0,03–0,25 . 10 ⁹ /l
Bazofilní granulocyty	0,005–0,01	0,0–0,03 . 10 ⁹ /l
Lymfocyty	0,25–0,39	1,2–3,1 . 10 ⁹ /l
Monocyty	0,03–0,08	0,15–0,58 . 10 ⁹ /l

Absolutní a relativní počty buněk

Relativní počet

Je zastoupení určitého morfologického typu (A) v počítaném celku (B), Nejčastěji se hodnotí 100, 250 anebo 500 buněk.

$$\text{relativní počet} = \frac{A}{B}$$

$$\text{Absolutní počet} = \text{relativní počet} \times \text{celkový počet buněk}$$

- **Příklad:** Při hodnocení 100 buněk jsme našli 35 lymfocytů,

$$\text{Relativní počet lymfocytů} = \frac{35}{100} = 0,35$$

Absolutní počet

Je zastoupení určitého morfologického typu buněk v určitém objemu.

- **Příklad:** v 1000 hodnocených erytrocytech bylo nalezeno 18 retikulocytů, RBC = 4,52 . 10¹²/l, Relativní počet retikulocytů = 0,018
Absolutní počet retikulocytů = 0,018 . 4,52 = 0,08 . 10¹²/l

4.4. Charakteristiky krevní destičky

Sřední objem krevní destičky
(Mean Platelet Volume – MPV)

MPV se měří na analyzátoch krvinek. Většinou jde o přímo měřenou veličinu. **MPV vyjadřuje průměrný objem buňky v hodnocených trombocytech.**

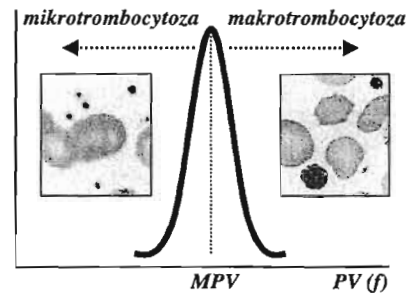
- **Fyziologické hodnoty:** 7,8–11,5 fl

Histogram distribuce podle MPV

Reprezentuje křivku závislosti středního objemu destiček (MPV) na jejich četnosti.

Histogram podle MPV se získává na analyzátoch krevních částic. Zjišťuje se objem trombocytů (horizontální osa) a jejich četnost (vertikální osa).

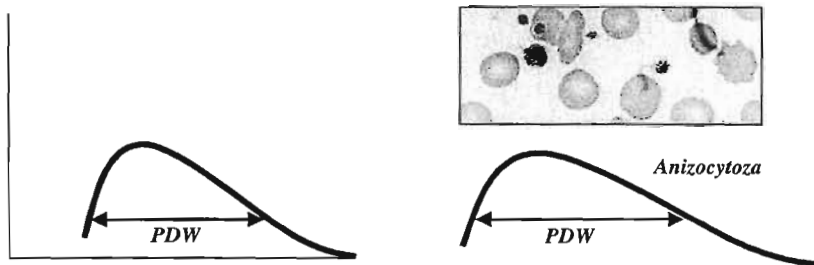
- **Klinické použití:** Graf nás informuje o mikrotrombocytech, makrotrombocytech nebo o přítomnosti shluků (clumps) krevních destiček.



Šíře distribuce destiček
(Platelet Distribution Width – PDW)

V případě PDW se jedná o šíři nejčetnějších populací trombocytů v jejich histogramu podle MPV.

PDW reprezentuje šíři histogramu distribuce krevních destiček podle jejich objemu. Informuje nás o anizocytoze trombocytů.



- **Fyziologické hodnoty:** 15,5 – 17,1 % (0,155 – 0,171)

Destičkový hematokrit
(Platelet critique – Pct)

Pct nás informuje o tom, jakou část objemu v celkovém objemu plazmy zaujímají destičky.

Tato hodnota se získá ze vztahu: $Pct = Plt \times MPV$

- **Fyziologické hodnoty:** 0,15–0,30
- **Klinické použití:** zvýšené hodnoty se nachází u trombocytoz a makrotrombocytů, Snížené hodnoty mohou být u trombocytopenií a mikrotrombocytů.

4.5. Některé nové parametry krevních buněk

Některé přístroje z řady pětipopulačních analyzátorů krevních buněk poskytují další parametry krevních buněk zejména z oblasti červené krevní řady. Jejich význam pro kliniku se teprve zkoumá a zjišťuje.

Některé parametry červené krevní řady

Parametry erytrocytu

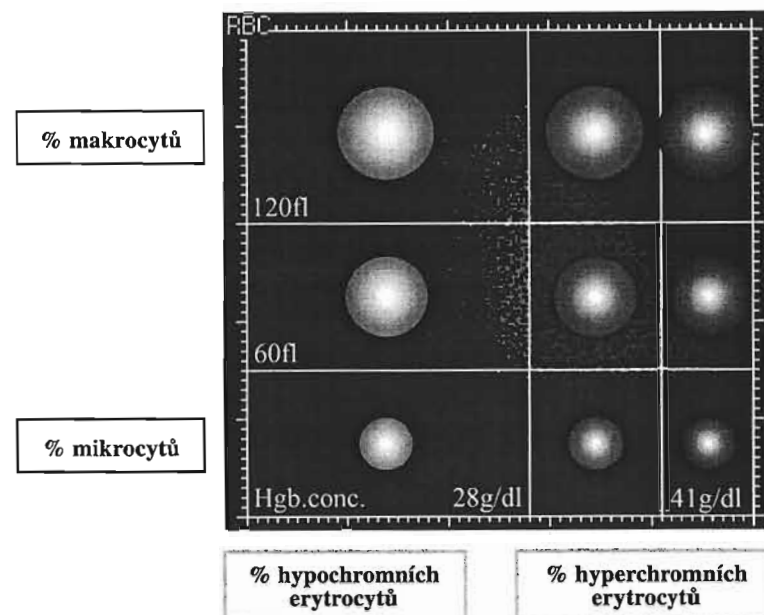
- ☐ **CHCM** (Corpuscular hemoglobin concentration mean) – jde o hodnotu MCHC, u které je měřen intracelulární hemoglobin
- ☐ **CH** (Corpuscular hemoglobin content) – jde o hodnotu MCH, u které je měřen intracelulární hemoglobin
- *Hemoglobin je měřen průtokovým cytometrem přímo v každém erytrocytu, na rozdíl od MCHC, u kterého je hemoglobin měřen spektrofotometricky (u spektrofotometrické metody se měří hemoglobin v erytrocytu, ale současně i hemoglobin extracelulární – volný hemoglobin).*
- ☐ **CHDW** (Cellular hemoglobin distribution width) – index distribuce podle hmotnostního poměru hemoglobinu zastoupeného v erytrocytu
- ☐ **HDW** (Hemoglobin concentration distribution width) – index distribuce podle poměrového zastoupení hemoglobinu v erytrocytu
- ☐ **F-RBC** (Fragments of erythrocytes) – fragmenty erytrocytů
- ☐ **PHE** (Percentage of hypochromic erythrocytes) – procento hypochromních erytrocytů
- ☐ **NRBC** (Normoblast cells) – normoblasty (kvantitativní zastoupení)

Procento hypochromních erytrocytů (PHE)

Přímo se měří koncentrace Hb a MCV na základě rozptylu laserového paprsku a vyhotoví se dvojrozměrné grafické znázornění s procenty zastoupení populací erytrocytů. Zjišťují se erytrocyty s koncentrací hemoglobinu < 280g/l a měří se % hypochromních erytrocytů (PHE).

- **Fyziologické hodnoty:** muži PHE < 10 %
ženy: PHE < 20 %
 - **Klinické použití:** PHE poskytuje přehled aktivity erytropoézy v posledních 8–12 týdnech.
 - suspektní deficit Fe: ženy PHE 20–40 %
muži PHE 10–40 %
 - deficit Fe PHE > 40%
- PHE se zvyšuje při funkčním deficitu Fe.

DIAGRAM K ROZLIŠENÍ PHE



Parametry retikulocyty

- ☐ **Ret/Ret** – absolutní a relativní poměr retikulocyty (Ret)
- ☐ **MCVr** (Mean corpuscular volume in reticulocytes) – střední objem retikulocyty
- ☐ **DWr** (Distribution width in reticulocytes) – distribuční šířka retikulocyty podle MCVr
- ☐ **CHCMr** (Corpuscular hemoglobin concentration mean in reticulocytes) – jde o hodnotu MCHC retikulocyty, u kterého je měřen intracelulární hemoglobin
- ☐ **CHr** (Corpuscular hemoglobin content in reticulocytes) – jde o hodnotu MCH retikulocyty, u kterého je měřen intracelulární hemoglobin
- ☐ **CHDWr** (Cellular hemoglobin distribution width in reticulocytes) – index distribuce podle hmotnostního poměru hemoglobinu zastoupeného v retikulocyty
- ☐ **HDWr** (Hemoglobin concentration distribution width reticulocytes) – index distribuce podle poměrového zastoupení hemoglobinu v erytrocytu

Zastoupení hemoglobinu v erytrocytu (CHr)

CHr informuje o aktuálním obsahu hemoglobinu v retikulocyty a je tedy časným indikátorem deficitu Fe (citlivější indikátor než feritin nebo saturace transferinu – vazebná kapacita Fe). Po podání Fe dojde k vzestupu CHr.

ROZDÍLY VE VÝPOVĚDNÍ HODNOTĚ PHE A CHr

PHE



Informuje o koncentraci Hb v erytrocytu
za posledních 8–12 týdnů

CHr



Informuje o aktuálním obsahu Hb
v erytrocytu vznikajících z retikulocytů

Literatura

BESSMAN, J. D., GILMER, P. R., GARDNER, F. H. Improved classification of anaemias by MCV and RDW. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1983, roč. 80, s. 332–335.

DACIE, J., LEWIS, S. J. Practical haematology. Ninth edition. London: Churchill Livingstone, 2001. 633 s.

ENGLAND, J. M., WALFORD, D. M., WATERS, D. A. W. Reassessment of the reliability of the haematocrit. *Brit. J. Haematol.*, 1972, roč. 23, s. 247.

GOOSENS, W., VAN DUPPEN, V., VERWILGHEN, R. J. K2 a K3EDTA: the anticoagulant of choice in routine haematology? *Clin. Lab. Haematol.*, 1991, roč. 13, s. 291–295.

GRONER, W., SIMSON, E. Practical guide to modern haematology analyzers. Chichester: Wiley, 1995.

HOFFMANN, J. J. M. L. How useful are hematology analyse flags? *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2004, roč. 42, s. 357–358.

HOWARD, C. A. An atypical spike in a platelet histogram caused by a type I cryo-globulinaemia. *Medicine*, 1994, roč. 73, s. 770–774.

ICSH (Expert Panel on Cytometry) and International Society of Laboratory Haematology (ISLH). Task-force on Platelet counting by the PLT/RBC ratio – a reference

method. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 2001, roč. 115, s. 460–464.

International Council for standardization in haematology. Recommendations for EDTA anticoagulation of blood for hematology testing. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1993, roč. 100, s. 371–372.

MARTHY, K. A., KOEPKE, J. A. The clinical usefulness of segmented vs stab neutrophil criteria for differential leucocyte counts. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1974, roč. 61, s. 947.

MELLORS, I., MCARDLE, P., BELL, D. Pseudoleucocytosis due to incomplete erythrocyte lysis. *Clin. Lab. Haematol.*, 1995, roč. 17, s. 347–350.

PECKA, M. Laboratorní hematologie v přehledu I., Buňka a krvetvorba. Český Těšín, Finidr, 2002, stran 160.

National Committee for clinical laboratory standards. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. Document H3-A3. NCCLS. Vilanova: 1991, roč. 11.

VAN DER MEER, W., SCOTT, C. S., DE KEIJZER, M. H. Automated flagging influences the inconsistency and bias of band and atypical lymphocyte morphological differentials. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2004, roč. 42, s. 371–377.

Patofyziologie nemocí krevních buněk

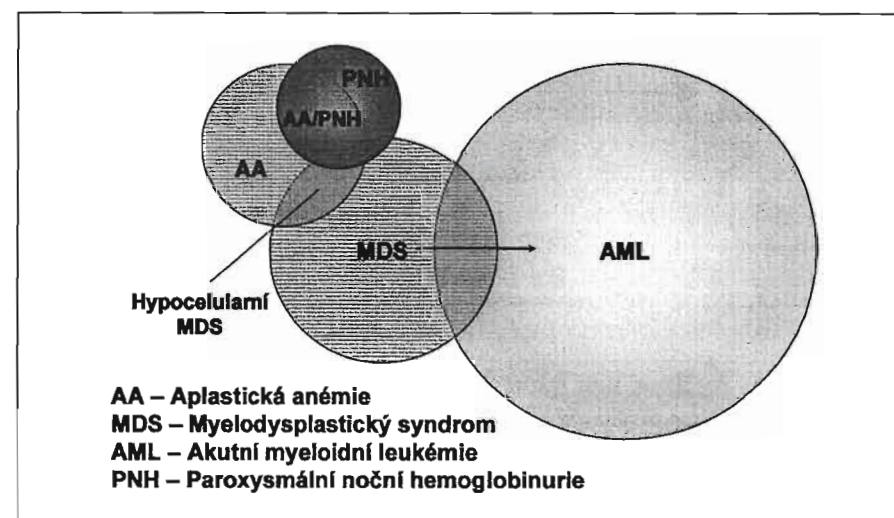
1. NEMOCI HEMATOPOETICKÉ KMENOVÉ BUŇKY

Poškození na úrovni hematopoetické kmenové buňky se může projevit různými klinickými syndromy (*Brodský a spol., 2004*):

- ❑ **Aplazií myeloidní řady** – nedostatečná tvorba hematopoetických kmenových buněk (dřeňové útlumy – aplastické anémie).
- ❑ **Myelodysplazií** – porucha diferenciace, maturace a apoptózy (myelodysplastický syndrom, paroxysmální noční hemoglobinurie).
- ❑ **Abnormální myeloproliferací** – patologickou proliferací aktivitou hematopoetické buňky, která se projevuje převahou proliferace některé z myeloidních řad.

Mezi aplazií, myelodysplazií a myeloproliferací existují plynulé přechody (*Klener, 2003*).

VZÁJEMNÉ PŘECHODY A PŘEKRYVY MEZI NĚKTERÝMI PATOFYZIOLOGICKÝMI STAVY



Do této části patří tyto syndromy:

- ❑ **Dřeňové útlumy**
- ❑ **Paroxysmální noční hemoglobinurie** – viz kapitola „Anémie“
- ❑ **MDS** – viz kapitola „Myelodysplastický syndrom“

➤ *Myelodysplastický syndrom je zařazen mezi nádorová onemocnění. Paroxysmální noční hemoglobinurie je zařazena vzhledem ke svým projevům do skupiny*

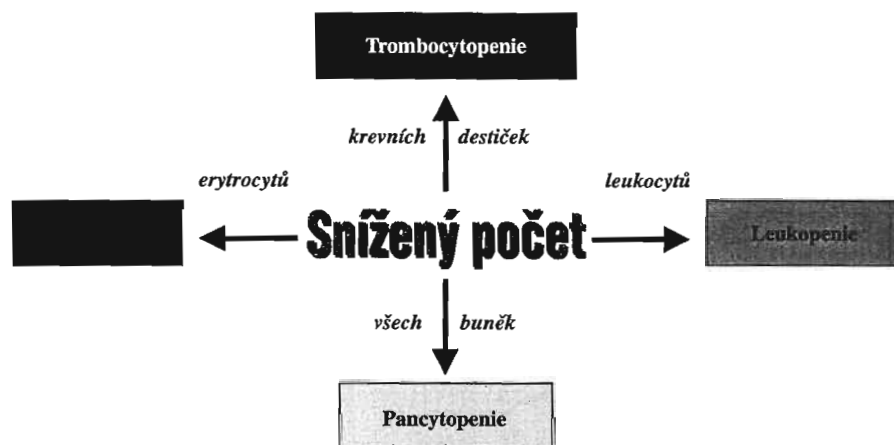
hemolytických anémií, ale vzhledem k tomu, že u ní jde o poruchu kmenové buňky, patří i do této skupiny.

U těchto stavů může docházet k některým kvantitativním změnám v periferní krvi a kostní dřeni.

A. Cytopenie v periferní krvi

- ☐ pokles erytrocytů – *anémie*
- ☐ pokles leukocytů – *leukopenie*
- ☐ pokles trombocytů – *trombocytopenie*
- ☐ pokles všech buněk – *pancytopenie*

STAVY SE SNÍŽENÝM POČTEM BUNĚK V OBVODOVÉ KRVÍ



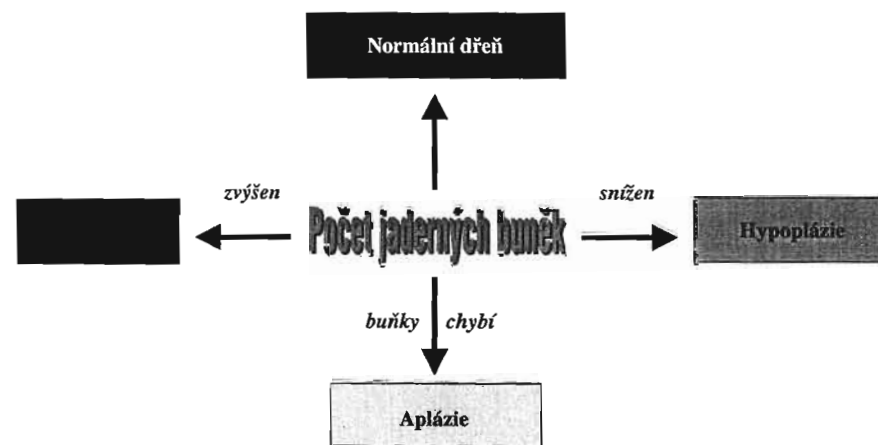
K cytopenii v periferní krvi (pancytopenii) může dojít z řady příčin:

- ◆ *poškozením kmenových buněk (aplastická anémie)*
- ◆ *infiltrací kostní dřene (leukemie, lymfom, myelom, karcinom)*
- ◆ *destrukcí buněk v periferní krvi (těžké infekce, imunitní mechanismy, hemolýza)*
- ◆ *metabolickou poruchou vývoje buněk (megaloblastová anémie)*

B. Stavy se změnami buněčnosti v kostní dřeni

- ☐ snížení počtu jaderných buněk – *hypoplazie*
- ☐ vymizení jaderných buněk – *aplazie*
- ☐ zvýšení počtu jaderných buněk – *hyperplazie*

STAVY POČTU JADERNÝCH BUNĚK V KOSTNÍ DŘENI



1.1. Dřeňové útlumy

(Aplastické anémie)

Aplastická anémie byla poprvé popsána v r. 1888 Ehrlichem (Ehrlich, 1888).

Aplastickými anémiemi nazýváme heterogenní skupinu nemocí, při kterých dochází k **pancytopenii v periferní krvi** vyvolanou následkem **hypoplazie kostní dřeně** se sníženou produkcí všech elementů, **bez přítomnosti primární choroby** infiltrující či nahrazující kostní dřeň. Jde tedy o selhání krvetvorby vyvolané **porušenou činností nebo úbytkem hematopoetických kmenových buněk kostní dřeně** zahrnující sníženou produkci buněk vývojových řad (erytrocytů, trombocytů a leukocytů).

➤ *Jedná se o úbytek hematopoetických kmenových buněk CD34+ a progenitorových buněk myeloidní řady. Parenchym kostní dřeně je postupně nahrazen tukovou kostní dřeň. Následkem toho je produkční kapacita dřeně tak nízká, že dřeň není schopna vyrovnávat ztráty způsobené destrukcí krevních buněk (Maciejewski a spol., 1995).*

Příčina: U aplastické anémie je **narušena normální funkce hemopoetické kmenové buňky**. Ta je porušena hlavně ve své **schopnosti sebeobnovy a zachování konstantního poolu kmenových buněk, méně v jejich schopnosti proliferovat a diferencovat** (na rozdíl od MDS). Příčinou může být buď toxické poškození kostní dřeně nebo příčina není známa.

Předpokládá se:

- ☐ **poškození na úrovni hemopoetické kmenové buňky, které vyvolá:**
 - snížení počtu kmenových buněk
 - poškození kmenové buňky
- ☐ **působení faktorů prostředí na kmenové buňky**, zejména faktorů imunologických.

Mezi látky nebo vlivy, které mohou ovlivnit stav hematopoetické buňky patří:

- ◆ **Chemické látky a radiace** – stavy mohou být vyvolány různými chemickými a fyzikálními vlivy, případně některými metabolity.
 - **ionizující záření** (alfa, beta, gama, rtg) - nekontrolovatelná expozice záření (např. následkem havárie jako byl Černobyl)
- **Vysokofrekvenční záření gama** (10^{19} – 10^{22} Hz) uvolňuje faktory o vysoké energii, které jsou schopny narušit chemické vazby v molekulách biologických struktur a mohou vyvolat buněčnou mutaci.
- **Záření o nižší frekvenci - UV** (10^{15} – 10^{19} Hz) může vyvolat v biologickém materiálu změny, které vedou k indukci elektrického proudu v buňkách, které se v důsledku záření zahřívají.
- **Méně je známo o účincích částicového (alfa,beta) záření na buňky.**

- **toxické látky** (benzen a jeho deriváty, toluen, některé kovy v koloidní nebo tekuté formě – zlato, stříbro, rtuť, insekticidy apod.) – *nejčastěji jde o vdechování par.*
- **léky** (cytostatika, chloramfenikol, sulfoamidy, penicilamin, analgetika, diuretika – furosemid, kortikoidy, antiseptika apod.) – *aplazie je vyvolána buď dlouhodobým podáváním léku nebo jeho přecitlivělostí.*

➤ *V roce 1991 stanovila světová zdravotnická organizace (WHO) určitá kritéria pro kausální účinek léku. Lék má vliv na krevní obraz, jestliže dojde při pravidelném užívání léku nejpозději do 4 dnů k tomuto poklesu krevního obrazu: leukocyty $< 3 \cdot 10^9/l$, granulocyty $< 1,5 \cdot 10^9/l$, hemoglobin < 100 g/l, trombocyty $< 100 \cdot 10^9/l$.*

◆ Mikroorganizmy

- **infekce:** viry (EBV, hepatitidy non A a nonB, HIV)
některá mykobakteria

◆ **Autoimunitní choroby** – eozinofilní fasciitis, thyreoiditis

◆ **PNH**

◆ **Těhotenství**

Mezi vznikem aplastické anémie a toxickým poškozením může uplynout poměrně dlouhý interval (Klener, 2003).

Laboratorní nález

U dřeňových útlumů jde tedy o velmi pestrý hematologický obraz, charakterizovaný:

- ☐ v obvodové krvi většinou **pancytopenii**
- ☐ v kostní dřeň **tukovou dřeň s aplazií nebo hypoplazií.**
- **KO:** většinou je přítomna makrocytární, vzácněji normocytární anémie (Hb < 100 g/l), bývá leukopenie a trombocytopenie, snížen počet retikulocytů, sníženy neutrofily, monocyty, u těžších forem dochází i k poklesu lymfocytů.
- **Krevní nátěr:** abnormální granulace neutrofilů (toxické granulace)
- **Kostní dřeň:** hypoplastická až aplastická (biopsie – tuková a fibrosní tkáň, zvýšené zastoupení lymfocytů a plazmatických buněk, někdy suchá kostní dřeň), přítomna dysplazie hlavně v červené řadě.
- **Ostatní:** zvýšení AF v neutrofilech, zvýšené plazmatické železo a volný protoporphyrin, zvýšen erytropoetin, zvýšen TNF α a γ , zvýšen IL-2.

Aplastické anémie mohou být:

- ☐ **Vrozené (geneticky podmíněné)** – jsou poměrně vzácné. Vrozenou aplastickou anémií je i Fanconiho syndrom a syndrom Blackfanův-Diamondův.
- *Některé vrozené aplastické anémie se mohou prezentovat až v dospělosti a nemusí mít typická stigmata*

- ❑ **získané – idiopatické** (neznámá vyvolávací příčina. Nachází se u 40 % aplastických anémií) a **sekundární** (toxické poškození vnějším činitelem. Nachází se u více než 55 % dřevných útlumů)).

➤ **Mezi získané útlumy červené řady se řadí:**

- **Akutní erytoblastopenie (Gasserova)** – jde o přechodnou aplazii po virovém infektu. V laboratorním nálezu se zjišťuje přechodné vymizení retikulocytů a mírná anémie.
- **Akutní čistá aplazie červené řady (Owrenova)** – je provázená zastavením erytropoézy. Nejčastěji se objevuje po virovém infektu. Laboratorně se zjišťuje vymizení retikulocytů. Krvetvorba se většinou obnoví spontánně během několika dnů (aplastická krize u hemolytických anémií).
- **Přechodná aregenerační anémie (Wranneho a Lovrice)** – postihuje malé děti a dochází při ní k rozvoji těžké anémie.

U některých aplastických anémií může určitá vyvolávající příčina (noxa) vyvolat nepředvídatelnou odezvu u daného jedince. Změna v hematopoetické buňce vyvolá u jedince imunitní reakci jako „snahu o vyléčení“. Projevy onemocnění a její průběh je pak odvislý od stupně imunitní reakce.

- *U silných imunitních reakcí vznikají těžké aplastické anémie (Severe aplastic anemia – SAA) nebo velmi těžké aplastické anémie (Very severe aplastic anemia – VSAA). Při nízké imunitní odpovědi se onemocnění projevuje jen chronickou cytopenií (Kubisz 2006).*

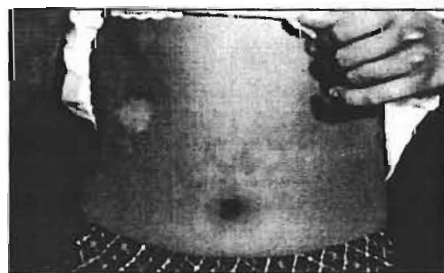
FANCONIHO ANEMIE

U Fanconiho anémie se jedná o autozomálně-recesivní dědičné onemocnění spojené s pancytopenií, abnormitami ve vývoji kostí (anomálie skeletu), kůže a vnitřních orgánů (hypoplazie genitálu). V rodinách, kde se vyskytla Fanconiho anémie je významný výskyt leukemií a paroxysmální noční hemoglobinurie.

Příčina: Není přesně známa. Je popsáno nejméně 5 genů, které mohou hrát roli při vzniku anémie a ostatních abnormit. Zjišťuje se rovněž vysoká nestabilita chromozomů, provázena četnými strukturálními aberacemi (Lieberman a Dror, 2006, Meetei, 2004).

Laboratorní nález

- **KO:** leukopenie, trombocytopenie, makrocytární anémie, retikulocyty relativně zvýšeny.



Fanconiho anémie – pigmentace kůže

- **Krevní obraz:** neutropenie, leptocyty
- **Kostní dřev:** zpočátku hyperplastická, později hypoplazie a aplazie, dysplazie, zmnožení plazmatických buněk a makrofágů
- **Cytogenetika:** četné cytogenetické abnormity – chromozomální zlomy
- **Ostatní:** zvýšen HbF

BLACKFANOVA-DIAMONDOVA ANÉMIE

Blackmanova-Diamondova anémie je čistá aplazie nebo hypoplazie erytropoézy.

Laboratorní nález

- **KO:** normocytární normochromní anémie, granulocyty a trombocyty v normě, retikulocyty snižené (< 0,010) nebo zcela chybí.
- **Ostatní:** hladina EPO zvýšena

- *Ojedinele mohou být přítomny erytroblasty megaloblastoidního vzhledu.*

Literatura

BRODSKY, R. A., JONES, R. J. Riddle: what do aplastic anemia, promyelocytic leukemia, and chronic myeloid leukemia have in common? *Leukemia*, 2004, roč. 18, s. 1740–1742.

EHRLICH, P. Über einen Fall von Anämie mit Bemerkungen über regenerative Veränderungen des Knochenmarks. *Charité-Annalen.*, 1888, roč. 13, s. 301–309.

KLENER, P. Vnitřní lékařství. Svazek VIII, *Hematologie*. Praha: Grada, 2003. 115 s.

KUBISZ, P. *Hematologia a transfúziologie*. Bratislava, Praha: Grada, 2006. 323 s.

LIEBERMAN, L., DROR, Y. Advances in understanding the genetic basis for bone-marrow failure. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2006, roč. 18, č. 1, s. 15–21.

MACIEJEWSKI, J. P., SELLERI, C., SATO, T., ANDERSON, S., YOUNG, N. S. Increased expression of Fas antigen on bone marrow CD34+ cells of patients with aplastic anaemia. *Brit. J. Haematol.*, 1995, roč. 91, s. 245–252.

MEETEI, A. R., LEVITUS, M., XUE, Y., et al. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat. Genet.*, 2004, roč. 36, s. 1219–1224.

2. NEMOCI ČERVENÉ KRVINKY

Červené krvinky se mohou tvořit v normálním, sníženém, či zvýšeném množství, nebo se u nich nachází funkční a morfologické abnormality.

Nemoci erytrocytů můžeme dělit podle kritérií:

- ☐ kvantitativních
- ☐ kvalitativních

Onemocnění, která postihují červenou krvinku mohou být vyvolána:

- ☐ snížením aktuálního počtu erytrocytů (Hb a Hct) – **anémie**
- ☐ zvýšením počtu červených krvinek – **polyglobulie**
- ☐ zhoubným bujením červené řady – **erytroleukemie**

2.1. Polycytemie (polyglobulie)

(řecky: *poly* = mnoho, *kytos* = buňka)

Polycytemie je stav, při kterém je zvýšena erytrocytární masa. Porucha se projevuje zvýšením červeného krevního obrazu, hyperviskozitou, hypervolemii (Berlin, 1975).

- *Hemodynamické vlastnosti krve jsou ovlivněny cévním průměrem, krevním tlakem, koncentrací bílkovin s velkými molekulami (např. fibrinogenem) a počtem buněčných elementů v cirkulaci. Při zvýšené hodnotě hematokritu, což je následek tohoto onemocnění dochází k nárůstu viskozity krve, ke zvýšení agregability erytrocytů a ke zpomalení průtoku krve v periferní mikrocirkulaci. To může u některých orgánů bezprostředně závislých na přívodu kyslíku (např. ledviny, mozek) vyvolat hypoxii.*

Rozlišujeme polycytemie:

- ◆ **relativní** – relativní polycytemie je stav, kdy při normální erytrocytární masě se zvýší poměr zastoupení erytrocytů vůči plazmě.
- *K relativní polycytemii může dojít po transfuzi erytrocytů, při plazmaferézách s částečným doplněním plazmy náhradními roztoky, při redistribuci tekutin do jiných orgánů a u hypertermického stavu.*
- ◆ **absolutní** – absolutní polycytemie je stav, u něhož dochází k dlouhodobému nárůstu erytrocytární **masy u mužů nad 36 a u žen nad 32 ml/kg hmotnosti.**

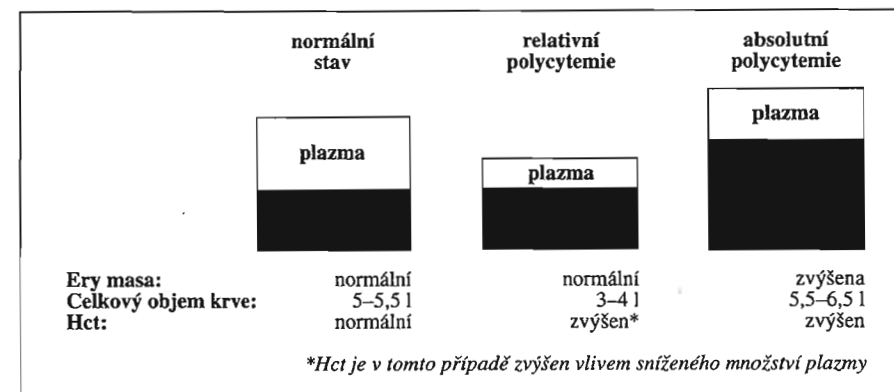
Absolutní polycytemie dělíme na:

- ☐ primární – 1/3 nemocných s absolutní polycytemií
- ☐ sekundární – 2/3 nemocných s absolutní polycytemií

Primární polycytemie

- ☐ **pravá polycytemie** – polythaemia vera (viz kapitola myeloproliferativní choroby)
- ☐ **primární familiární a vrozené polycytemie** (jsou velmi vzácné)

HODNOTY NĚKTERÝCH PARAMETRŮ
U RELATIVNÍ A ABSOLUTNÍ POLYCYTÉMIE



Sekundární polycytemie (polyglobulie)

Sekundární polycytemie jsou druhotná onemocnění s **erytropézou vyvolanou zvýšenou produkcí erytrocytů** na podkladě některé základní poruchy (Means, 1999). Sekundární polycytemie **představují hematologickou reakci na chronické dráždění krvetvorby v důsledku:**

- ☐ **poruchy okysličování tkání – hypoxie (dochází k poklesu pO_2).** U nemocí, které způsobují hypoxemii tkání dochází k poklesu parciálního tlaku kyslíku a zpětnou vazbou k aktivaci systémů, které ovlivňují syntézu erytropoetinu v ledvinách (hypoxie v ledvinách)
- ☐ **tvorby nadbytečného erytropoetinu** – některé nemoci potencují přímo systémy, které syntetizují hemoglobin

Sekundární polyglobulii vyvolávají stavy nebo nemoci, které ve svém důsledku způsobují hypoxemii nebo vyvolávají nadbytečnou tvorbu erytropoetinu. Patří sem:

■ Polyglobulie v důsledku hypoxie

Mohou vznikat při:

- pobytech ve vysokohorských polohách (nad 3 000 m)
- arteriovenózní zkraty v plicním řečišti nebo srdci
- zánětu průdušek a ledvin

■ **Polyglobulie z nadbytečné tvorby erytropoetinu v důsledku extrarenální příčiny**

- poruchy ledvin (karcinom ledvin)
- myomy dělohy a karcinomy jater

Laboratorní nález

- *Krevní obraz:* zvýšený počet červených krvinek
- *Ostatní laboratorní nálezy:* zvýšená hladina erytropoetinu, zvýšení erytrocytární masy, zvýšení viskozity.

2.2. Anémie (chudokrevnost)

Anémie jsou nejčastějšími projevy poruchy červených krvinek (Krantz, 1994).

Z FUNKČNÍHO HLEDISKA JSOU ANÉMIE STAVY, KTERÉ VEDOU KE SNÍŽENÍ VAZEBNÉ SCHOPNOSTI KRVE PRO KYSLÍK A NÁSLEDNĚ K PORUŠENÍ TKÁŇOVÉHO DÝCHÁNÍ.

Anémie mohou vzniknout z příčiny:

- ☐ primární
- ☐ sekundární (provázající jiné chorobné stavy)

Anémie je většinou **doprovodným syndromem jiných onemocnění** (maligní nemoci, choroby zažívacího traktu, krvácení aj.). Je jedním z nejrozšířenějších stavů – dnes podle zpráv WHO vzhledem k nedostatečné výživě některou z forem anémie trpí asi 30 % populace. Primární formy anémií se vyskytují méně často.

➤ *Na diagnózu anémie na základě laboratorního vyšetření myslíme již tehdy, zjistíme-li pokles hodnot červeného krevního obrazu o minimálně 10 % pod spodní hranici fyziologického rozmezí normálních hodnot. U většiny nemocných s anémií je laboratorní nález první „známkou“ anémie, protože je (zejména se tu projevuje u chron. anémií) po adaptaci organismu pacientem dobře snášena a nemanifestuje se.*

Hlavním kritériem pro posouzení, zda jde o anémii je **snížení koncentrace hemoglobinu v krvi**. Pokles Hb je provázen výraznou poruchou okysličování. Za anémii lze pokládat každý stav, u kterého hodnoty hemoglobinu neodpovídají hodnotám normálního jedince s ohledem na věk, pohlaví, nadmořskou výšku, stav (těhotenství u žen) a rasu.

Anémie podle míry poklesu krevního obrazu (zejména Hb) hodnotíme jako:

- **lehké** 100–130 g Hb/l
- **středně těžké** 70–100 g Hb/l
- **těžké** < 70 g Hb/l

- *Snížení hemoglobinu je často provázeno i poklesem počtu erytrocytů a snížením Hct.*
- *U zdravého jedince je množství červených krvinek udržováno na stále stejné úrovni. Celkové množství červených krvinek v cirkulaci není v dospělosti ovlivněno věkem, ale pohlavím (u mužů je dáno produkcí testosteronu). Jelikož přežívání erytrocytů je omezeno (110–120 dní), udržování jejich stálého množství vyžaduje, aby denní úbytek z cirkulace byl trvale doplňován novou produkcí krvinek.*
- *Tvorba červených krvinek mimo jiné závisí i na dostatečném přísunu nezbytných látek obsažených zejména v potravě (jedná se o železo, kyselinu listovou, vita-*

min B_{12} a jiné) a na dostatečném množství erythropoetinu.

- Hb a Hkt mohou být změněny i při odchylkách v množství cirkulující plazmy. Toto množství může být zvýšeno např. v těhotenství nebo u hypersplenismu – hovoříme o tzv. **relativní anémii**. Snížené množství cirkulující plazmy je naopak nacházeno při dehydrataci nemocného (nadměrné pocení, průjmy) nebo u nedostatečnosti nadledvinek. Zde naopak zjišťujeme normální hodnoty Hb a Hkt, i když nemocný má anémii.

ANÉMIE SE VYVINE, POKUD ERYTROPOÉZA NESTAČÍ KRÝT POŽADAVKY NA TVORBU NOVÝCH ČERVENÝCH KRVINEK.

Rozeznáváme **tři příčiny anémie**, které se mohou vyskytovat samostatně nebo v různých kombinacích:

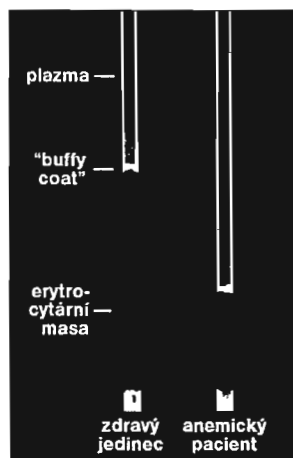
- ☐ **krvní ztráty**
- ☐ **zvýšený zánik červených krvinek**
- ☐ **nedostatečná tvorba červených krvinek**

Klinické příznaky anémie souvisí s poruchou prokrvení tkání a jejich nedostatečným zásobováním kyslíkem. Intenzita těchto příznaků odvisí nejen od stupně anémie – tj. hodnoty Hb, ale i od rychlosti vzniku anémie. Vzniká-li anémie pomalu, mohou se v organismu uplatnit tzv. kompenzační mechanismy, které umožní adaptovat se na nižší hodnoty Hb. Anémie tedy představuje nerovnovážný stav proti kterému se organismus brání **kompenzačními mechanismy**.

KOMPENZAČNÍ MECHANISMY

Kompenzace se dosahuje:

- ☐ **lepším využíváním kyslíku** (výraznější vyvazování kyslíku a uvolňování většího množství navázaného kyslíku pomocí 2,3-BPG).
- **2,3-BPG přítomný v červených krvinkách se váže na střední část tetrameru hemoglobinu A. Tím dochází k vytvoření takové konfigurace molekuly hemoglobinu, která má sníženou afinitu ke kyslíku – kyslík se snadněji uvolňuje. Dochází k tomu po posunu disociační křivky O_2 doprava vlivem snížení hodnoty pH ve tkáních po akumulaci kyseliny mléčné – tzv. Bohrův efekt.**
- ☐ **redistribucí krve** se zvýšeným zásobováním orgánů, které vyžadují nutně kyslík



Hematokrit u zdravého jedince a u nemocného s anémií

(mozek, srdce). Vlivem vazokonstrikce dochází ke snížení průtoku krve do některých orgánů (kůže, ledviny). Uvolněný objem krve se využije k zásobování orgánů vyžadujících kyslík.

- ☐ **zvýšením erytropoézy (zvýšením produkce erythropoetinu)**. Jde o nejpomalejší kompenzační mechanismus. Tkáňová hypoxie zvýší produkci EPO během 4–7 hodin, ale kompenzační vzestup krvinek se objeví až o 5 dní později, protože při tomto procesu je vyžadována aktivace a zvýšená produkce erytropoézy,

Zvýšení srdečního výdeje je jedním z kompenzačních mechanismů anémie podmíněné z části snížením viskozity krve. Po určité době se sníží srdeční výdej na normální hodnoty následkem **zvýšení periferní rezistence cév**.

Laboratorní vyšetření u anémií

- **Krevní obraz:** Hb, RBC, Hct, MCV, MCH, MCHC, (WBC).
 - **Krevní nátěr:** anomálie červené krvinky, retikulocyty, (rozpočet leukocytů).
 - **Kostní dřev:** hodnocení aspirátu v obarveném nátěru s posouzením morfologie erytoblastů a zhodnocení zásob železa, počtu a charakteru sideroblastů.
 - **Ostatní:** vitamin B_{12} , kyselina listová, celkové železo, vazebná kapacita pro železo.
- *K posouzení celkového stavu je důležité je znát i některé další ukazatele (např. počet leukocytů, počet trombocytů a jiné). V některých případech se neobejdeme bez trepanobiopsie, která nám umožní posoudit buněčnost kostní dřevě, případně infiltraci dřevě maligními buňkami a eventuální fibrózu. Počet erytrocytů (RBC) není pro posouzení anémie směrodatný, protože může být i při nižších hodnotách hemoglobinu snížený, normální nebo zvýšený, jak je tomu např. u talasemia minor nebo u mírných forem sideropenické anémie.*

NĚKTERÉ DALŠÍ POMOCNÉ PARAMETRY K DIAGNOSTIKOVÁNÍ ANÉMIÍ

Korigovaný počet retikulocytů

Ukazuje na vyplavování mladých forem erytrocytů z kostní dřevě vztažené na standardní množství hemoglobinu.

$$\text{korigovaný počet retikulocytů} = \text{Ret (\%)} \times \frac{\text{Hb}_p \text{ (g/l)}}{\text{Hb}_n \text{ (g/l)}}$$

Hb_p – hodnota hemoglobinu pacienta

Ret (%) – relativní zastoupení retikulocytů

Hb_n – normalizovaná hodnota hemoglobinu – muži: 160 g/l

– ženy: 150 g/l

► *Příklad: Muž, Retikulocyty = 0.008, Hb = 80 g/l*

$$\text{Korig. počet Rtc} = 0.008 \cdot \frac{80}{160} = 0.004$$

Retikulocytový index (RI)

Retikulocytový index napomůže k odlišení anémií se sníženou produkcí dřeně nebo s maturační poruchou (refrakterní anémie) s RI < 2 od anémií se zvýšenou proliferací kostní dřeně (hemolytické anémie, úpravná fáze po akutní krevní ztrátě) s RI > 3.

$\text{RI} = \text{Ret (\%)} \times \frac{\text{Hb}_p \text{ (g/l)}}{\text{Hb}_n \text{ (g/l)}} : \text{korekční faktor}$

Dělení korekčním faktorem je nezbytné proto, že u těžších anémií jsou do obvodové krve vyplavovány mladší retikulocyty, u kterých přechod v normální erytrocyty trvá déle než 1 den.

Hodnoty korekčního faktoru pro různé hladiny hemoglobinu:

Hemoglobin (g/l)	Korekční faktor	Hemoglobin (g/l)	Korekční faktor
> 110	1,0	70–99	2,0
100–110	1,5	< 70	2,5

KLASIFIKACE ANÉMIÍ

Klasifikace podle morfologických a etiopatogenetických kritérií:

Morfologická klasifikace

Z hlediska laboratorního přístupu k diferenciální diagnostice lze anémie dělit:

- ☐ podle hodnoty **MCV** na: normocytové 82–98 fl
- mikrocytové < 80 fl
- makrocytové > 100 fl

► *Klasifikaci podle MCV použil již v roce 1934 Wintrobe.*

- ☐ podle hodnoty **MCH** na: normochromní 28–32 pg
- hypochromní < 28 pg

- ☐ podle hodnoty **RI** na: se zachovanou normální produkcí kostní dřeně (RI > 3)
- se sníženou produkcí kostní dřeně (RI < 2)

► *Klasifikace podle RI (retikulární index) umožní dělit anémie na stavy se zachovanou kompenzační schopností kostní dřeně a na stavy bez této schopnosti.*

I když morfologické dělení je velmi praktické, je důležité pokusit se **zjistit příčinu anémie** ještě před zahájením léčby nemocného. K tomu slouží etiopatologická klasifikace anémií.

Etiopatogenetická klasifikace

Etiopatogenetická klasifikace je dělení anémií podle příčiny a vzniku.

- Anémie z nedostatečné tvorby erytrocytů
- Anémie z akutní a chronické ztráty krve
- Anémie ze zvýšené destrukce erytrocytů
- Anémie z kombinovaných příčin

2.2.1. Anémie z nedostatečné tvorby erytrocytů

(z nedostatečné erytropoézy)

Rozlišujeme:

- a) poruchy proliferace a diferenciace kmenové buňky
- b) poruchy tvorby hemoglobinu
 - poruchy syntézy hemu
 - poruchy syntézy globinu
- c) poruchy syntézy DNA

A) PORUCHY PROLIFERACE A DIFERENCIACE KMENOVÉ BUŇKY

Tento typ anémií je charakterizován sníženou erytropoézou nebo dysplazií v červené řadě:

- snížená tvorba červených krvinek: **erytroidní anémie**
- neefektivní tvorba erytrocytů: **dyserytropoetická anémie**

ČISTÉ ERYTROIDNÍ ANÉMIE

Čistá aplazie červené řady (Pure Red Cell Aplasia – PRCA)

Příčina: kvantitativní porucha krvetvorby, postihující výlučně červenou řadu (Eckard a Casadavell, 2003).

Laboratorní nález

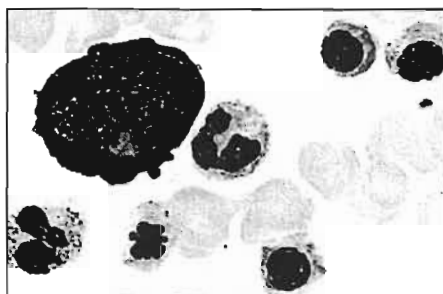
- **KO:** normocytová, prakticky chybí retikulocyty, normální počet trombocytů a leukocytů
- **Krevní nátěr:** těžká normocytová normochromní anémie
- **Kostní dřeň:** nachází se výrazné snížení až chybění erytropoézy, normální myelopoéza, lymfopoéza a megakaryocytopoéza
- **Ostatní:** hladiny EPO jsou zvýšeny

PRCA může být:

- vrozená
- získaná – doprovází jiné nemoci, ale může se vyskytnout i po transplantaci kmenových buněk, v těhotenství a po podání léků a po virovém infektu (parvovirus B19).

DYSERYTROPOETICKÉ ANÉMIE

Jedná se o velmi vzácné formy vrozených anémií s nápadnými morfologickými změnami vývojových stadií krvetvorné červené řady v kostní dřeni i periferní krvi (mnohojaderné normoblasty, bazofilní tečkování a vakuolizace cytoplazmy, cytoplasmatické můstky mezi erytroblasty, Howellova-Jollyho tělíška, mezibuněčné jaderné chromatinové můstky, předčasná ztráta jadra).



Dyerythropoetické změny

- Do pojmu „*dyseritropoéza*“ patří jak neefektivní krvetvorba, tak změny v kinetice, morfologii a metabolismu.

Příčina: porucha krvetvorby červené krvinky, při které dochází jak *ke snížení produkce*, tak i k abnormálním změnám červené krvinky – *dyseritropoeze*. Konečným důsledkem dyseritropoézy je zvýšená fagocytární aktivita makrofágů kostní dřeně k abnormálním erytroblastům (Wickramasinghe, 1984).

Rozlišujeme:

- vrozené (kongenitální)
- získané – jde o heterogenní skupinu onemocnění s anémií a dysplasií kostní dřeně, která se podle současné nomenklatury řadí mezi MDS.

Kongenitální dyseritropoetická anémie (KDA)

Rozlišujeme nejméně tři typy kongenitálních dyseritropoetických anémií:

KDA – typ I

KDA – typ I je velmi vzácná forma onemocnění. Jedná se pravděpodobně o autozomálně recesivní onemocnění s postižením genu na 15 q v segmentu 15,1 – 15,3.

Laboratorní nález

- *Krevní obraz:* makrocytární anémie, snížený počet retikulocytů
- *Krevní nátěr:* anizocytoza, poikilocytoza, Cabotovy-Schleipovy prstence, bazofilní tečkování

- *Kostní dřev:* přítomny dvojjaderné i vícejaderné erytroblasty, některé z erytroblastů s megaloblastoidními rysy, chromatinové můstky
- *Ostatní:* zvýšené hodnoty bilirubinu, LDH a HbA₂

KDA – typ II (HEMPAS)

(Hereditary Erythroblastic Multinuclearity with a Positive Acidified Serum test)

- *Krvinky u tohoto onemocnění se hemolyzují séry zdravých jedinců, na rozdíl od PNH, kdy krvinky hemolyzují účinkem okyseleného séra nemocného s PNH.*

U KDA – typ II je recesivní typ dědičnosti, postihuje obě pohlaví. Anémie je většinou přítomna od útlého věku, ale u mírných forem může být onemocnění rozpoznáno až v dospělosti, případně až v pokročilém věku (Tamura a spol., 1992). Je nejčastější dyseritropoetickou anémií (Heimpel a Wendt, 1968).

Příčina: Na vzniku anémie se podílí neefektivní erythropoéza s předčasným zánikem prekurzorů červené řady v kostní dřeni a různě výraznou hemolýzou červených krvinek v obvodové krvi. Oba mechanismy pak vedou k sideróze orgánů, zvýšené hladině bilirubinu a tvorbě žlučových kamenů (Greiner a spol., 1992).

Zajímavá je přítomnost zvýšeného počtu erytroblastů s rozšířenými cisternami endoplazmatického retikula pod erytrocytární membránou, které podmiňují tzv. *fenomén dvojité „buněčné“ membrány*. Je pravděpodobné, že erytrocyty vykazující tuto anomálii, jsou slezinou ve zvýšené míře vychytávány (Tamura a spol., 1992, Fukada a spol., 1984). U KDA – typu II byl dále prokázán *defekt erytrocytární membrány spočívající v poruše glykosylace proteinů* této membrány (Fukada a spol., 1984).

Laboratorní nález

- *Krevní nátěr:* normocyty, anizocytoza a poikilocytoza
- *Kostní dřev:* přítomny dvojjaderné i vícejaderné erytroblasty

KDA – typ III

Tato forma se vyskytuje velmi vzácně. Dědičnost je autozomálně dominantní, postižen je gen CDAN3 na 15q21–q25.

Laboratorní nález

- *Krevní obraz:* normocytární nebo mírně makrocytární anémie
- *Krevní nátěr:* anizocytoza, poikilocytoza
- *Kostní dřev:* přítomny velké mnohojaderné erytroblasty, karyorexe, vícepolární mitózy v červené řadě

B. PORUCHY TVORBY HEMOGLOBINU

Poruchy tvorby hemoglobinu mohou být vyvolány řadou příčin. Nejčastější příčinou bývá nedostatek železa. U anémií z porušené tvorby hemoglobinu je produkováno málo hemoglobinu a to vede k nízké produkci červených krvinek. Porucha syntézy hemoglobinu je způsobena těmito příčinami:

- ❑ **poruchou syntézy hemu**
- ❑ **poruchou syntézy globinu**

PORUCHA SYNTÉZY HEMU

Patří sem:

- **sideropenické** anémie – anémie z nedostatku železa
- anémie **chronických nemocí** – porucha mobilizace železa
- **sideroblastické (sideroachrastické)** anémie – porucha inkorporace železa do Hb (porucha syntézy protoporphyrinu s tvorbou prstenčitých sideroblastů)

SIDEROPENICKÉ ANÉMIE

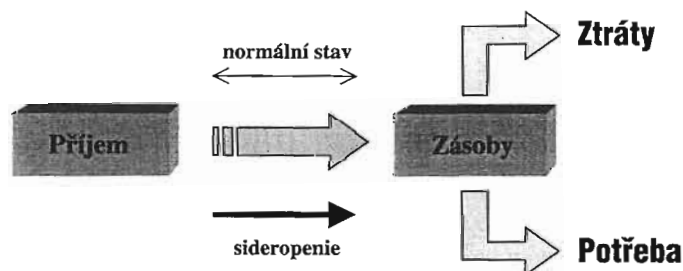
(řecky: *sideros* = železo, *penia* = chudoba)

O anémii z nedostatku železa je zmínka v egyptském Papyrus Ebers. Jde o léčebnou příručku z roku 1550 před Kristem (Chrobák, 2003).

Příčina: Anémie z nedostatku železa vzniká následkem dysbalance mezi příjmem železa a jeho ztrátami.

- **SIDEROPENIE** – nedostatek železa je patologický stav, kdy v organismu chybí železo a je vyčerpáno i zásobní železo. Nedostatek železa vede k nedostatečné tvorbě hemoglobinu (sníží se schopnost syntézy hemu).

Sideropenie a sideropenické anémie vznikají obvykle při nerovnováze mezi příjmem a ztrátou respektive spotřebou železa. Sideropenická anémie tedy může být způsobena nedostatkem železa v potravě nebo jeho maloabsorpcí.



Organismus nemůže regulovat velikost výdeje, ale omezeně může regulovat jeho příjem a proto se železem velmi pečlivě hospodář a využívá všechno železo získané ze zaniklých červených krvinek.

Nedostatek Fe v organismu může být vyvolán těmito mechanismy:

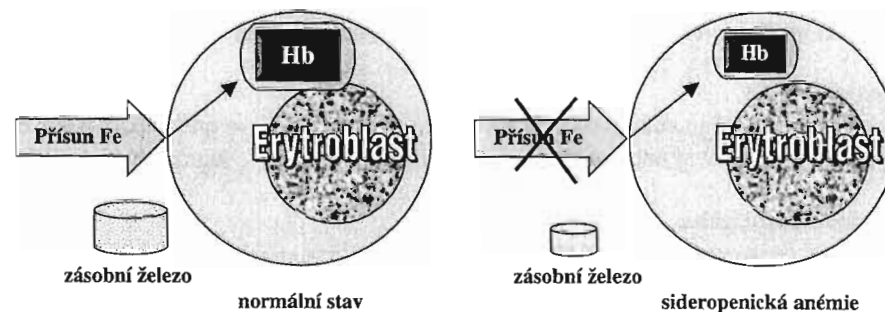
- ❑ **nedostatečný příjem železa** – nevhodné složení potravy s nadbytkem fytátů, málo masa, převážně mléčná strava, vegetariánsví. Případně jde o **porušenou resorpci železa** – stavy po resekci žaludku a jiné
- ❑ **nadměrné ztráty** – náhlé a vydatné krvácení, nebo dlouhodobé malé ztráty (v některých zemích způsobené parazity)
- ❑ **příjem železa z potravy nestačí krýt zvýšené nároky na jeho potřebu** – dospívání, těhotenství, zejména opakovaná těhotenství bez substituce železa, některé infekční choroby

- *Ke snížení zásob může dojít, buď z jedné z vyjmenovaných příčin a nebo se na jejich snížení podílí více příčin najednou.*

Nedostatek Fe se projeví **snížením syntézy hemu**. Dochází k poklesu tvorby Hb, myoglobinu a enzymatických systémů obsahujících Fe. K nedostatku dochází většinou pozvolna (Penka, 2003a).



DŮSLEDKY SIDEROPENIE PRO SYNTÉZU Hb V ERYTROBLASTU A NA ZÁSOBNÍ ŽELEZO V MAKROFÁZÍCH



SIDEROPENIE NEMUSÍ VŽDY NUTNĚ VÉST K ANÉMII. K ROZVINUTÍ SIDEROPENIE V SIDEROPENICKOU ANÉMII MŮŽE DOJÍT Z ŘADY PŘÍČIN.

Sideropenické anémie z poruchy při vstřebávání a nedostatečném přívodu železa

- ❑ **nesprávná životospráva** – malý přísun masa, nevhodná kombinace stravy – současné podávání mléčné a masité stravy tlumí vstřebávání Fe.

Sideropenické anémie při opakovaných ztrátách krve

- ◆ **ženy v reprodukčním věku** (ztráta > 80 ml krve/periodu). Dospělá žena ztrácí v rámci fyziologických ztrát průměrně 14,3 μmol Fe (800 $\mu\text{g}/\text{den}$) a dalších 9 μmol (500 $\mu\text{g}/\text{den}$) z důvodu menorigie – krvácení při menstruaci (Hallberg a spol., 1966). Normální ztráty železa se pohybují kolem 1 mg/den (Pecka, 2002).
- ◆ **ženy v těhotenství** (potřeba vyšší: potřeby plodu a placenty, krvácení při porodu). Sideropenii v době těhotenství trpí až 90 % žen. K náhradě ztrát během těhotenství a porodu je potřeba dodat organismu asi 1 g železa (přibližně 6 mg Fe/den).

Potřeba: 500 mg železa během těhotenství
100–200 mg železa při porodu
200 mg železa při laktaci

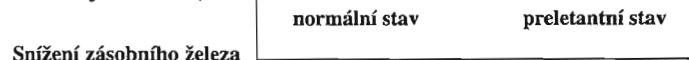
Hb přitom klesá asi o 20 g/l. Nejnižší hodnoty ve 2. trimestru, na konci těhotenství se dostává na počáteční hodnoty. Ztráty jsou výraznější zejména u žen, které mají na začátku těhotenství minimální zásoby železa v organismu.

- ◆ **krvácení do GIT** – muži a ženy po menopauze: jícnové varixy, vředová choroba žaludku a duodena, malignity těchto orgánů, ulcerózní kolitida, ankylostomóza (červi Ancylostoma duodenale nebo Necator americanus). Odhaduje se, že těmito červi je infikováno asi 20 % světové populace.
- ◆ **jiné lokalizace** – krvácení do močových cest, krvácení v oblasti plic, epistaxe (Penka, 2003b).

- 1 ml erytrocytární masy odpovídá asi 1 mg Fe.
- 1 ml krve při hematokritu 0,40 odpovídá asi 0,40 mg Fe.

Rozeznáváme celkem 3 stadia vývoje sideropenické anémie:

- **prelatentní deficit Fe** – dochází k postupnému snižování zásob Fe v siderofázích (klesá feritin a hemosiderin), ale není ovlivněn přísun železa do erytroblastu (sideroblasty v normě).



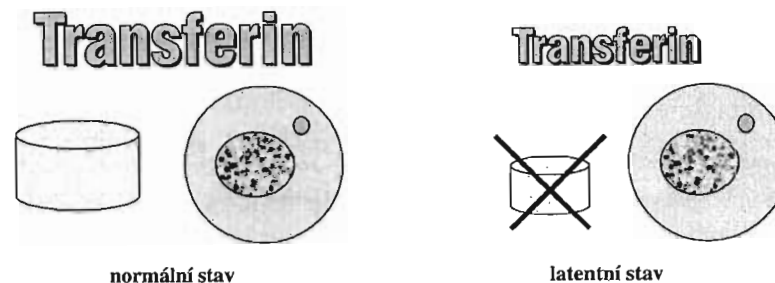
Snížení zásobního železa

- U mužů dochází ke snížení zásob železa pod 100 mg, u žen až pod 50 mg. Zvyšuje se resorpce železa ze střev.

- **latentní deficit Fe** – zásoby jsou do značné míry vyčerpány a je sníženo množství plazmatického Fe nezbytné pro erytropoézu.

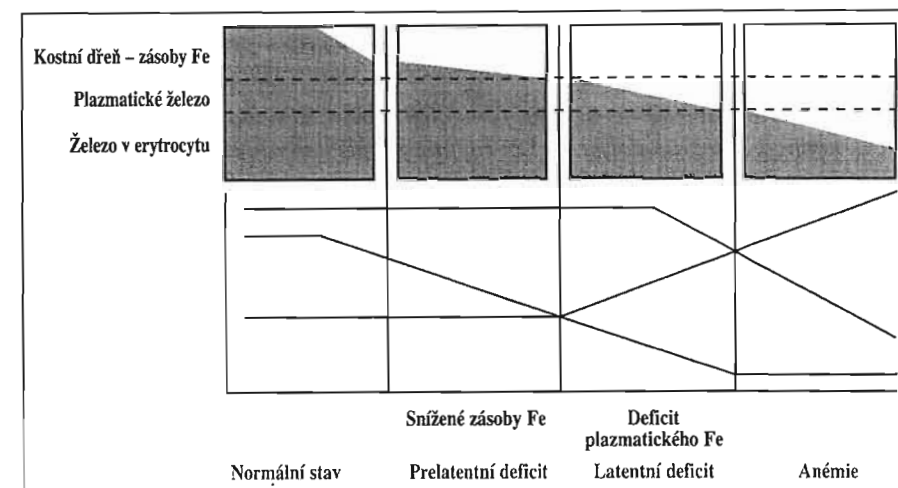
- Saturace transferinu klesá pod 16 %, sideroblasty klesají pod 10 % a Hb je ještě normální.

LATENTNÍ DEFICIT Fe



- **anémie** – zásoby železa jsou zcela vyčerpány, je snížena hladina hemoglobinu a dochází k rozvoji klinických projevů anémie

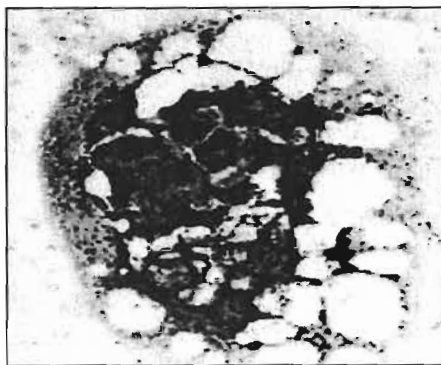
3 STÁDIA VÝVOJE SIDEROPENICKÉ ANÉMIE



Laboratorní nález

a) Latentní stadium

- **Krevní nátěr:** normocytoza
- **Kostní dřeň:** snížení obsahu až nepřítomnost hemového Fe v siderofázích kostní dřeně. Snížení sideroblastů pod 20 % (0–10 %).
- **Ostatní:** snížení hladiny feritinu v séru, sérová hladina receptoru transfe-rinu (sTfR), snížená hodnota zinkprotoporfyriu (ZPP).



Siderofágy u sideropenické anémie – kostní dřeň

b) Rozvinuté stadium

- **Krevní nátěr:** mikrocytoza (až u 70 % nemocných), hypochromie až agranulocytoza, anizocytoza a poikilocytoza.
- **Krevní obraz:** snížení RBC, MCV, MCH a MCHC, zvýšení RDW, Plt kolem $400 \cdot 10^9 /l$.
- **Kostní dřeň:** normální až mírně zvýšená červená krvetvorba s posunem k nezralým formám. U rozvinuté sideropenie vidíme v normoblastech plazmoadernou asynchronii (nepoměr mezi vyžráváním jádra a cytoplazmy se zpožděním vývoje cytoplazmy) a snížený počet sideroblastů.
- **Ostatní:** Snížení plazmatického Fe v séru, zvýšení celkové vazebné kapacity pro železo a snížení saturace Fe.

Sideropenická anémie je nejdříve normocytární a normochromní, pak mikrocytární a normochromní a v posledním stadiu mikrocytární a hypochromní.

- *Nejprůkaznějším testem pro potvrzení, že jde o sideropenickou anémii je hladina feritinu, která u zdravého jedince bývá přímo úměrná zásobám železa v organismu (siderofágy). Hladina pod 20 µg/l svědčí pro deficit železa, často však klesá pod hodnoty 10 µg/l (1 µg/l feritinu odpovídá asi 8 mg zásobního železa). Hladina sTfR je u sideropenických anémií zvýšena a rovněž je zvýšena i hodnota zinkprotoporfyriu (ZPP), protože při nedostatku železa je železo při syntéze hemu substituováno zinkem, který se působením ferochelatázy váže na protoporfyrin za vzniku ZPP (Čermák a Brabec, 1998).*

ANÉMIE CHRONICKÝCH CHOROB (ACHN)

(Anemia Chronic Diseases – ACD)

Anémii chronických chorob lze definovat jako **hypoproliferativní typ anémie způsobený zvýšenou produkcí cytokinů při jiném, většinou zánětlivém či nádorovém onemocnění**.

Příčina: Patogeneze těchto onemocnění má různé příčiny, ale podstatnou úlohu hraje:

❑ Omezení proliferace erytroidních kmenových buněk

- **Snížená erytropoéza** – z důvodu snížené produkce erytropoetinu nebo proto, že nedochází k jeho navýšení.

- **Snížená odpověď kostní dřeně na stimulaci erytropoetinem**

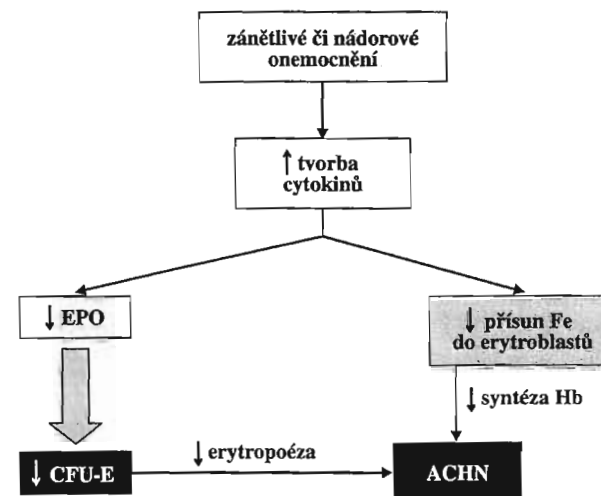
- **Přežívání erytrocytů může být lehce zkráceno**

❑ Omezená mobilizace a využití železa z jeho vnitřních zdrojů – dochází ke zvýšené akumulaci železa v aktivovaném monocyto-makrofágovém systému a omezení dostupnosti funkčního železa pro potřeby erytropoézy.

- **Snížené uvolňování železa z makrofágů kostní dřeně** – zásobního železa je dostatek, ale nemůže být využito pro genezi hemoglobinu.

- *Některé cytokiny produkované ve zvýšené míře právě u těchto onemocnění mohou negativně ovlivnit proliferaci a maturaci erytroidních progenitorů (Brener, 1988, Tracey a spol., 1988, Durum a spol., 1985, Dinarello, 1989, Hooks a spol., 1979). Zkráceno je i přežívání červených krvinek, nedostatečně kompenzováno hypoproliferativní erytropoézou. Cytokiny (Tumor nekrotizující faktor – TNFα, Interleukin 1-IL 1, Interferony β a γ – IFNβ a IFNγ, lipopolysacharidy – LPS aj) negativně ovlivňují proliferaci a maturaci erytroidních progenitorů (zejména CFU-E) ať již přímo, nebo nepřímo snížením produkce EPO (Baer a spol., 1987, Miller a spol., 1990, Faquin a spol., 1992), omezením mobilizace železa z buněk RES a zhoršením jeho inkorporace do erytroblastů (Konin a Hershko, 1977, Ludwiczek a spol., 2003, Douglas a Adamson, 1975).*

SCHÉMA VZNIKU ANÉMIE CHRONICKÝCH NEMOCÍ



Charakteristickým rysem těchto anémií je, že **závažnost změn krevního obrazu obvykle souhlasí se závažností základního onemocnění**. Organizmus netrpí skutečnou sideropenií, obrát železa v plazmě je zvýšen a jeho tkáňové zásoby jsou ve většině případů dostatečné, samotná erytropoeza je však nedostatečně saturována. U nemocných s ACHN bylo potvrzeno i zkrácené přežívání erytrocytů.

Laboratorní nález

- **KO:** většinou normocytoza, mikrocycytoza asi u 30 % případů, MCV nebývá snížen pod 72 fl, Hb neklesá většinou pod 90 g/l, MCH snížen, Hct snížen, Rtc normální nebo lehce snížené.
- **Kostní dřev:** zásobní železo normální až zvýšené, počet sideroblastů snížen, počet siderofágů normální až zvýšený (Cartwright, 1966).
- **Ostatní:** snížená hladina sérového železa, hodnota feritinu normální nebo lehce zvýšená. Hodnoty solubilního transferinového receptoru (sTfR) a indexu sTfR/feritin jsou nižší u ACHN ve srovnání se sideropenickou anémií (Genc a spol., 2004).

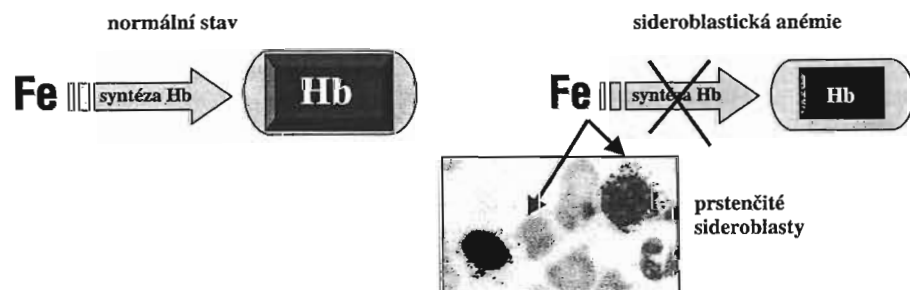
SIDEROBLASTICKÉ (SIDEROACHRASTICKÉ) ANÉMIE

Sideroblastické anémie jsou heterogenní skupinou onemocnění, která vznikají **v důsledku nedostatečného využití železa, následkem poruchy některé z cest syntézy molekuly hemoglobinu**. Přebytké (nevyužitě) železo se hromadí v podobě granulí v mitochondriích erytroblastů, kde vytváří prstence kolem jádra.

Rozlišujeme formu:

- ◆ **vrozenou**
- ◆ **získanou**

PORUCHA INKORPORACE Fe DO ERYTROBLASTU U SIDEROBLASTICKÉ ANÉMIE



VROZENÉ SIDEROBLASTICKÉ ANÉMIE

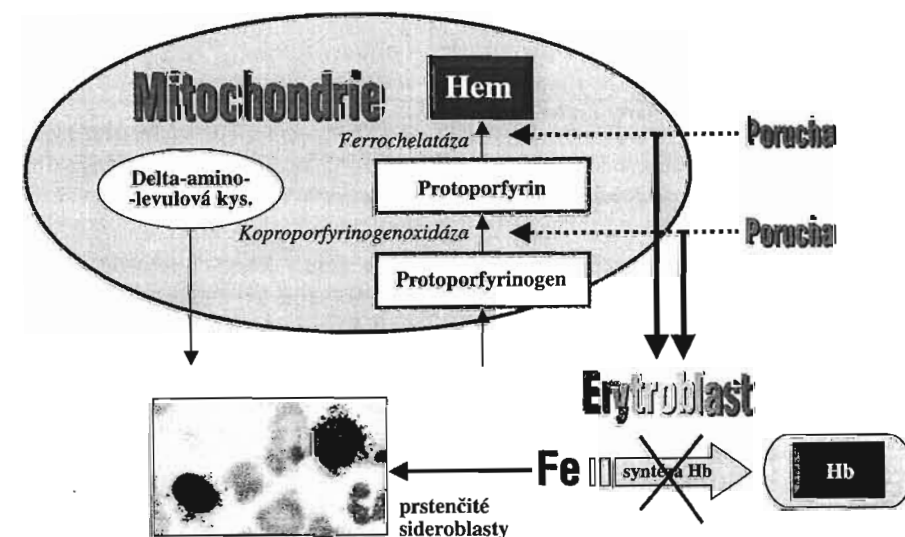
Pokud se nezjistí příčina vzniku sideroblastické anémie, jde o tzv. primární sideroblastickou anémii charakterizovanou akumulací železa v mitochondriích v prekurzorech nezralých buněčných forem červené řady

- Mitochondrie s obsahem amorfního železa jsou deponovány kolem jádra a po obarvení na železo Perlsonovou reakcí vytváří tzv. prstenčité sideroblasty.

Příčina: u vrozené sideroblastické anémie **předpokládáme enzymatickou poruchu, nebo blokádu v syntéze hemu a porfyriu**. Přesný mechanismus vyvolávající blokádu není zatím znám.

- Předpokládá se **snížená aktivita 5-aminolevulové-ALA-syntázy** v jaderných buňkách červené řady. Jindy se zjišťuje snížená koncentrace protoporfyrinu nebo koproporfyriu v erytrocytech. Porucha je nejčastěji vázána na chromozom X.

ENZYMATICKÉ PORUCHY V SYNTÉZE HEMOGLOBINU A PORFYRINU



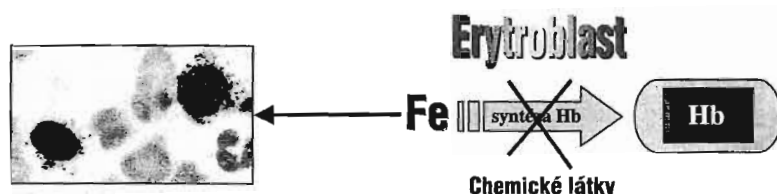
ZÍSKANÉ SIDEROBLASTICKÉ ANÉMIE

Jde o nejčastější druh sideroblastické anémie. Rozlišujeme dvě skupiny těchto anémií:

- ❑ stavy, u kterých lze vysledovat příčinu poruchy syntézy hemu – **reversibilní sideroblastické anémie**
- ❑ stavy, kdy vyvolávající příčina není známa – tuto skupinu řadíme k MDS ke skupině **refrakterních anémií s prstenčitými sideroblasty**.

Reversibilní siderblastické anémie jsou **vyvolány účinkem různých chemických látek** (např. některých farmak a alkoholů). Přítomnost těchto látek může vést k poruše syntézy hemu.

- ◆ **Otrava olovem – Příčina:** olovo ovlivňuje všechny enzymy nezbytné pro syntézu hemu. Dochází pravděpodobně k **zablokování SH skupin v aktivním místě enzymu**. Syntéza hemu probíhá jen omezeně a v erythrocytech se hromadí nehemové železo.
- ◆ **Polékové anémie** – upraví se většinou po vysazení léku.
- ◆ **Alkoholismus** – etanol inhibuje u citlivých jedinců syntézu Hb.



- **Siderblastické anémie mohou provázet i některé infekce a systémové onemocnění pojiva. Tyto anémie bývají většinou součástí sekundárních MDS a nemívají mikrocytární charakter (sekundární RAS).**

PORUCHA SYNTÉZY GLOBINU

Poměr HbA a HbF a jejich struktura a složení jsou v lidských erythrocytech poměrně stálé. S odchylkami od tohoto stavu se setkáváme při dědičných poruchách biosyntézy globinu. Dědičné poruchy syntézy globinu mohou být dvojího typu:

- **narušená, nebo nedostatečná tvorba globinových řetězců.** Vlivem genové mutace se jeden nebo více globinových řetězců nevytvoří v dostatečném množství, nebo se nevytvoří vůbec. Dochází k nerovnováze v tvorbě řetězců – **talasemii**.



- **tvorba globinových řetězců s odlišnou strukturou.** V strukturálním genu dochází bodovou mutací k záměně aminokyselin v molekule hemoglobinu – **hemoglobinopatie** (viz kapitola o hemoglobinu).

TALASEMIE

(řecky: *thalassa* = moře)

Talasemie představují početnou skupinu dědičných chorob, charakterizovaných **sníženou nebo chybějící syntézou některého z globinových řetězců HbA (α , β)**. Porušená syntéza globinových řetězců vede k nedokonalé tvorbě hemoglobinu v červených krvinkách. Ostatní globinové řetězce, jejichž syntéza není narušena se tvoří v relativním nadbytku. Ty pak precipitují a poškozují erythrocytární membránu, což následně může vést k hemolýze. Snížená syntéza globinových řetězců vede ke snížení syntézy hemu a současně k následnému hromadění nadbytečného železa v erythrocytech.

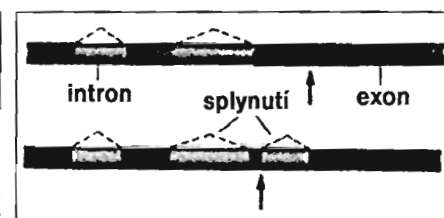


Příčina: Genetická příčina vyřazení syntézy řetězců není dosud zcela vysvětlena. Jde hlavně o bodové mutace, méně často o delecii globinového genu, které vedou k porušení syntézy globinového řetězce. U β -talasemie jde pravděpodobně o redukci přepisu kódu DNA na mRNA.



Normální gen pro tvorbu β globinového řetězce

Dvě bodové mutace v genu pro tvorbu β -globinového řetězce



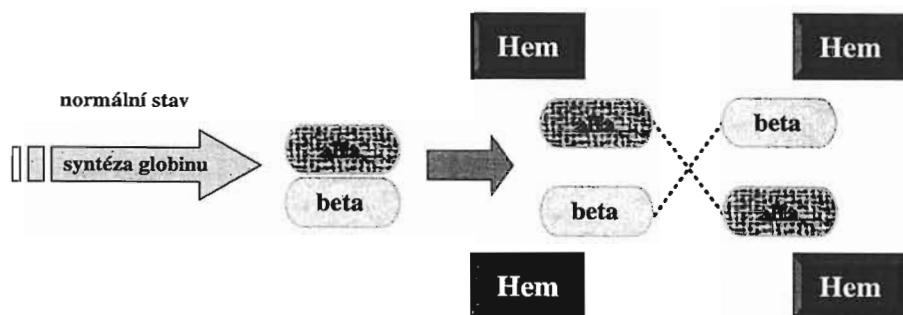
Nepostížené řetězce jsou pak syntetizovány v normálním množství. Nevyvážená tvorba řetězců vede k precipitaci řetězců produkovaných v nadbytku a výsledkem je neefektivní krvetvorba a hemolýza erythrocytů.



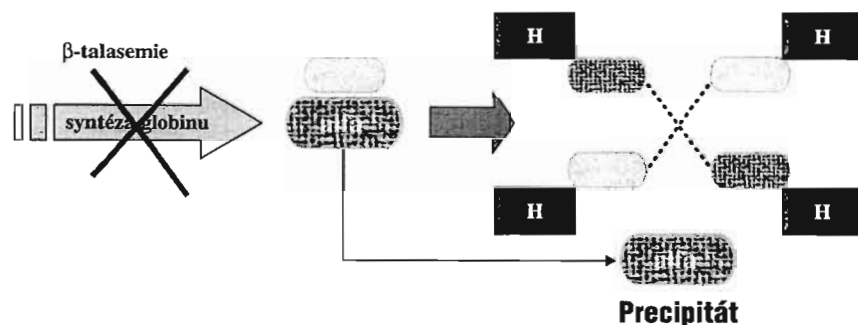
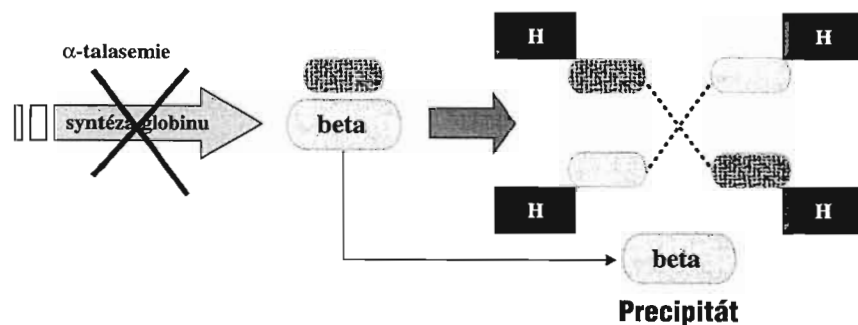
Precipitace α -globinového řetězce u β -talasemie (šípky)

Podle toho, které řetězce jsou syntetizovány sníženou měrou rozlišujeme:

- **α -talasemie**
- **β -talasemie**



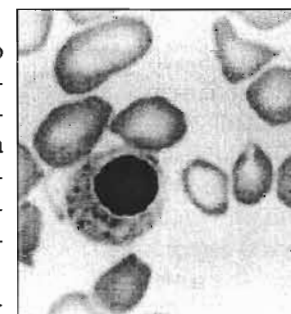
ROZLIŠENÍ α - A β -TALASEMIE



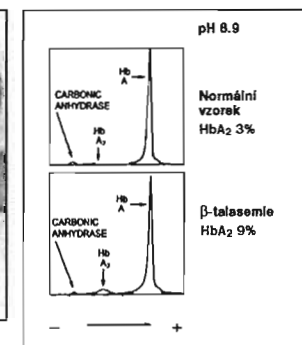
- Nemocní s talasemií jsou chráněni proti malárii (parazit roste ve změněných krvinkách pomaleji, než v normálních). Vzácné jsou delta a gama talasemie zejména u dětí, které pro nízké zastoupení se prakticky klinicky neprojeví. Těžké talasemie, postihující řetězec gama nebo globinového řetězce embryonálního hemoglobinu mohou způsobit smrt fetu nebo embrya.

Laboratorní nález

- **KO:** normální nebo zvýšený počet erytrocytů, hypochromie, extrémní mikrocitoza (55–66 fl), nízká hodnota RDW, retikulocytoza, hladina Hb většinou vyšší než 90 g/l.
- **Krevní nátěr:** leptocyty, jaderné buňky červené řady
- **Kostní dřev:** zvýšená erytropoéza, v erytroblastech se nachází Howellova-Jollyho tělíska, rovněž bývají nalézány fagocytované erytroblasty.
- **Elfo Hb:** HbA₂ > 3,5 %



Erytroblasty – periferní krev



Elektroforéza Hb

β -TALASEMIE

Příčina: Jsou většinou vyvolány mutacemi ovlivňujícími regulaci nebo expresi β -globinového genu, uloženého na krátkém raménku chromozomu 11, méně často deletcemi. Jde většinou o **jednoduché záměny nukleotidových bází u DNA beta-globinového genu**. Takto pozměněný gen nevytváří β -řetězce v dostatečném množství nebo u homozygotní formy se řetězce nevytváří vůbec (β_0 -talasemie). β -globinový řetězec kódují pouze 2 geny.

Podle klinického obrazu se rozlišují 2 formy:

- **talasemie minor** – heterozygotní forma (postižení 1 alely genu pro β ř. – β^A nebo β^B) – většinou nejsou klinické odezvy nebo má onemocnění lehký průběh.
- **talasemie major** – homozygotní forma (postižení 2 alel genu pro β ř. – β^A i β^B) – těžký klinický průběh.

U β -thalasemií se nachází ve zvýšené míře HbF a HbA₂ (jde vlastně o nahrazení HbA, který se netvoří v dostatečném množství). Volné na hemoglobin nevyvázané α řetězce v podobě monomerů v erytrocytech precipitují a poškozují erytrocytovou membránu. Precipitující α -řetězce vedou k hemolýze, což má za následek splenomegálii. Jsou-li erytrocyty schopny syntetizovat γ řetězce vzniká HbF s vysokou afinitou ke kyslíku. Následná tkáňová hypoxie pak nadále zvyšuje nároky na krevtvorbu.

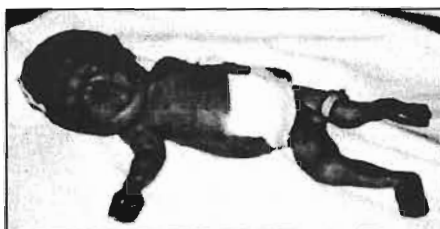
Zastoupení hemoglobinu u jednotlivých typů talasemií

- u talasemie major je 40–100 % HbF
- u talasemie minor HbA₂ > 3 %

α-TALASEMIE

Příčina: dochází k potlačení tvorby alfa řetězců. α globinový řetězec je syntetizován 4 různými geny (po 2 lokusech na 16. chromozomu) a postižení kteréhokoliv z těchto genů vede k α talasemii. Porucha syntézy α řetězců vede k relativnímu přebytku β, γ a δ-řetězců.

Tyto řetězce jsou schopny vytvářet tetramerní hemoglobiny (ve fetálním období: Hb Barts-γ₄, po narození: HbH-β₄, dále se vyskytuje i Hb-δ₄).



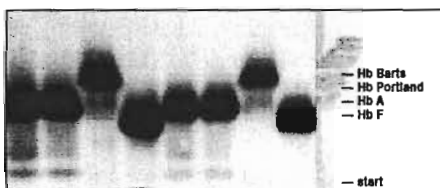
Dítě s α-talasemií

Mohou nastat tyto případy:

- chybění 1 genu pro α-řetězec (–, α) (α, α) – *tiché nosičství (silent carrier)*
- chybění 2 genů pro α-řetězec (–, α) (–, α) nebo (–, –) (α, α) – *α-talasemie minor* (u asiátů bývá delece obou genů na 16. chromozomu, zatímco u černochů je každá delece na jiném chromozomu).
- chybění 3 genů pro α-řetězec (–, –) (–, α) – *choroba s HbH* (pro nedostatečnou produkci α řetězců vzniká HbH, který je nestabilní, v erytrocytu precipituje a vyvolává jeho kratší přežívání. K rozvoji anémie dochází po 1. roce života. Objevuje se žloutenka hemolytického charakteru, hepatosplenomegalie a kostní změny.

➤ Při použití vitálních barviv se zjišťuje v nátěru nález atypických inkluzí precipitovaného HbH u 5–90 % hodnocených erytrocytů.

- chybění 4 genů pro α-řetězec (–, –) (–, –) – *choroba s Hb Barts* – 4-γ-řetězce dávají Hb Barts (netvoří se vůbec běžné hemoglobiny). Vznikající Hb Barts má vysokou afinitu ke kyslíku a důsledkem toho je nedostatečné zásobování tkání kyslíkem. Většinou pak ve 24.–34. týdnu těhotenství dochází k úmrtí plodu (hydrops fetalis).



Elektroforéza –
třetí zleva a druhý zprava Hb Barts

Vzniká tehdy, chybí-li všechny 4 geny pro tvorbu α-řetězce HbA – homozygotní α⁰-talasemie.

Laboratorní nález

- **Krevní nátěr:** mikrocitoza (ve 100 % případů), leptocyty, bazofilní tečkování, hypochromie, zvýšený nález retikulocytů a normoblastů.

HODNOTY KREVNÍHO OBRAZU u β- a α-TALASEMIÍ

TYP	TALASEMIE β		TALASEMIE α
POHLAVÍ	MUŽI	ŽENY	MUŽI A ŽENY
POČET	37	34	10
MCV (fl)	53–79	51–72	62–76
	(62,5 ± 4,8)	(61,2 ± 4,8)	(67,8 ± 4,9)
RBC (10 ¹² /l)	4,97–7,54	4,92–5,97	4,82–6,75
	(5,87 ± 0,57)	(5,46 ± 0,29)	(5,80 ± 0,59)
Hb (g/l)	95–161	96–146	103–136
	(121 ± 15)	(110 ± 10)	(122 ± 10)
MCH (pg)	18–24	19–24	19–24
	(20,7 ± 1,8)	(20,4 ± 1,4)	(21,2 ± 1,8)

➤ Data publikovaná Chrobákem (Chrobák, 2001).

C. PORUCHY SYNTÉZY DNA

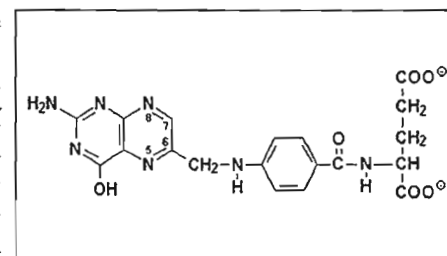
(Megaloblastové anémie)

Jde o skupinu anémických syndromů různé patogeneze, která je charakterizována megaloblastovou přestavbou v kostní dřeni. Může se jednat o poruchu:

- **metabolizmu vitaminu B₁₂ a kyseliny listové**
- **syntézy DNA v důsledku působení léků** (antimetabolity, cytostatika)
- která spočívá přímo v **genetické výbavě buňky** (MDS)

Příčina: B₁₂ a kyselina listová napomáhají syntéze DNA v jaderných hemopoetických buňkách. **Nedostatek vitaminu B₁₂ vede ke zpomalení syntézy DNA s nahromaděním nedělicích se buněk v premitotické fázi buněčného cyklu, což má za následek snížení produkce kostní dřeni.** Cytoplazma buněk i při zpomalené syntéze DNA vyzrává normálně. V kostní dřeni místo červené krvinečky normoblastové probíhá **krvetvorba megaloblastová**.

Není-li přítomen vitamin B₁₂ tvoří se jen krátké úseky DNA (Okazakiho fragmenty), je narušen normální metabolismus buněk a prodlužuje se jejich setrvání v S-fázi mitózy. Především je postižena syntéza thyminu a enzymu thymidylátsyntetázy. Tato syntéza je umožněna stálou regenerací folátu – acidum folicum (tetrahydrolistové kyseliny). Všechny ty-

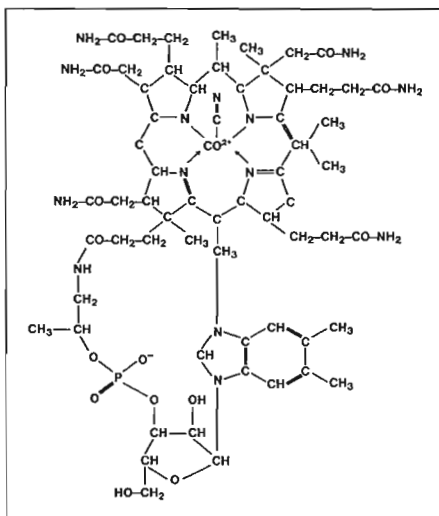


Strukturní vzorec kyseliny listové

py megaloblastových anémií, ať jsou způsobeny nedostatkem folátů nebo vitamínu B₁₂ jsou vždy **důsledkem deficitu tetrahydrolistové kyseliny**. Tvorba RNA a bílkovin porušena není, proto cytoplazma dozrává běžnou rychlostí.

➤ *Hladina kyseliny listové v séru je spíše ukazatelem jejího aktuálního stavu v plazmě. Závisí totiž hlavně na jejím příjmu z potravy. Přesnějším ukazatelem je stanovení kyseliny listové přímo v červené krvi, neboť odráží její skutečnou koncentraci v buňce. U zdravých lidí se pohybuje denní potřeba vit B₁₂ kolem 3–5 µg. Lidské tělo obsahuje kolem 2–4 mg vit B₁₂ částečně uloženého v játrech a nervovém systému (Kauppi, 1995). Denní potřeba kyseliny listové se pohybuje kolem 1 mg. Vstřebává se v tenkém střevě, hladina v krvi je 3–30 µg/l, zásoby v organizmu 6–10 mg.*

➤ *Vitamin B₁₂ (cobalamin), je nezbytným kofaktorem pro transport kyseliny listové a její uchování v červené krvi (Kauppi 1995). Vitamin B₁₂ obsahuje ve svém aktivním místě atom kobaltu (Co). Isoloval byl poprvé v r. 1948. Vstřebávání vitamínu B₁₂ umožňuje tzv. vnitřní faktor, což je glykoprotein tvořený v parietálních buňkách žaludeční sliznice, který vytváří s vitaminem B₁₂ komplex a umožňuje tak jeho vstřebávání z potravy, protože se váže na specifické receptory sliznice ilea. Při přestupu do krevního oběhu se vit. B₁₂ váže na bílkovinu (transkobalamin) a je transportován do kostní dřeně a ke tkáním, kde probíhá krvetvorba. V játrech, ve svalstvu a ledvinách se ukládá do zásob, ze kterých se dle potřeby uvolňuje pro biosyntézu purinových nukleotidů a tím i pro syntézu DNA buněčných jader.*



Strukturní vzorec vitamínu B₁₂

V důsledku těchto změn vzniká asynchronie mezi vývojem jádra a vývojem cytoplazmy se zpožděním ve vývoji jádra za cytoplazmou. Jádro je méně hutné, méně kompaktní, než by odpovídalo jeho vývoji v rámci normoblastové řady – struktura jádra je spíše síťovitá. Cytoplazma je bohatší a objemnější, než v normoblastové řadě. Tvorba bílkovin a hlavně tvorba hemoglobinu probíhá nezměněnou rychlostí – vyhrávání cytoplazmy získává převahu nad vývojem jádra. Změna se netýká jen červené řady, ale i granulocytární a megakaryocytární řady.

Nedostatek B₁₂ a kyseliny listové dále vyvolá:

❑ **změny granulopoézy – leukopenie**, velké metamyelocyty a tyče, hypersegmentace jader zralých neutrofilů

❑ **změny trombopoézy – trombocytopenie**, hypersegmentace jader megakaryocytů

➤ *Porucha se může projevit i v buňkách, které mají vysokou proliferativní aktivitu, jako je např. sliznice úst a trávicího ústrojí.*



Velká tyč

Anémie z nedostatku vit B₁₂ a kys. listové se může rozvinout je-li:

❑ **nedostatečný příjem B₁₂ z potravy** – vnější faktor (k tomu prakticky dochází jen u veganů, kteří neprijímají ani živočišné produkty – maslo, vejce)

❑ **nedostatečná tvorba vnitřního faktoru v žaludeční sliznici**. Může jít jednak o:

- ◆ tvorbu protilátek proti vnitřnímu faktoru
- ◆ chybění specifického receptoru pro tento faktor

❑ **nedostatek kyseliny listové** (jaterní onemocnění, přísná dieta, alkohol, některé léky, maloabsorbce – zmenšení resorpční plochy střeva pro vstřebávání B₁₂ a kys. listové)

PERNICIÓZNÍ ANÉMIE

(zhoubná chudokrevnost)

Název pochází z doby, kdy se tato nemoc nedala léčit a končila během několika týdnů až měsíců fatálně. Klinické příznaky tohoto onemocnění byly poprvé popsány Addisonem r. 1855 a Beirmerem r. 1872 (Morbus Addison-Biermer).

Perniciózní anémie je onemocnění na autoimunitním podkladě, u kterého v důsledku přítomnosti jedné nebo několika různých protilátek dochází k narušení resorbce vitamínu B₁₂ z gastrointestinálního traktu.

Příčina: perniciózní anémie vzniká **při nedostatku vnitřního faktoru**. Přesný mechanismus vzniku perniciózní anémie není ještě zcela objasněn. Značný význam je připisován atrofii (oploštění) žaludeční sliznice, která může být způsobena reakcí některých autoprotilátek s bílkoviny žaludeční sliznice. V séru nemocných, ale i v žaludeční šťávě lze prokázat odlišné typy autoprotilátek proti vnitřnímu faktoru:

- protilátky namířené **přímo proti parietálním buňkám žaludeční sliznice**, v nichž se tvoří vnitřní faktor
- protilátky, které **zamezují vazbě** vitamínu B₁₂ na vnitřní faktor
- protilátky, které **brání vazbě** komplexu [B₁₂ – vnitřní faktor] na receptory sliznice tenkého střeva (ilea)

➤ **Vnitřní faktor (intrinsic factor)** – je glykoprotein o molekulové hmotnosti kolem 55 000 tvořený v parietálních buňkách žaludeční sliznice.

U kongenitálního nedostatku vnitřního činitele může tento faktor zcela chybět. Parietální buňky nejsou schopny produkovat vnitřní faktor. Zásoby vitaminu B₁₂ přítomné při narození se vyčerpají do 6–24 měsíců, kdy se vyvine anémie. K rozvoji závažných příznaků (těžké anémii) dochází ve fázi pokročilého stadia onemocnění.



Řez žaludeční stěnou a tvorba HCl v parietálních buňkách

Laboratorní nález

- **Krevní obraz:** výrazná pancytopenie: RBC až $1.10^{12}/l$, Hb pokles až na 60 g/l, vyšší hodnota MCV (110–140 fl) a MCH (35–40 pg), leukopenie s neutropenií, trombocytopenie a snížená hodnota retikulocytů.
- **Kostní dřev:** spíše hyperplastická s nálezem megaloblastů, velkých tyčů a metamyelocytů, vyskytují se hypersegmentované megakaryocyty.
- **Ostatní:** Hladina vitaminu B₁₂ < 160 ng/l
- **Schillingův test** – nejprve se vysytí receptory vitaminem B₁₂ podaným i.m. Je-li porušeno vstřebávání vitaminu B₁₂ vyloučí se tento stolicí, není-li porušeno vstřebávání, vyloučí se přebytek vitaminu močí.
- **Krevní nátěr:** makroovalocytoza, poikilocytoza, hypersegmentace jader neutrofilů, Cobotovy-Schleipovy prstenice, Howellova-Jollyho tělíčka, snížený počet až úplné vymizení retikulocytů.



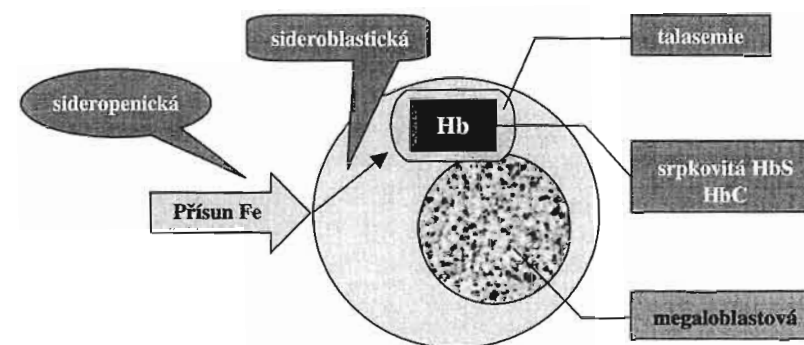
Ovalocytoza – megalocyty

DRUHOTNÉ MEGALOBlastové ANÉMIE

- ◆ **z nedostatku vit. B₁₂ a kyseliny listové**
 - při onemocnění žaludku a střev (resekce a jiné)
 - při různých poruchách vstřebávání a trávení bílkovin
- ◆ **ze zvýšené spotřeby B₁₂ a kyseliny listové**
 - zhoubná onemocnění krve tvorby
 - těhotenství
 - střevní paraziti (Např. škulovec. Parazit může být uložen vysoko v tentém střevě a v těchto místech znemožňuje vstřebávání vit B₁₂. Uvolněný nebo vypuzený parazit obsahuje velké množství nakumulovaného vit B₁₂.)
- ◆ **z nedostatku jiných krvetvorných látek**
Vyskytují se zřídka při onemocněních zánětlivé nebo nádorové povahy.

- **anémie z nedostatku vitaminu B₆** - Vitamin B₆ - pyridoxin je potřebný pro správnou syntézu hemu.
- **anémie z nedostatku mědi** - Cu je potřebná při vstřebávání Fe
- **anémie z nedostatku kobaltu** – kobalt je součástí vit. B₁₂
- **anémie z nedostatku bílkovin a aminokyselin** – nedostatek stavebních kamenů pro syntézu globinových řetězců v hemoglobinu

ZNÁZORNĚNÍ MÍST SOUVISEJÍCÍCH SE VZNIKEM NĚKTERÝCH ANÉMIÍ VE SPOJITOSTI SE SYNTÉZOU MOLEKULY Hb A ZMĚNAMI V JÁDŘE ERYTROBLASTU



2.2.2. Anémie z akutní a chronické ztráty krve

(Posthemoragické anémie)

Rozlišujeme:

- **Anémie z akutní ztráty krve**
- **Anémie z chronických ztrát krve**

Anémie z akutní ztráty krve

Příčina: významná ztráta krve po traumatu nebo po poškození cévní integrity různých orgánů, v důsledku řady chorob.

- **Nedostatek krve – oligemie:** lidský organizmus je při tomto stavu v nebezpečí života.

Akutní krvácení

Akutní krvácení ohrožuje nemocného především oběhovým selháním. V prvních fázích je náhlá ztráta krve **problémem hemodynamickým**: Vzhledem ke sníženému objemu krve se nemůže dostatečně plnit krevní řečiště, klesá krevní tlak a objem krve vypuzovaný ze srdce. Tím se vyvolává pokles okysličování v tkáních – může do-

jít ke vzniku cirkulačního kolapsu, šoku a smrti. Anémie se projeví až tehdy, dojde-li k naředění krve:

- ❑ po **doplnění** ztraceného objemu tekutin **náhradními roztoky**
- ❑ **přestupem** mezibuněčné (tkáňové) tekutiny do nitrocévního prostoru – „k zředění krve“ období trvá 2–3 dny).

Dochází tak k poklesu červeného krevního obrazu s maximem 3. den.

➤ Ztráty krve:

- Při náhlé ztrátě 10 % normálního množství krve nebývají žádné příznaky (odběr krve u dárců – 500 ml).
- Při ztrátě 20 % krve, pokud je dotčený v klidu nepocítí uje žádné příznaky, při námaze se může objevit tachykardie a dochází k poklesu krevního tlaku.
- Tělo může ztratit maximálně 30–40 % objemu krve, ztráta 50 % objemu krve může být již smrtelná.

K větším ztrátám krve může docházet:

- ◆ při poranění
- ◆ u vředových a nádorových onemocnění, které způsobí poruchy tkání a cév
- ◆ při krvácení u nemocí s poruchami srážení krve (hemofilie)

Laboratorní nález

- Krevní obraz:
 - po několika hodinách: leukocytoza, trombocytoza
 - 24–48 hodin: normocytová a normochromní anémie, retikulocytoza, makrocytoza, zvýšené MCH
- Pokles hladiny plazmatického železa.

Anémie z chronických ztrát krve

Chronická ztráta krve je jednou z nejčastějších příčin anémie (blíže viz sideropenické anémie).

2.2.3. Anémie ze zvýšené destrukce erytrocytů

(Hemolytické stavy a choroby)

Prvními průkaznými zprávami o hemolytické anémii jsou případy paroxysmální chladové hemoglobinurie pozorované koncem 13. století Johannisem Actuarinem, dvorním lékařem v Konstantinopoli, který popsal u některých jedinců pasáž černé moči po prochlazení.

- Poškozené a pozměněné červené krvinky podléhají rozpadu. Nepoškozené krvinky jsou odbourávány v MFS. Tento tzv. **extravaskulární rozpad** probíhá zejména ve slezině. Kdežto **intravaskulárnímu rozpadu**, který probíhá přímo v cévním

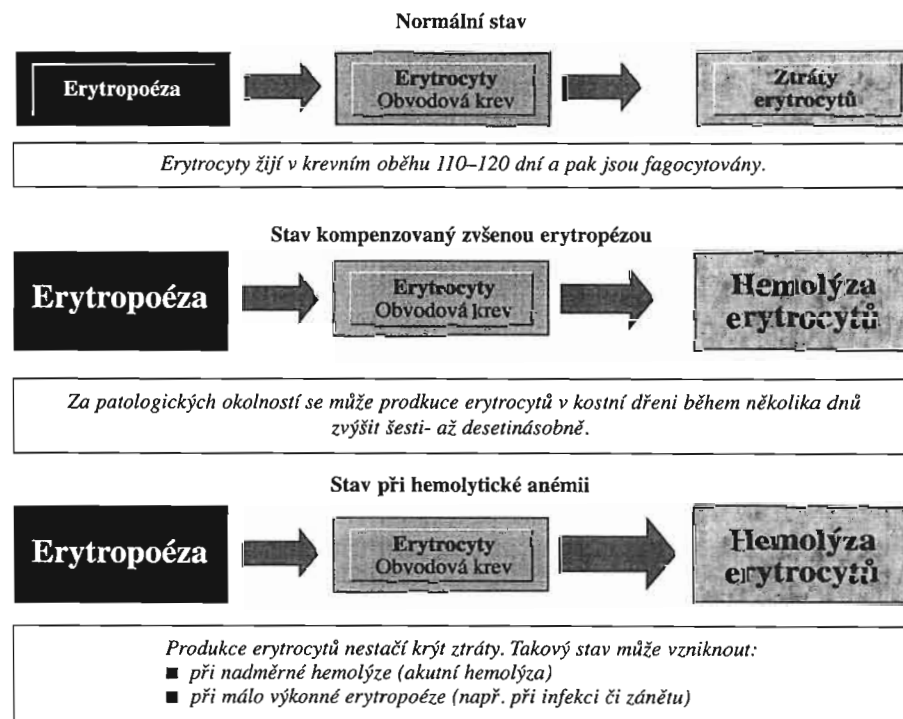
systému, podléhají zejména poškozené nebo úplně zničené krvinky.

Do kategorie anémií se zvýšené destrukce erytrocytů se řadí pestrá skupina stavů, jejímž společným znakem je **zvýšený předčasný zánik (rozpad) erytrocytů**. Změny tvaru a funkce erytrocytů mohou totiž zkrátit životnost erytrocytů a způsobit tak jejich zvýšené odbourávání – **hemolýzu**. Doba přežití krvinek se zkracuje na několik týdnů až několik dnů (u těžkých stavů).

Za hemolytickou anémii považujeme každé zkrácené přežívání erytrocytů, při kterém kostní dřeň zvýšením erytropoézy nedokáže kompenzovat vzniklou ztrátu.

Za běžných okolností má kostní dřeň kapacitu pro zvýšení erytropoézy až na desetinásobek běžné produkce. K rozvoji anémie dochází, jestliže dojde k nerovnováze mezi zvýšenou tvorbou a zánikem erytrocytů. K tomu dochází ze dvou příčin:

- je-li **hemolýza tak výrazná**, že její zvýšení nenahradí ztrátu červených krvinek (zkrácená doba přežívání pod 12 dnů)
- je-li z různých příčin **omezena kapacita erytropoézy**, takže nemůže být zvýšena tak, aby nahradila ztráty dřeně. K tomu dochází u některých infekcí.



Laboratorní nález

- **KO:** snížená hladina hemoglobinu, normocytoza (ale může být i mikrocycytoza nebo makrocycytoza)
- **Ostatní:** zkrácené přežívání erytrocytů ⁵¹Cr

Známky zvýšeného rozpadu

- zvýšená hladina nekonjugovaného bilirubinu, zvýšená hladina laktátdehydrogenázy (LDH)

Při intravaskulární hemolýze:

- **KO:** zvýšená hladina volného hemoglobinu v plazmě
- **Ostatní:** hemoglobinurie a hemosiderinurie, hodnoty haptoglobinu a hemopexinu jsou výrazně sníženy až nulové.

Známky kompenzačně zvýšené erytropoézy

- **KO:** zvýšený počet retikulocytů a retikulární index > 3
- **Krevní nátěr:** polychromazie, přítomnost jaderných červených krvinek
- **Kostní dřevina:** hyperplazie červené řady v kostní dřevině (zvýšené zastoupení normoblastů)

➤ *Při intravaskulární hemolýze s hemoglobinemií se uvolněný hemoglobin váže s haptoglobinem, α_2 -globulinem v plazmě na hauto-hemoglobinový komplex, který pro velkou molekulu nepřestupuje do glomerulárního filtrátu a je odstraňován makrofágy retikuloendoteliálního systému. Hem se váže v plazmě i na hemopexin, komplex je pak odstraňován hlavně játry. Hladina haptoglobinu klesá až k nule. Nadměrný volný hemoglobin je filtrován glomeruly. Rychle saturuje kapacitu tubulárních buněk, ve kterých dává vznik hemosiderinu. Neadsorbovaný hemoglobin je pak vylučován močí. Hemosiderin se objevuje v moči buď volný nebo v odloupaných tubulárních epiteliích a dá se v močovém sedimentu prokázat Perlsonovou reakcí (Chrobák, 2004).*

Rozlišujeme:

- ☐ **Hemolytické stavy** – anémie není přítomna, je-li odbourávání erytrocytů kompenzováno zvýšenou produkcí erytrocytů v kostní dřevině (zvýšenou erytropoézou) – proto tuto skupinu označujeme jako **hemolytické stavy**, ne anémie.
- ☐ **Hemolytické anémie** – vyvine se tehdy, když stupeň destrukce erytrocytů je větší, než kapacita kostní dřeviny kompenzovat ztráty krvinek zvýšenou erytropoézou.

Hemolytické anémie dělíme:

- **korpuskulární** – příčina zkrácení přežívání erytrocytu je přímo v krvince
- **extrakorpuskulární** – příčina zkrácení přežívání erytrocytu je v prostředí, ve kterém se krevinka pohybuje

VROZENÉ HEMOLYTICKÉ ANÉMIE

Korpuskulární hemolytické anémie

Mají v převážné většině porušenou strukturu některé části buňky (korpuskule). Vyznačují se *tvorbou morfologicky abnormálních a funkčně méněcenných erytrocytů* se sníženou pružností a deformovatelností, které podléhají předčasnému rozpadu (hemolýze).

Laboratorní nález

- **Krevní obraz:** snížené hodnoty červeného krevního obrazu
- **Combsův test:** negativní
- **Testy na hemolýzu:** pozitivní test na autohemolýzu, defekty erytrocytárních enzymů
- **Ostatní:** vyšetření erytrocytárních enzymů, ELFO Hb, zkrácená doba přežívání erytrocytů dárce u příjemce

Defekt červené krvinky vyvolávající jejich zkrácené přežívání se může týkat:

- ☐ **membrány** – hemolytické anémie z odchylek ve skladbě membrány
- ☐ **metabolizmu** – hemolytické anémie z poruchy nebo nedostatku enzymu
- ☐ **hemoglobinu** – hemolytické anémie z odchylek v molekule hemoglobinu

HEMOLYTICKÉ ANÉMIE

Z ODCHYLEK VE SKLADBĚ MEMBRÁNY

Příčina: poruchy genů, které vytváří složky cytoskeletu membrány červené krvinky. Labilitu erytrocytové membrány může vyvolat nedostatek, nebo změněná funkce bílkovinné nebo fosfolipidové části buněčné membrány nebo cytoskeletu. Takto změněný erytrocyt má zvýšené energetické nároky a proto rychleji vyčerpá možnosti syntézy ATP. Nedostatek chemické energie vede ke změně tvaru krvinky – erytrocyt se stává kulovitým, oválným, osnatým nebo miskovitým. Později dojde k jeho rozpadu a zachycení kapilárami sleziny, kde jej fagocytují makrofágy.

➤ *Hereditární hemolytické anémie s poruchou erytrocytární membrány jsou vrozené. Jediná získaná korpuskulární hemolytická anémie je paroxysmální noční hemoglobinurie. K nejčastějším patří dědičná sférocytoza a ovalocytoza, u nichž je známa porucha proteinů erytrocytární membrány i jejich genetický podklad. K vzácným patří hereditární stomatocytoza a akantocytoza. Všechny tyto stavy lze zjistit z vyšetření krevního nátěru.*

Rozlišujeme:

- **dědičnou sférocytozu (hereditární sférocytoza)**
- **vrozenou eliptocytozu – ovalocytozu (hereditární eliptocytoza)** – přítomno 25–75 % ovalocytů. Jde o vzácnější vrozené onemocnění s autozomálně domi-

nantním přenosem. Má podobný klinický obraz jako hereditární sférocytoza, obvykle je její průběh mírnější, takže splenektomie je nutná jen vzácně. Některé formy tohoto onemocnění mají genetickou vazbu na Rh antigen. Příčinou těchto stavů bývá molekulární defekt α i β -řetězce spektrinu, případně defekt proteinu 4,1 nebo glykoforinu C.

- **vrozenou akantocytozu.** Jde o vzácné autozomálně recesivní dědičné onemocnění. Vyskytuje se u vrozené abetalipoproteinemie, získaná forma nejčastěji u alkoholické jaterní cirhózy.

Příčina: snížená syntéza apolipoproteinu B, což následně vede k nedostatku až chybění několika frakcí β -lipoproteinů (LDL – low density lipoproteins, VDL – very low density lipoproteins). Vztah mezi sníženým obsahem lipidů a fosfolipidů v plazmě a změnou tvaru červené krvinky není zatím znám. Celkový obsah lipidů a fosfolipidů v membráně erytrocytu je normální, dochází však k porušení vzájemných poměrů – v membráně erytrocytů je více sfingomyelinu a cholesterolu (více než 50 %). Tvar akantocytů se projeví až po přechodu krvinek do obvodové krve.

- **vrozenou stomatocytozu.** Jde o skupinu autozomálně dědičných onemocnění charakterizovaných přítomností stomatocytů, získaná forma se vyskytuje nejčastěji u akutní otravy alkoholem.

Příčina: není zcela jasná. U některých nemocných byl popsán nedostatek bílkoviny proužku 7, tzv. stomatinu. Nedostatek vede ke zvýšení permeability membrány a k hromadění sodíku na úkor draslíku uvnitř buňky.

- **Paroxysmální noční hemoglobinurii.**

DĚDIČNÁ (HEREDITÁRNÍ) SFÉROCYTOZA – HS

Dědičná hereditární sférocytoza je nejčastější autozomálně dominantní dědičnou hemolytickou anémií v ČR. Radíme ji k membránovým hemolytickým chorobám a podstatný defekt u ní se týká **kvantitativních nebo kvalitativních změn určitých membránových bílkovin, které se zúčastní tvorby cytoskeletu.** Je charakterizována přítomností mikrosférocytů, sníženou osmotickou odolností erytrocytů a příznivou odpovědí na splenektomii (Sakalová, 2000).

Příčina: vrozená porucha spektrinu, který nevstupuje do interakce s proteinem 4.2 (palladin) – nevzniká ternární komplex [spektrin-4.2.protein-aktin]. HS může být spojena i s **poruchami dalších bílkovin membránového skeletu** jako je **ankyrin**, či **bílkovina 4.2.** nebo **integrální bílkoviny pásu 3.** Mohou se vyskytovat nejen jednotlivé defekty bílkovin, ale i **defekty kombinované** (např. defekt spektrinu a ankyrinu).

➤ **V současné době se popisují 4 typy poruchy membránových proteinů:**

- Deficit spektrinu a integrální bílkoviny pásu 3
- Deficit spektrinu ankyrinu
- Deficit integrální bílkoviny pásu 3

■ Defekt proteinu 4.2

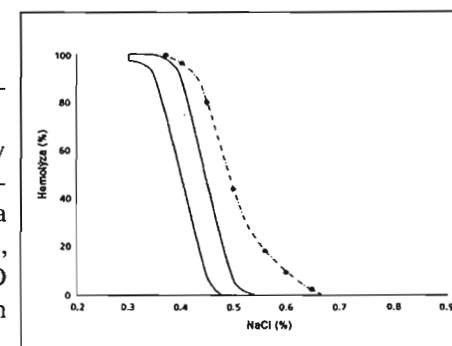
Tento defekt postihuje asi 40 % molekul spektrinu přítomných v červených krvinkách, zbytek si zachová schopnost fyziologické funkce.

Vlivem této poruchy buňka **snadněji propouští sodík.** Aby vyrovnala tyto zvýšené ztráty sodíku musí zvýšit výkon sodíkové pumpy (zvýšení asi o 18 %). Zvýšení výkonu si klade **vyšší nároky na přísun ATP** a tím dochází **k rychlejšímu vyčerpání enzymové výbavy erytrocytu.** Sodík se postupně hromadí v krvince a strhává sebou vodu. Výsledkem této změny je ztráta membránového materiálu (zejména fosfolipidů a cholesterolu), tím dochází ke zmenšení povrchu, objem buňky se zakulacuje a nabývá bochníkovitého nebo kulovitého tvaru (průměr buňky se přitom zmenšuje) – vzniká sférocyt, který je při průchodu slezinou snadno hemolyzován a odbourán (vydrží maximálně 20–30 průchodů sinusy sleziny).

Z toho je patrné, že stav, který se klinicky označuje jako HS může být vyvolán souhrnem příčin, které se projevují shodným klinickým obrazem. Proto by bylo správnější hovořit o **syndromu HS.**

Laboratorní nález

- **KO:** retikulocytoza
- **Krevní nátěr:** mikrocycytoza, sférocytoza
- **Kostní dřeň:** hyperplazie erytropoézy
- **Ostatní:** osmotická rezistence snižena, výrazná autohemolýza, testy na sférocytozu pozitivní (Pink test, ALGT – nejsou specifické), ELFO může odlišit poruchu membránových proteinů po jejich separaci.



Osmotická rezistence u HS

PAROXYSMÁLNÍ NOČNÍ HEMOGLOBINURIE (PNH)

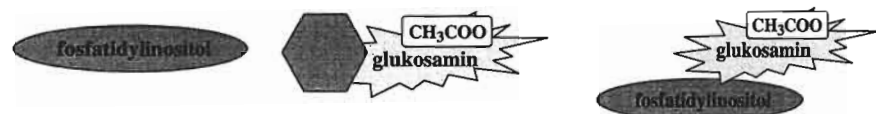
V roce 1862 podal Strübing zevrubný klinický popis této nemoci a odlišil ji od paroxysmální chladové hemoglobinurie.

PNH je závažná nemaligní klonální expanze jedné nebo více kmenových buněk, které jsou postiženy somatickou mutací genu fosfatidylinositolové kotvy PI3-A (*phosphatidylinositol gen anchored*), který je uložen na krátkém raménku chromozomu X (Chen a spol. 2000). Tento gen se podílí na vzniku glykosyl fosfatidylinositolové kotvy GPI-APs (*glykosyl phosphatidylinositol – anchored proteins*). Tato kotva umožňuje připojení (ukotvení) protektivních proteinů, které omezují lytický účinek složek komplementu (Parker a spol. 2005). Takto změněný klonus může koexistovat s normální hematopoézou. U PNH je vždy přítomna současně i dřeňová insuficience.

Primární klinickou manifestací PNH je hemolýza erytrocytů během spánku s tmavou močí (hemoglobinurií po probuzení). PNH je charakterizována hemolytickou anémií s intravaskulární hemolýzou, dřeňovou insuficiencí a sklonem k trombózá (Rosse, 1997).

Příčina: PNH je získané onemocnění kmenové buňky, kdy erytrocyty jsou zvýšeně citlivé na lýzu komplementem. Somatickou mutací v hemopoetické kmenové buňce vzniká buněčný klonus s postižením myeloidní linie, který existuje společně s normální hematopoézou.

- Gen *PIG-A* se podílí na přenosu uridindifosfát-N-acetylglukosaminu na fosfatidylinositol, za vzniku N-acetylglukosamin-fosfatidylinositolu jako prvního produktu tzv. glykosylfosfatidové kotvy – **GPI-kotva**.

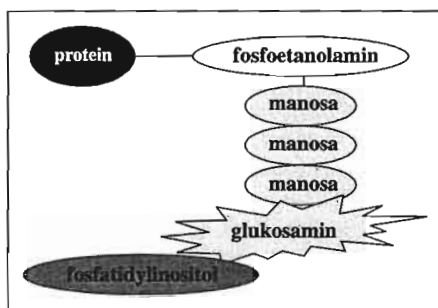


Ve změněných buňkách nedochází k navázání bílkovin, které jsou k membráně vázány pomocí GPI-kotvy. Některé z těchto bílkovin, které jsou pomocí GPI-kotvy připojeny k membráně erytrocytů, tlumí za normálních okolností funkci složek C3b a C8b aktivovaného komplementu (Moyo a spol., 2004).

- K bílkovinám, které jsou schopny reagovat s komplementem se řadí např. *MIRL* – membrane inhibitor of reactive lysis (CD59), *DAF* – Decay accelerating factor (CD55), *C8B-C8* a některé další.

Defekt je přítomen i na jiných buňkách, ale nejvíce se projeví na erytrocytech. Erytrocytová membrána, bez ochrany protektivních bílkovin, je mimořádně citlivá k lytickému účinku komplementu, který po aktivaci hemolysuje vadné krvinky již při velmi nízké koncentraci. Aktivace je účinnější při nižším pH (Van der Schoot, 1990).

- Somatickou mutaci lze molekulárně genetickými metodami prokázat i v ostatních buňkách (neutrofilech, monocitech, lymfocytech a megakaryocytech trombocy-

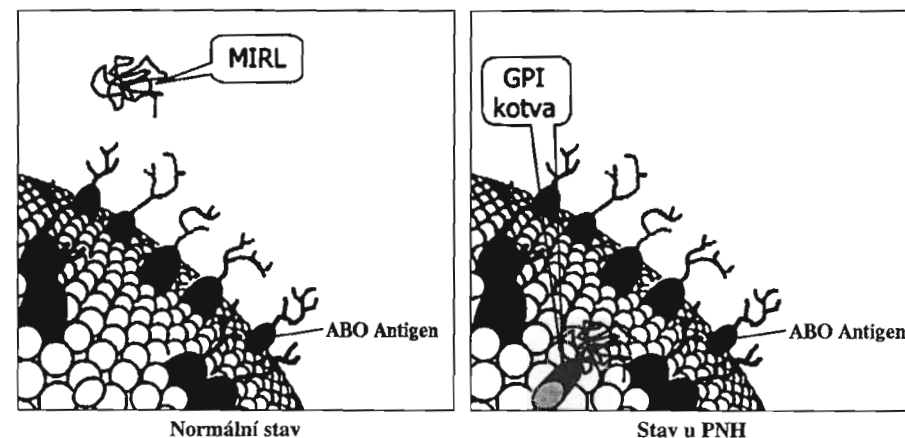


GPI-kotva

tech – postižení kmenové buňky. Předpoklad, že ke hemolýze dochází snížením pH během spánku se nepotvrdil.

Účinkem komplementu na membránu erytrocytů dochází k intravaskulární hemolýze s hemoglobinurií a vyvíjí se obraz **různě těžké hemolytické anémie**. Tíže onemocnění odvisí od počtu erytrocytů postižených genetickou mutací. Podíl abnormálních krvinek se pohybuje mezi 10–90 %.

SCHÉMA UKOTVENÍ PROTEKTIVNÍCH PROTEINŮ POMOCÍ GPI-KOTVY



- Podrobnějšími analýzami lze u nemocných rozlišit celkem 3 typy PNH (I – III), které se od sebe odlišují různou citlivostí ke komplementu. Kromě pacientů s PNH se podobná porucha vyskytuje i u MDS a u lymfoproliferativních nemocí.

Laboratorní nález

- *KO*: většinou normocytární hypochromní anémie, retikulocytoza, lehká leukopenie a trombocytopenie (jako výsledek dřeňové insuficience).
- *Kostní dřeň*: nejčastěji hypercelulární se zvýšeným podílem erytroidní složky
- *Moč*: přítomnost hemosiderinu v moči
- *Ostatní*: AF v leukocytech je snížena (následek snížení fosfatidylinositolu v buněčné membráně), pozitivní Hamův a Hartmanův test, negativní Coombsův test, snížené plazmatické a zásobní železo (ztráty vlivem hemoglobinurie a hemosiderinurie).
- *Hamův a Hartmanův test* se v dnešní době nahrazují fenotypizací (*CD59⁺ a 55⁺*) – prokazují se přímo proteiny *MIRL* a *DAF* (Nishimura a spol., 2004).

HEMOLYTICKÉ ANÉMIE Z PORUCHY ENZYMŮ

Červená krvinka, jelikož nemá jádro, má určenou konečnou enzymatickou výbavu získanou v erytroblastech.

Příčina: Nedostatek nebo funkční poruchy některých enzymů v červené krvince způsobí, že erytrocyt *přežívá v krevním oběhu kratší dobu*. Ke konci tohoto zkráceného období červená krvinka nedokáže plnit všechny své funkce, dochází ke změně jejího tvaru a následně k hemolýze. Jde o genetické poruchy v enzymech metabolismu červené krvinky, které mohou být vyvolány různými genetickými odchylkami (bodová mutace, inserce, delece aj.). Defekty enzymů vedou k různému stupni hemolýzy (Chrobák, 2004).

Genetické faktory mohou mít za následek:

- ❑ **nedostatek příslušného enzymu**
- ❑ **funkční nedostatečnost enzymu**, která vede k jeho rychlejšímu odbourávání (tato porucha se projeví až ve starších erytrocytech)
- **Nejčastěji jde o poruchy enzymů glykolýzy. Méně časté jsou anémie při poruchách metabolismu nukleotidů v erytroblastech a při snížené aktivitě ATP-azy vázané na membránu erytrocytů.**

Hemolytické anémie z poruchy enzymu glykolýzy můžeme dělit na:

- **defekty enzymů pentosofosfátového cyklu (porucha metabolismu glutathionu).** Obecně nepůsobí poruchy pentosofosfátového cyklu a metabolismu glutathionu spontánně žádnou nebo jenom nevýraznou hemolýzu. Teprve působením vnějších příčin (léky, infekce, savičské boby (*Vicia faba*) – favismus) vznikají hemolytické krize způsobené pravděpodobně snížením koncentrace redukovaného glutathionu. Oxidovaný hemoglobin precipituje v erytrocytech za tvorby Heinzových tělísek.
- **defekty enzymů anaerobní glykolýzy.** Úplná blokáda glykolýzy by zastavila produkci ATP – erytrocyty by nebyly životaschopné. Většina enzymových poruch je proto jen částečná, ale i tak působí zkrácení životnosti erytrocytů s projevy hemolýzy. Záleží ne to, jestli je narušena metabolická cesta některého z enzymů před anebo po tvorbě 2,3-BPG. Pokud je narušena metabolickým blokem syntéza 2,3-BPG je anémie špatně snášena, neboť 2,3-BPG nemůže být kompenzačně zvýšen a tím je výrazně ovlivněna afinita hemoglobinu ke kyslíku.

Nejčastěji jde o poruchy těchto enzymů:

- ◆ **glukoso-6-fosfát dehydrogenázy (G-6-PD)**
- ◆ **pyruvátkinázy**
- **Méně časté jsou poruchy enzymů: glukosofosfátizomerázy, fosfofruktokinázy, tri-azofosfatisomerázy, fosfoglyceratkinázy, 2,3-difosfoglyceromutázy.**

DEFEKT GLUKÓZO-6-FOSFÁT DEHYDROGENÁZY

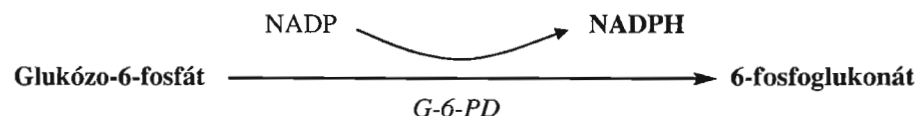
Hemoglobin a membrána červenýchrvinek jsou chráněny před oxidačním stresem redukovaným glutathionem (GSH). Při nedostatku glukoso-6-fosfát dehydrogenázy (G-6-PD) je porušena syntéza NADPH, která udržuje glutathion v redukované formě.

Oxidační stres může být vyvolán:

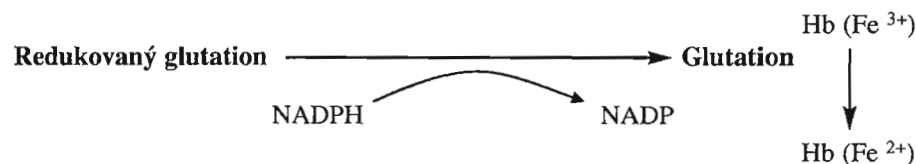
- ❑ poruchou membrány erytrocytu
- ❑ poruchou hemoglobinu – Heinzova tělíska
- ❑ nedostatečnou tvorbou GSH

Příčina: Vrozená genetická odchylka vedoucí ke snížení hladiny nebo aktivity enzymu G-6-PD, který je kódován na X chromozomu. Proto je defekt patrný obvykle jen u mužů. U nemocných s nedostatkem nebo chyběním tohoto enzymu (*snížení hladiny na 1–20 % hodnoty normálu*) dochází při vystavení organismu tzv. „oxidační zátěží“ k *oxidaci SH skupin* a následně k denaturaci hemoglobinu. Oxidovaný hemoglobin precipituje v hemoglobinu za vzniku Heinzových tělísek. Současně dochází k oxidaci lipidových membránových struktur v červených krvinkách a to následně vyvolá hemolýzu.

G-6-PD katalyzuje přeměnu glukoso-6-fosfátu na 6-fosfoglukonát, za současného vzniku NADPH.



Při nedostatečné funkci enzymu dochází k nedostatečné tvorbě NADPH. Jeho nedostatek vede ke snížení produkce glutathionu, který chrání hemoglobin před oxidací.



- **Genetická změna v genu pro G-6-PD vede k akutním hemolytickým stavům při oxidační zátěži různého stupně, vzácněji i ke chronické hemolýze. Existuje více než 400 strukturálních variant genu pro G-6-PD. Ne všechny vedou ke klinickým potížím. Podle WHO klasifikace se poruchy G-6-PD rozdělují do několika tříd (I–V).**

Laboratorní nález

- **Krevní nátěr:** puchýřkovité erytrocyty (erytrocyty, které ztratily část membrá-

ny). Po precipitaci oxidovaného hemoglobinu zůstala volná místa tvarem připomínající puchýřky, vitálním barvením se prokázají Heinzova tělíska.

- *Ostatní:* osmotická a mechanická rezistence je normální.

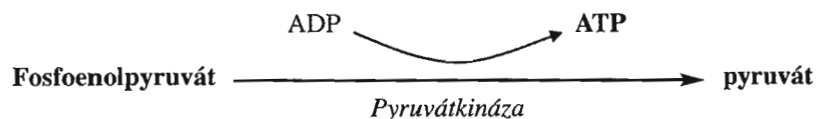
DEFEKT PYRUVÁTKINÁZY

Byl poprvé popsán v roce 1961. Jde o autozomálně recesivní onemocnění.

Příčina: Pyruvátkinázu kódují 2 různé geny, které vytváří 4 různé isoenzymy. Gen PKM2 je uložen na chromozomu 15 (15q22) a gen PKLR je umístěn na chromozomu 1 (1q21). Je známo asi 50 variant genu PKLR. Změna v některém z těchto genů nebo v obou současně může vést ke změně funkčnosti generovaného enzymu.

- *Gen PKLR kóduje isoenzymy PK-L (v hepatocytech) a isoenzymy PK-R (v erytrocytech).*

Pyruvát je enzym anaerobní glykolýzy (Embden-Meyrhofova cyklu), který katalyzuje přeměnu fosfoenolpyruvátu na pyruvát, za současného vzniku makroenergetického fosfátu ATP.



Snížená hladina enzymu nebo blokáda jeho funkce vede ke snížení tvorby ATP. Porucha enzymu se projevuje hemolýzou, protože erytrocytu schází chemická energie v podobě ATP.

Laboratorní nález

- *KO:* lehce zvýšený počet retikulocytů, Hb se může pohybovat v rozmezí 40–100 g/l.
- *Krevní nátěr:* normocytární až lehce makrocytární erytrocyty, polychromázie, anizocytoza
- *Kostní dřev:* hyperplazie červené řady
- *Ostatní:* pozitivní test autohemolýzy

HEMOLYTICKÉ ANÉMIE

Z ODCHYLEK V MOLEKULE Hb

Hemoglobinopatie jsou vrozenými defekty genu tvořícího řetězce globinu v hemoglobinu. V molekule globinu dochází k záměně aminokyselin a následně k vytvoření patologicky změněné molekuly hemoglobinu. Jen některé z těchto patologicky změněných hemoglobinů vytváří nestabilní formy, které mohou vyvolat hemolytické stavy. Z hemoglobinopatií sdružených s hemolýzou jsou nejznámější **hemoglobinopatie S, dále C, D, E a tzv. nestabilní hemoglobiny.**

HEMOGLOBINOPATIE S

(Srpkovitá anémie – S z angl. slova: sickling – srpkovatění)

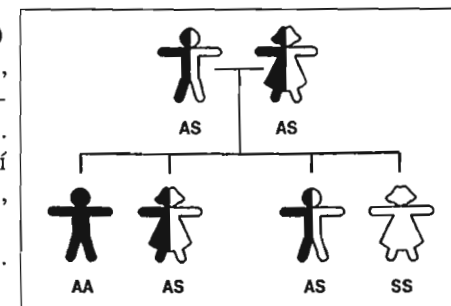
V r. 1910 James Herrick pozoroval jako první v krvi anémického studenta medicíny z Jamajky přítomnost krvinek srpkovitého tvaru. V roce 1949 Linus Carl Pauling a spolupracovníci popsali u této srpkovité anémie pomalou pohyblivost Hb při ELFO.

Příčina: Hemoglobinopatie S je dědičná hemolytická choroba, u které dochází k **záměně glutamové kyseliny za valin v 6. pozici β -globinového řetězce** (Eaton a Hofrichter, 1990). Takto změněný hemoglobin se označuje jako **hemoglobin S (HbS)**. HbS se při nízké tenzi kyslíku stává nerozpuštěným, polymeruje a dává vznik krvinkám tvaru srpku, které blokují mikrocirkulaci se vznikem infarktů postižených orgánů. Tíže příznaků závisí na koncentraci HbS v krvinkách.

Existují dvě formy anémie:

- ◆ **homozygotní: HbSS** (řetězec: 2 α , 2S)
- ◆ **heterozygotní: HbSA** (řetězec: 2 α , S, β) – u tohoto stavu obsahují erytrocyty 40 % HbS a 60 % HbA. K srpkovatění krvinek zde dochází jen za extrémních situací (hypoxie, námaha, chlad).

Každá z forem má odlišný klinický průběh.



Dědičnost u srpkovité anémie
(HbAA – normální Hb, AS – HbSA heterozygotní forma, HbSS – homozygotní forma)

➤ Charakteristiky molekuly HbS

HbS má o 2 negativní náboje méně a proto má jiné fyzikální vlastnosti než normální hemoglobin.

- **Záměna glutamové kyseliny (Glu) za valin (Val) v molekule hemoglobinu vede k jinému rozložení nábojů na povrchu globinu a tím následně ke snížení rozpustnosti.** Glu je polární aminokyselina a může na rozdíl od Val vázat vodu).
- **Rozpustnosti oxygenové formy HbA a HbS se od sebe příliš neodlišují, kdežto deoxygenovaná forma HbS na rozdíl od deoxygenované formy HbA je jen velmi málo rozpustná (asi 2 % rozpustnosti HbA) a může se uvnitř erytrocytu vylučovat jako polopevný gel.** Při gelovatění se molekuly HbS hromadí v erytrocytu palisádovitě, polymerují a tvoří formaci lineárních agregátů, které vedou k deformaci erytrocytu na **srpkovitý nebo poloměsíčkovitý tvar** (Eaton a Hofrichter 1990). K polymeraci dochází jen tehdy, jestliže erytrocyty setrvávají delší dobu v tkáních s nízkým parciálním tlakem kyslíku. K tomu může dojít jsou-li erytrocyty vystaveny déle než 15 sekund nedostatku kyslíku. Při normální rychlosti oběhu se během této doby erytrocyty dostanou zpět do plic, kde se oxygenují a HbS ztrácí tendenci k polymeraci.

Srpkovité buňky mají změněnou permeabilitu membrán a menší tvarovou přizpůsobivost. Malá tvarová přizpůsobivost erytrocytů vede k ucpání kapilár s lokálním městnáním krve, k acidose a k orgánovým infarktům. Protože se takovéto buňky ve slezině snadněji odbourávají, pozorujeme vznik těžké hemolytické anémie.

Po uvolnění kyslíku v tkáních dochází k polymeraci molekul HbS za vzniku srpkovitého tvaru krvinky. K srpkovatění krvinek dochází v drobných periferních kapilárách. Ty mohou být ucpány srpkovitými erytrocyty, dochází ke stagnaci krve a následně k poklesu kyslíku v tkáních. To vede k vazookluzivní krizi s krutými bolestmi v postižené oblasti.

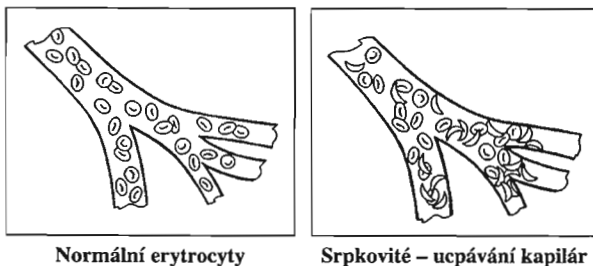
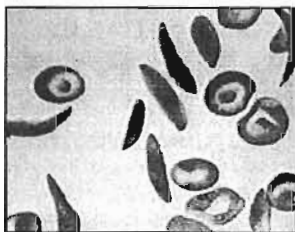
Je-li srpkovitý erytrocyt vystaven nedostatku kyslíku jen omezenou dobu je změna jeho tvaru reverzibilní. Po dlouhodobé deoxygenaci dochází k nevratné změně v důsledku rigidity erytrocytární membrány. Erytrocyt je pak odstraněn z obvodové krve MFS.

➤ *Srpkovatění erytrocytů je pravděpodobně selekční ochranou proti tropické malárii. Buňky napadené původcem malárie vytváří srpky zvláště snadno a jsou fagocytovány ve slezině. Tím nedochází k rozvoji onemocnění.*

Laboratorní nález

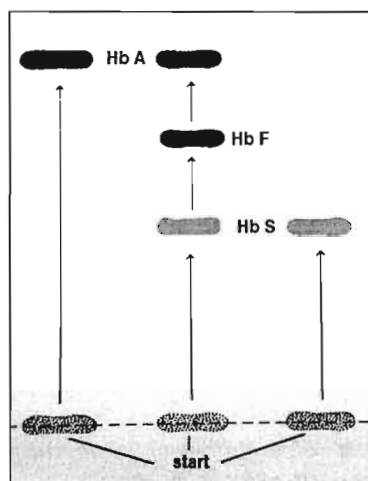
- *KO:* anémie, retikulocytoza, trombocytoza
- *Krevní nátěr:* drepanocyty, leptocyty, anizocytoza, poikilocytoza, Howellova-Jollyho tělíška
- *Kostní dřev:* hyperplazie červené řady, drepanocyty
- *Ostatní:* změny v elektroforéze hemoglobinu (nachází se HbS a HbF, ale žádný HbA), zkráceno přežívání erytrocytů.

Drepanocyty v periferní krvi



Normální erytrocyty

Srpkovité – ucpávání kapilár



Elektroforéza Hb

HEMOGLOBINOPATIE C

(Anémie s terčovitými erytrocyty)

Hemoglobinopatie C je autozomálně recesivní dědičná hemolytická choroba, u které dochází k **záměně kyseliny glutamové za Lys v 6. pozici β -globinového řetězce**. Hemoglobin se označuje jako **hemoglobin C (HbC)**. Hemoglobin C existuje v obou formách homozygotní (HbCC) a heterozygotní (HbAC). Hemoglobin C je méně rozpustný než HbA, což má za následek sníženou flexibilitu červené krvinky. Přežívání erytrocytů je zkráceno a proto dochází k hemolýze erytrocytů.

Laboratorní nález

- *KO:* lehká retikulocytoza
 - *Krevní nátěr:* mikrocytoza, leptocyty (až 90 %) s nálezem romboidních krystalků, polychromazie
 - *Ostatní:* snížená osmotická rezistence, elektroforéza hemoglobinu – nález HbC
- *HbC podobně jako HbS zamezuje uvolnění merozoita malarických parazitů a tím se snižuje riziko rozvoje infekce.*

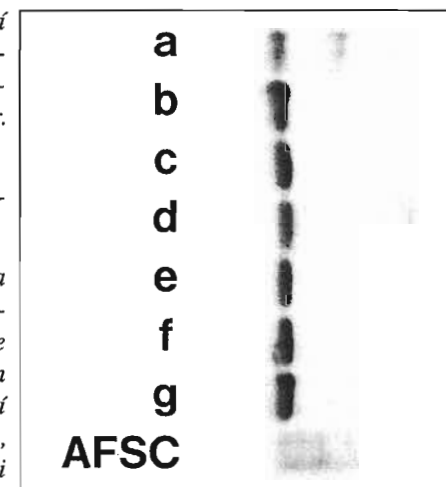
HEMOGLOBINOPATIE E

(Anémie s nálezem mikrocytozy)

➤ *S přílivem imigrantů z jihovýchodní Asie se v Evropě setkáváme s homozygotní formou hemoglobinopatie E, která je klinicky podobná talasemii minor.*

Laboratorní nález

- *Krevní nátěr:* mikrocytoza, hypochromie, leptocyty
- *Ostatní hemoglobinopatie zejména hemoglobinopatie z nestabilních hemoglobinů jsou velmi vzácné. Může se jednat o záměny aminokyselin v oblasti tzv. hemové kapsy, narušení sekundární struktury hemoglobinu, narušení kontaktu mezi globinovými řetězci. Stabilitu hemoglobinu může narušit i chybění jedné či více aminokyselin v globinovém řetězci (kratší řetězec) nebo naopak přítomnost většího počtu aminokyselin v řetězci (delší řetězec). Zvláštní skupiny tvoří hemoglobinopatie s HbM a hemoglobinopatie se zvýšenou afinitou kyslíku.*



Elektroforéza Hb – HbE (d)

ZÍSKANÉ HEMOLYTICKÉ ANÉMIE

Extrakorpuskulární hemolytické anémie

Příčina: u těchto stavů dochází ve většině případů k *poškození normálních erytrocytů vnějšími faktory*. Tyto faktory mohou vyvolat jejich zkrácené přežívání. Vyvolávajícími faktory mohou být složky, které mají povahu:

- ❑ *imunitní*
- ❑ *neimunitní*

HEMOLYTICKÉ ANÉMIE IMUNITNÍ POVAHY

Nejčastějšími poruchami způsobujícími hemolýzu jsou hemolytické anémie imunitní povahy.

Příčina: u těchto stavů jsou *červené krvinky obklopeny imunoglobuliny s komplementem, nebo bez něj*. Vazba protilátek namířených proti některému z membránových antigenů červené krvinky vede k intravaskulární hemolýze aktivací komplementu, či k zániku erytrocytů s navázanou protilátkou v MFS (extravaskulární hemolýza).

Antierytrocytární protilátky mohou působit dvěma mechanismy:

- ◆ vyvolávají buňkami zprostředkovaný extravaskulární zánik erytrocytů (protilátky typu IgG)
- ◆ komplementem zapříčiněnou intravaskulární hemolýzu (protilátky typu IgM)

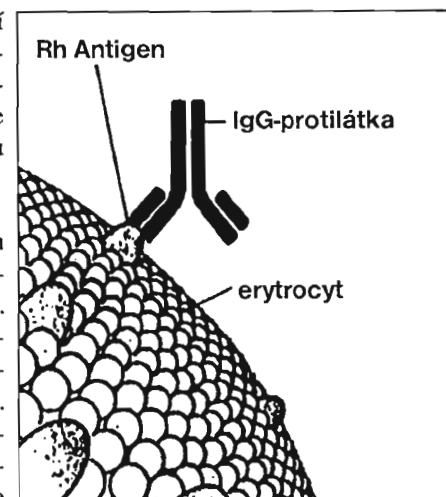
Na vzniku protilátek se mohou podílet různá infekční, zánětlivá a maligní onemocnění, toxiny a léky. Nejčastěji lze prokázat tři typy senzibilizace:

- na povrchu červené krvinky jsou navázány jen **IgG protilátky**
- na povrchu červené krvinky jsou navázány jen **IgM protilátky**
- na povrchu červené krvinky jsou navázány **IgG + IgM protilátky**

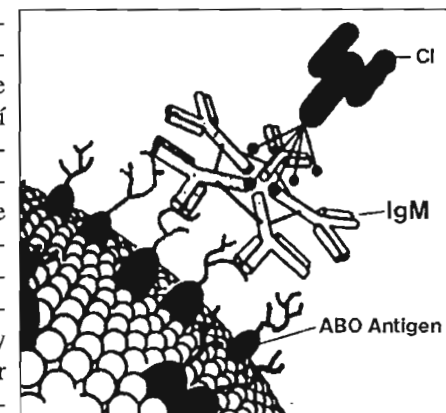
- ❑ **Protilátky IgG** – způsobují senzibilizaci erytrocytu a jejich následnou sekvestraci a destrukci ve slezině. Protilátky IgG se váží na erytrocyty při teplotním optimu 37 °C, mluvíme o tepelných autoprotílátkách – dochází k hemolýze při teplotě 37 °C, jež má většinou extravaskulární charakter. Vzhledem k tomu, že IgG-protilátka je monomer, dochází k aktivaci komplementu, jež vede k intravaskulární hemolýze jen při vysokém titru protilátek zajišťujícím jejich vazbu na těsná sousední místa erytrocytu. Většinou dochází k vazbě komplexu protilátka – erytrocyt s receptorem pro Fc-fragment zejména na povrchu makrofágů ve slezině. Hemolýza má tedy při přítomnosti tepelných protilátek převážně extravaskulární charakter. Protilátky tedy vyvolávají senzibilizaci erytrocytu a jeho následné zadržení a destrukci ve slezině makrofágy. Buňky MFS mohou adherované erytrocyty fagocytovat zcela nebo pohltit jen

část erytrocytové membrány s částí hemoglobinu. Erytrocyt se snaží membránu uzavřít atím se stává více sférickým a méně schopným deformace a je v krátké době zachycen slezinou (Čermák, 2005).

- ❑ **Imunoglobuliny IgM** – vedou k přímé intravaskulární hemolýze krvinek cestou aktivace komplementu. Protilátky IgM se vážou při teplotním optimu 4 °C, a mají tudíž charakter chladových autoprotílátek. K vazbě protilátek na erytrocyty dochází v chladnějších částech organismu. Vzhledem k tomu, že protilátky třídy IgM tvoří pentamery, je jejich přítomnost spojena s vyšší pravděpodobností aktivace komplementu a rozvoje intravaskulární hemolýzy – dochází k přímé cytolýze (Čermák, 2005). Většinou však není vazba na erytrocyt pevná a v oblastech s vyšší teplotou je část protilátek opět uvolněna, aniž došlo k lýze erytrocytů. Na krvinkách však zůstává navázána C3b-složka komplementu, jež se váže na receptor makrofágů sleziny, hemolýza má tedy současně i extravaskulární charakter (Zilow a spol., 1994). Erytrocyty senzibilizované protilátkou zanikají hlavně v Kupfferových buňkách jater, které mají receptor pro složky komplementu C3b navázané na krvinkách v důsledku aktivace komplementu.



Fc – část: vazebné místo pro C1q složku komplementu a Fcγ receptor makrofágů



Fc – část: vazebné místo pro C1q složku komplementu a receptor mikrofágů

Hemolytické anémie imunitní povahy mohou být vyvolány:

- **autoprotílátkami (autoimunitní)** – po selhání kontrolních mechanismů imunity si organismus vytváří protilátky proti buňkám vlastního těla.
- **aloprotílátkami (aloimunitní)** – namířené původně proti organismům nebo antigenům jiného druhu.

Laboratorní nález

- Základním vyšetřením v diferenciální diagnostice hemolytických anémií je Coombsův test, jehož pozitivita svědčí pro imunitní povahu hemolytického procesu.

AUTOIMUNITNÍ HEMOLYTICKÉ ANÉMIE (AIHA)

AIHA jsou hemolytické anémie, u nichž je zánik červených krvinek způsoben přítomností protilátek namířených proti vlastním krvinkám jedince.

Příčina: Autoimunitní hemolytické anémie vznikají jako důsledek dysregulace kooperace mezi T- a B-lymfocyty při procesu tzv. autotolerance, tj. rozpoznávání antigenů organismu vlastních a cizích. Příčina hemolýzy často není zjištělná, část hemolytických anémií může být sekundární při infekcích, zánětech, systémových onemocněních či nádorech.

➤ *Autoimunita je reakce imunitního systému proti vlastním tkáním (krvinkám) vedoucí k jejich poškození. Hemolýzu u těchto stavů vyvolávají protilátky, které se tvoří ve tkáních vlastního organismu – autoprotilátky. Protilátky proti vlastním krvinkám se tvoří z různých příčin porušené imunologické tolerance. Autoprotilátky se vážou na membránu a způsobí zánik červených krvinek. Etiologie vzniku většiny protilátek proti červeným krvinkám není dosud plně objasněna. Časté sdružení s lymfoproliferativními stavy ukazuje na určitou souvislost s dysfunkcí imunitního systému, ale mohou se uplatnit i jiné faktory (Chrobák, 2004). Základním momentem při vzniku autoimunitní hemolytické anémie je zřejmě porucha kooperace mezi pomocnými a supresorickými T-lymfocyty a B-lymfocyty, jež se uplatňuje v procesu imunitního dozoru, tj. v rozpoznávání organismu vlastních a cizích antigenů (Mackay, 2000; Ring a Lakkias, 1999). Dysregulace tohoto procesu vede k nedostatečné supresi tvorby protilátek proti vlastním antigenům či paradoxně ke stimulaci jejich tvorby. Antigenní podnět může představovat bakteriální, virová či mykoplasmatová infekce. Vyvolávajícím podnětem může být i destrukce tkání způsobená infekcí či zánětem, jež vede k vyplavení tkáňových antigenů, které se jen zřídka dostávají do cirkulace a nepodléhají procesu autotolerance (self-tolerance), či antigenů, které nejsou exprimovány v časně ontogenezi, kdy výše zmíněný proces tolerance probíhá (např. li-antigenní systém erytrocytů). Monocyty, makrofágy či B-lymfocyty tvoří tzv. antigen prezentující buňky, jež nabízejí antigen po jeho digesci na peptidy a vazbě na molekuly hlavního histokompatibilního systému (MHC) II. třídy za spoluúčasti stimulačních molekul Th0 pomocných lymfocytů. Th0-lymfocyty se po kontaktu s antigenem mohou přeměnit účinkem cytokinů na Th1-lymfocyty, účastnící se autoimunitní a zánětlivé reakce, či na Th2-lymfocyty, mající důležitou úlohu v autoimunitní*

protekcí (Mackay, 2000; Ring a Lakkias, 1999). Dysregulace poměru mezi oběma typy lymfocytů může mít za následek tvorbu autoprotilátek.

Laboratorní nález

- Základním testem sloužícím k průkazu protilátek vyvázaných na erytrocyty nebo volných cirkulujících protilátek je přímý a nepřímý antiglobulinový (Coombsův) test. Pro přítomnost intravaskulární hemolýzy svědčí kromě zvýšeného množství volného hemoglobinu v plazmě a přítomnosti hemoglobinurie i snížená hladina sérového haptoglobinu.
- *Krevní obraz:* snížené hodnoty RBC, Hb, Hct, zvýšený počet retikulocytů
- *Krevní nátěr:* makrocytoza, polychromazie
- *Ostatní:* zvýšená hladina přímého i nepřímého bilirubinu v séru, zvýšená hladina volného Hb.
- *Moč:* přítomnost urobilinogenu

Klasifikace AIHA

Hemolytické anémie s tepelnými i chladovými protilátkami mohou vznikat jako idiopatické bez prokazatelné vyvolávající příčiny, či jako sekundární v návaznosti na infekci nebo v průběhu zejména nádorových či autoimunitních onemocnění. Zvláštní skupinu tvoří polékové autoimunitní hemolytické anémie, při nichž působí lék jako haptén či tvoří imunokomplexy vážící se na povrch erytrocytů nebo působí jako stimulator tvorby protilátek proti některým antigenům erytrocytární membrány.

1. AIHA s tepelnými a chladovými protilátkami

(Odlišují se podle toho, při jaké teplotě dochází k interakci protilátky s červenou krvinkou.)

- ☐ s tepelnými protilátkami
 - idiopatické
 - sekundární
 - hemolytické anémie indukované léky
- ☐ s chladovými protilátkami
 - s vysokým titrem chladových aglutininů
 - paroxysmální chladová hemoglobinurie (PCHH)
- ☐ s tepelnými a chladovými protilátkami

2. Polékové hemolytické anémie na imunitním podkladě

(Jsou výsledkem interakce mezi lékem, protilátkou a komponentami erytrocytární membrány.)

- ☐ hapténový typ
- ☐ imunokomplexový typ
- ☐ novotvorba antigenu
- ☐ alfa metyldopový typ

1. AIHA S TEPELNÝMI A CHLADOVÝMI PROTILÁTKAMI

◆ AIHA s tepelnými protilátkami

Mají optimum účinnosti při 37 °C, z 99 % jde o protilátky třídy IgG. Tepelné protilátky jsou namířeny nejčastěji proti antigenům Rh systému, vzácněji pak proti ostatním antigenům krevních systémů.

Dělí se na:

- **idiopatické**
 - **sekundární** (lymfoproliferace, jiné nádory, autoimunitní choroby, virové infekce, imunodeficience)
- Tepelná závislost této reakce se vysvětluje změnami konformace molekul auto-prottilátky tvořící součást membrány červené krvinky. Při 37 °C je antigen „zanořen“ do membrány, při nižších teplotách se vlivem změněné konformace „vy-noří“. Je pozitivní pouze přímý Coombsův test, který je závislý na titru prottilátky. Titr chladových prottilátek se zvýší až na hodnoty kolem 10^5 – 10^6 .

Laboratorní nález

- **Krevní obraz:** normocytová, někdy makrocytová anémie, může být leukocytoza s neutrofilii, retikulocytoza
- **Krevní nátěr:** sférocyty, anizocytoza, polychromazie, u těžkých stavů přítomny normoblasty
- **Kostní dřev:** občasný nález megaloblastů
- **Cytochemie:** sideroblasty v normálním až zvýšeném počtu
- **Ostatní:** zvýšen nepřímý bilirubin, osmotická rezistence snížena (úměrně k počtu sférocytů), autohemolýza pozitivní, pozitivní přímý Coombsův test, při vysokém titru je pozitivní i nepřímý Coombsův test.

◆ AIHA s chladovými protilátkami

Optimum účinnosti při 0–4 °C, ale jejich reaktivita se může projevit již při teplotě pod 7 °C, jde hlavně o protilátky IgM. Prottilátky typu IgM mají asi v 90 % specifitu anti-I, ve zbylém procentu anti-i.

Dělí se na:

AIHA s vysokým titrem chladových aglutininů

- **idiopatické**
- **sekundární:** akutní (v souvislosti s infekcí)
chronické (lymfoproliferativní stavy)

Laboratorní nález

- **Krevní obraz:** normocytová anémie sezonního charakteru (zvýrazňuje se v chladných měsících roku), retikulocytoza
- **Krevní nátěr:** polychromazie, u těžkých stavů přítomny normoblasty, v nátěru aglutinace erytrocytů

- **Ostatní:** vysoká hladina chladových aglutininů, zvýšena hodnota volného Hb, pozitivní přímý Coombsův test

Paroxysmální chladová hemoglobinurie (PCHH)

- **idiopatická**
- **sekundární:** akutní s přechodným průběhem (infekce, jiné než syfilis)
chronická (syfilis)

- PCHH vyvolávají bifázické prottilátky Donathova-Landsteinerova typu. Prottilátka se za chladu naváže na erytrocyty, v centrální cirkulaci při oteplení krve dojde k hemolýze. Jde o chladovou komplement fixující prottilátku třídy IgG, specifitu anti-P, která je silným bazickým hemolyzinem, který se za chladu naváže na erytrocyty a fixuje komplement. V centrální cirkulaci krve pak při oteplení způsobí hemolýzu erytrocytů. U nemocného se objeví hemoglobinurie.

◆ AIHA s tepelnými a chladovými protilátkami

Jde o velmi vzácná onemocnění, kdy u nemocného s AIHA s tepelnými protilátkami se vyskytují současně i chladové aglutininy ve vysokém titru.

Dělí se na:

- **idiopatické**
- **sekundární** (lymfoproliferativní stavy)

2. POLÉKOVÉ HEMOLYTICKÉ ANÉMIE NA IMUNITNÍM PODKLADĚ

Léky mohou způsobit hemolýzu imunitním nebo neimunitním mechanismem. Hemolytické anémie vyvolané léky jsou výsledkem interakce mezi lékem, prottilátkou a komponentami erytrocytární membrány.

Rozlišují se 4 základní typy:

- **hapténový (penicilinový) typ: adsorpce na povrch erytrocytu.** Lék nebo jeho metabolit se váže pevně na membránu erytrocytu a působí vlastně jako haptén. Proti tomuto membránovému uspořádání hapténového typu se tvoří prottilátky, které reagují s lékem, ale poškozují zároveň krvinku, takže dochází k její lýze. Vyskytuje se při léčbě vysokými dávkami penicilinu.
- **Imunokomplexový typ: tvorba imunitních komplexů s následnou adsorpcí na povrch erytrocytů.** Lék vyvolá tvorbu prottilátky, která společně s lékem a bílkovinami plazmy vytváří imunokomplexy, které se pak slabě váží na určitý antigen erytrocytu (Rh, Kidd aj.). Imunitní systém pak reaguje s tímto trimerním komplexem. Hemolýza je hlavně vyvolána aktivací komplementu na povrchu erytrocytu. Prottilátka je hlavně charakteru IgM, částečně i IgG. AIHA se nachází u nemocných léčených chininidem, chininem a stibofenem. Mechanismus může být současně namířen i proti leukocytům a trombocytům.
- **Neoantigenový typ: vazba léku na membránu erytrocytu vytváří novou antigenní strukturu proti které se organizmus brání tvorbou prottilátek.**

- ❑ **Alfa metyldopový typ: neznámý mechanismus.** Jde zřejmě o ovlivnění T-lymfocytů lékem. T-lymfocyty pravděpodobně ztrácí svou supresorovou regulační funkci a to může vést druhotně k tvorbě autoprotilátek B-lymfocyty. Protilátka má charakter IgG a je namířena proti přirozenému antigenu červené krvinky. AIHA se vyskytuje u 1% nemocných léčených α -metyldopou.

ALOIMUNITNÍ HEMOLYTICKÉ ANÉMIE

Příčina: mechanismus hemolýzy spočívá v *tvorbě protilátek namířených proti organismu cizím antigenům* (organizmus se s nimi ještě nesetkal). Ty se vytváří tehdy, proniknou-li do krevního oběhu cizí erytrocyty s antigenně odlišnou výbavou.

Aloimunitní hemolytické anémie vznikají důsledkem imunizace při:

- **inkompatibilní transfuzí erytrocytů**
- **těhotenství s rozdílnými skupinovými znaky erytrocytů matky a plodu**

Laboratorní nález

- Pozitivní Coombsův test a průkaz protilátek (specifická, titr)

HEMOLYTICKÉ TRANSFÚZNÍ REAKCE

Příčina: K hemolýze dochází z důvodu *neslučitelnosti krve dárce a příjemce*.

O závažnosti hemolytické reakce rozhodují:

- ❑ **Protilátky** – hemolytickou transfúzní reakci mohou vyvolat jen protilátky účinné při teplotě těla. **Tíže hemolýzy závisí:**
 - **na titru protilátek**
 - vysoký titr – hemolyticky velmi účinné protilátky
 - nízký titr – hemolyticky méně účinné protilátky
 - **na složení a struktuře protilátky**
 - IgM protilátky jsou účinnější než IgG protilátky (IgM protilátky nastartují aktivaci komplementu již při titru 100 x menším, než IgG protilátky)
 - IgG molekuly podtřídy 1 a 3, aktivují komplement lépe, než IgG podtřídy 2, 4
- ❑ **Antigeny** – nejen protilátky, ale i antigeny ovlivňují rozsah hemolytických reakcí. Hemolýza je závislá na:
 - **na hustotě odpovídajících antigenů na membráně erytrocytu.** Erytrocyty krevní skupiny A2 (se svými 400 tisíci antigenními místy) jsou u příjemce skupiny O odbourávány rychleji, než erytrocyty krevní skupiny A1 (1.2 milionů antigenních míst na membráně erytrocytů).
 - **na tom, zda jde o heterozygota nebo homozygota.** Heterozygotní krvinky přežívají déle než homozygotní.
 - **na množství inkompatibilních erytrocytů.** Menší množství inkompatibilních erytrocytů je odbouráno rychleji, než větší množství.

- ❑ **Komplement** – Intravaskulární hemolýza může být zastavena:

- spotřebením komplementu
- vyčerpáním protilátky

- ❑ **Stav MFS** – u extravaskulární hemolýzy hraje podstatnou roli konečná kapacita monocytů a makrofágů.

- Během 24 hodin jsou monocyty a makrofágy schopny odbourat erytrocyty z 1 krevní konzervy.

Hemolytická transfúzní reakce může mít průběh:

- ❑ **akutní:** objevuje se během transfuze nebo 1–2 hodiny po transfuzi
- ❑ **opožděný:** objevuje se několik týdnů po transfuzi

Akutní hemolytická reakce

Hemolýza může začít v buňkách systému monocytů – makrofágů nebo v játrech či slezině a to:

- intravaskulárně – **aktivace komplementu jen do stupně C9**
- extravaskulárně – **aktivace komplementu jen do stupně C3**

- *Většinou v praxi nelze rozlišit hranici mezi intravaskulární a extravaskulární hemolýzou, protože jde o směs různých typů protilátek – dochází k jejich překrývání.*

Rozlišujeme:

- ❑ Akutní (intravaskulární) hemolytické potransfúzní reakce
- ❑ Pozdní potransfúzní hemolytické reakce
- ❑ Hemolytické onemocnění novorozenců (HON)

AKUTNÍ INTRAVASKULÁRNÍ HEMOLYTICKÁ POTRANSFÚZNÍ REAKCE

Příčina: Po krevní transfuzi dochází k rychlé destrukci červených krvinek účinkem protilátek, které jsou přítomny v plazmě příjemce. Hemolýza se vyvolá všemi protilátkami, které při vazbě na odpovídající erytrocytární antigeny **aktivují kaskádu komplementu**.

- *Při aktivaci komplementu dochází k aktivaci komplexu C5b-9. Tyto složky se vážou na membránu erytrocytu, těžce ji poškozují – hroutí se membránové struktury a buňky se ničí.*

Projevy: Již po podání několika desítek ml transfundovaného přípravku dochází k prudkým bolestem v kříži, pocitu svírání na hrudi, dýchavičnosti, nevolnosti, zvracení, zesínání v tváři a vyrazí se studený pot. Objevuje se hemoglobinemie a hemoglobinurie. Pokud se v transfuzi pokračuje pacient ztrácí vědomí a může i zemřít.

- *V případě, že se transfuze zavčas přeručí dochází k celkovému zlepšení stavu. Nemocný dostane horečku, objeví se příznaky hemolytické žloutenky a má tma-*

vou moč (Hb z rozpadlých erytrocytů). Potransfuzním hemolytickým reakcím má zabránit provedení biologického testu.

Tyto stavy vyvolávají především:

- **protilátky třídy IgM:** anti- Le^a , anti- Le^b , anti-A, anti- P_1 , anti-H, anti-I, anti-M, anti-N, anti-D
- **protilátky třídy IgG:** anti- Jk^a , anti- Jk^b , anti-K, anti-S, anti- Fy^a , anti- Fy^b

NAPROSTÁ VĚTŠINA AKUTNÍCH REAKCÍ JE ZAVINĚNA INKOMPATIBILITOU V SYSTÉMU ABO V DŮSLEDKU ZÁMĚNY KREVŇÍHO VZORKU NEBO KONZERVY!

PROTILÁTKU, KTERÁ HEMOLÝZU VYVOLALA, JE NUTNÉ IDENTIFIKOVAT. NENÍ TO MOŽNÉ VĚTŠINOU IHED, ALE AŽ PO NĚKOLIKA DNECH, KDY STOUPNE JEJÍ TITR!

POZDNÍ POTRANSFUZNÍ HEMOLYTICKÁ REAKCE

Hemolytická reakce se projeví později než za 24 hodin. Jde o sekundární protilátkovou odpověď. Pozdní reakce jsou velmi vzácné.

Příčina: vytvoření protilátky proti antigenu se kterým se organismus již setkal. Dochází k tomu za 3–10 nebo i více dní. Erytrocyty dárce se extravaskulárně rozpadají a jsou odstraňovány MFS.

Projevy:

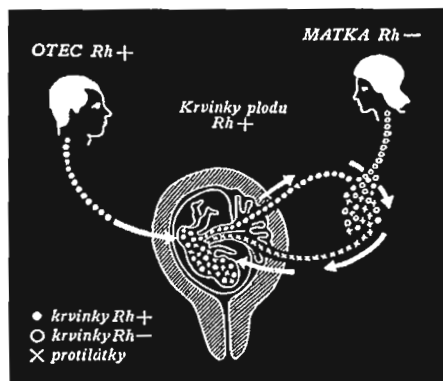
- horečka, třesavka
- pokles červeného obrazu, pozitivní přímý Coombsův test

HEMOLYTICKÉ ONEMOCNĚNÍ NOVOROZENCŮ (HON)

HON je těžké onemocnění, které se projevuje podle závažnosti *celkovým otokem plodu (hydrops fetus universalis)*, *žloutenkou s celkovým poškozením mozkových jader plodu*, případně *hemolytickou anémií vyvolanou protilátkami*.

Příčina: HON vyvolávají protilátky vznikající v těle matky po imunizaci inkompatibilními krvinkami plodu. Nejčastěji se jedná o systémy Rh, ABO.

- ◆ **za normálních okolností:** krvinky plodu se do krevního oběhu matky nedostávají.
- ◆ **v období porodu nebo krátce před porodem či za určitých chorobných stavů plodového koláře:** dojde k pronikání červených krvinek plodu přes placentu do krevního oběhu mat-



Vznik HON – Rh inkompatibilita

ky. Dochází k aloimunizaci matky a ta si začne vytvářet protilátky proti antigenům plodu, které sama nemá, ale které dítě zdědilo od otce. K vycestování malého množství fetálních erytrocytů do krevního oběhu matky dochází obvykle v druhé polovině těhotenství, nejčastěji však při samotném porodu.

Předpokladem pro vznik HON je:

- **od otce fetem (plodem) zděděný krvinkový antigen, který matce chybí**
- **matka musí proti tomuto antigenu vytvářet protilátky**
- **protilátky se musí dostat do krevního oběhu fetu** (přestup přes placentu), musí reagovat s jeho krvinkami a předčasně je odbourávat

K HON mohou vést jen takové antigenní rozdíly, jimiž je u matky vyvolána *tvorba protilátek, které prochází placentou* (protilátky třídy IgG). Protilátky třídy IgM jsou velké a nemohou placentou procházet. Do krevního oběhu plodu pak pronikají tyto protilátky inkompletní povahy, které se vážou na specifický antigen erytrocytu a způsobí jeho rozpad – vzniká **hemolytická anémie**. Aloimunizace vrcholí na konci těhotenství, kdy bývá i pronikání protilátek z matčina krevního oběhu do plodu největší – maximum v období porodu. Novorozenci jsou v důsledku prudkého rozpadu poškozených erytrocytů postiženi hemolytickou žloutenkou a zpravidla i značnou anémií – **hemolytické nemocnění novorozenců**.

Stupeň hemolýzy a tím i rozsah poškození plodu závisí na:

- **síle antigenu a stupni imunizace**
- **množství protilátek**
- **období těhotenství a jejich počtu**

Poškození plodu v závislosti na množství protilátek je tím větší:

- čím dříve vznikají imunitní protilátky
- čím dříve protilátky pronikají do krve plodu
- čím větší je množství protilátek

Stupně HON v závislosti na období těhotenství:

- **hemolýza v prvních hodinách po porodu:** výměnná transfuze zamezí poškození plodu a vyloučí vznik anémie
- **hemolýza postihující plod – těžší forma:** účinky hemolýzy, hyperbilirubinémie se projeví před porodem. Děti se rodí s těžkou žloutenkou a anémií. Podobný postup, ale mohou zůstat následky – nervové poruchy.
- **hemolýza již v 1.–3. měsíci:** závažné poškození plodu, který ztrácí základní podmínky pro zdravý vývoj. Dochází většinou k odumření plodu během děložního života.

HON při opakovaných těhotenstvích

- **první těhotenství:** vyskytuje se málokdy

- ❑ **následná těhotenství:** stupňující se charakter závažnosti, který u dalších těhotenství má průběh těžší.

Projevy nemoci HON

- **hemolýza** (dosahuje vrcholu při porodu – zastaví se přestup protilátek od matky)
- **snížení Hb v pupečníkové krvi** (při snížení pod 120 g/l se doporučuje výměnná transfuze, poklesne-li hodnota pod 80 g/l může dojít ke smrti novorozence)
- **vzestup bilirubinu** (během těhotenství je koncentrace volného bilirubinu redukována organismem matky. Po porodu se obtížně redukuje nevyvinutými játry novorozence a jeho hladina stoupá. Při vzestupu na hodnoty nad 200 mg/l hrozí centrální ikterus, který těžce poškozuje CNS – debilita).
- *V dospělosti žlučová barviva nepronikají do mozku, ale u fetu a novorozenců není vyvinuta hematoencefalická bariéra.*

Různé formy HON

ABO inkompatibilita

Příčina: matka 0, dítě A nebo B. Častěji 0/A, než 0/B inkompatibilita. Jsou častější než Rh HON, ale průběh je poměrně lehký (nevýrazná antigenita krvinek novorozenců).

Rh inkompatibilita

Příčina: matka Rh–, dítě Rh+.

- Na 100 000 porodů připadá 10 000 Rh inkompatibilit a u nich by se mohlo projevit asi 500 HON. Díky prevenci se vyskytuje jen 50 HON.
- Asi 1/4 Rh negativních žen protilátky netvoří bez ohledu na počet těhotenství (non responderi). Z jiných skupinových inkompatibilit se nachází anti-K, anti-c a anti-E protilátky.



Laboratorní nálezy

- **Krevní obraz:** normocytová anémie, leukocytoza s neutrofilii, trombocytopenie, retikulocytoza
- **Krevní nátěr:** anizocytoza, polychromázie, často přítomny normoblasty, u ABO inkompatibility se nachází sférocyty
- **Ostatní:** zvýšena hladina nepřímého bilirubinu po narození, pozitivní přímý Coombsův test.

Prevence HON

- ❑ vyšetření genotypu těhotné ženy a jejího partnera

- ❑ kontrolovat během těhotenství aloimunizaci matky krvinkami plodu (titr protilátek).
- ❑ zda došlo k přestupu krvinek plodu do cirkulace matky (lze prokázat přítomností krvinek HbF po porodu u matky).

HEMOLYTICKÉ ANÉMIE NEIMUNITNÍ POVAHY

Hemolýza u těchto anémií může být vyvolána působením:

- **chemických látek** (kyseliny, hydroxydy)
- **fyzikálních činitelů**
- **infekce** (parazitární, mikrobiální)
- **mikroangiopatická hemolytická anémie**

- *Některé bakterie nebo jejich aktivní metabolity mohou mít hemolytické účinky. Mluvíme pak o hemolýzinech a ostatních hemolytických substancích bakterií. Hemolytické bakterie syntetizují substance enzymového charakteru – hemolýziny, které štěpí některé z fosfolipidů buněčné membrány erytrocytu. Nejčastěji to bývá sfingomyelin, méně často lecitin, kefalin, či plazmalogen (Skalka a Votava, 1997).*

Z CHEMICKÝCH PŘÍČIN

- ❑ **Hemolýza z nedostatku fosfátu** – u některých stavů (dlouhodobá parenterální výživa, antacida) může být koncentrace fosfátů v plazmě snížena (< 0,8 mmol/l). Tím dochází i ke snížení hladiny ATP v červených krvinkách. Erytrocyty ztrácí flexibilitu a jsou snadno vychytávány MFS.
- ❑ **Měď** – měď ve zvýšených koncentracích působí cytotoxicky na buňky (inhibiční vliv na několik enzymů glykolýzy). Blokáce enzymové aktivity důležitých metabolických cest červených krvinek může vést k hemolýze.
- ❑ **Olovo** – blokuje syntézu hemoglobinu a může vyvolat anémii, podobným způsobem jako Cu.
- ❑ **Jedy** – bodnutí hmyzu nebo některých živočichů (vosa, sršeň, pavouk) může vést k hemolýze.

Z FYZIKÁLNÍCH PŘÍČIN

- ❑ **Rozsáhlé popáleniny** – výrazné popáleniny, zvláště III. stupně vedou k fyzikální a osmotické hemolýze.
- ❑ **Umělé chlopně, extrakorporální oběh** – k fragmentaci nebo narušení erytrocytů a následné hemolýze může také docházet mechanickou cestou na umělém implantovaném povrchu cév (umělé chlopně, záplaty, cévní protézy) a při mimotělním oběhu.
- ❑ **Pochodová hemoglobinurie** – předpokládá se fragmentace erytrocytů při průchodu kapilárami v plosce nohy (běžci a chodci na dlouhé tratě).
Příčina: změny v membráně erytrocytu. Při náslapu chodidla na pevnou podložku dochází k mikrotraumatizaci erytrocytu a vzhledem k membránové abnormitě k následné hemolýze.

INFEKCE

- ❑ **Clostridium perfringens** – tato bakterie produkuje exotoxin, který vyvolá rychlou lýzu červených krvinek aktivací lyzolecitinu. Dochází k sepsi, ikteru a k intravaskulární hemolýze (hemoglobinemie, hemoglobinurie). Pokud se nezasadí antibiotika, může onemocnění končit fatálně.
- ❑ **Malárie** – dochází k extravaskulární hemolýze. K destrukci napadených erytrocytů dochází převážně ve slezině.
- ❑ **Trepanosomóza** – bývá provázána hemolytickou anémií normocytární s výraznou retikulocytózou.

MIKROANGIOPATICKÉ HEMOLYTICKÉ ANÉMIE

Jde o skupinu chorob, u kterých dochází k **poškození drobných cév s následnými poruchami krevního srážení a tvorbou mikrotrombů**. V takto pozmeněném cévním řečišti dochází k poškozování (fragmentaci) erytrocytů, jež podléhají hemolýze.

- V drobných cévách a arteriolách dochází u tohoto onemocnění k tvorbě fibrinové sítě. Erytrocyty dosedají na fibrinová vlákna a tlakem krevního proudu jsou fragmentovány – vznikají **schistocyty** (schizocyty). Z přetržené krvinky se část hemoglobinu dostane do obvodové krve – **volný hemoglobin**. Hemolýzou se uvolňuje **tkáňový faktor** (tromboplastin), který dále prohlubuje poruchu krevního srážení.

Laboratorní nález

- **Krevní nátěr:** schistocyty (schizocyty)
- **Ostatní:** zvýšená hladina volného hemoglobinu

Rozlišujeme (Pecka, 2004):

- Hemolyticko-uremický syndrom (HUS) – viz *nemoci krevních destiček*
- Trombotická cytopenická purpura (TTP) – viz *nemoci krevních destiček*
- Diseminovaná intravaskulární koagulace (DIK) – viz *koagulopatie*

2.2.4. Anémie z kombinovaných příčin

Anémie jsou u těchto stavů přidruženým onemocněním a mají většinou mírný průběh. Příčiny anémií jsou různorodé odvislé většinou od základní diagnózy. (*Následující výčet je omezen jen na některé typy anémii doprovázející základní onemocnění*).

Anémie z kombinovaných příčin nacházíme:

- ❑ u **maligních nádorů** – maligním množením nádorových buněk dochází k potlačení krvetvorby, ke spotřebování živin a k toxickému působení nádorových buněk na krvetvorbu. Rozlišujeme anémie vyvolané:
 - **nezralými buňkami (blasty)** při leukemii – infiltrace dřeně, krvácení

- **nádorovými buňkami** – v kostní dřeni mohou být buňky jiných nádorů (metastázy)

- **osteomyelofibrórou** – zmnožení vaziva v kostní dřeni

- ❑ u **chronických infektů a zánětů** – anémie je provázána sníženou koncentrací železa v séru, ale normálním nebo zvýšeným množstvím železa v retikuloendoteliálních buňkách. Erytrocyty při chronických infekcích a zánětech mají zkrácenou dobu života a z nepříliš jasných důvodů je snížena produkce EPO, což dále přispívá k rozvoji anémie.

- Při infekcích dochází ke zvýšenému vyplavování granulocytů, které obsahují ve zvýšené míře laktoferin, jež má větší afinitu pro železo než transferin a proto vyvazuje na sebe většinu železa:

- u **chronických chorob jater a u alkoholiků**
- v **těhotenství**
- **systémových chorob pojiva**
- u **nemocných při infekci HIV**

Literatura

BAER, A. N., DESSYPRIS, E. N., GOLD-WASSER, E., et al. Blunted erythropoietin response to anaemia in rheumatoid arthritis. *Brit. J. Haematol.*, 1987, roč. 66, s. 559–564.

BERLIN, N. Y. Diagnosis and classification of the polycythemia. *Semin. Hematol.*, 1975, roč. 12, s. 339–351.

BRENNER, M. K. Annotation: tumor necrosis factor. *Brit. J. Haematol.*, 1988, roč. 69, s. 149–152.

CARTWRIGHT, G. E. The anemia of chronic disorders. *Semin. Hematol.*, 1966, roč. 3, s. 351.

ČERMÁK, J. Autoimunní hemolytické anémie. *Vnitř. lék.*, 2005, roč. 51, č. 7/8, s. 881–885.

ČERMÁK, J., BRABEC, V. Transferrin receptor – ferritin index: a useful parameter in differential diagnosis of iron defi-

ciency and hyperplastic erythropoiesis. *Eur. J. Haematol.*, 1998, roč. 61, s. 210–212.

DINARELLO, C. A. Interleukin 1 and its biologically related cytokines. *Adv. Immunol.*, 1989, roč. 44, s. 153.

DOUGLAS, S. W., ADAMSON, J. W. The anemia of chronic disorders: Studies of marrow regulation and iron metabolism. *Blood*, 1975, roč. 45, s. 55.

DURUM, S. K., SCHMIDT, J. A., OPPENHEIM, J. J. Interleukin 1: an immunological perspective. *Ann. Rev. Immunol.*, 1985, roč. 3, s. 263–287.

EATON, W. A., HOFRICHTER, J. Sick cell hemoglobin polymerization. *Adv. Protein. Chem.*, 1990, roč. 40, s. 819.

ECKARD, K. U., CASADEVALL, N. Pure red-cell aplasia due to anti-erythropoietin antibodies. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2003, roč. 18, s. 865–869.

FAQUIN, W. C., SCHNEIDER, T. J., GOLDBERG, M. A. Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. *Blood*, 1992, roč. 79, s. 1987.

FUKADA, M. N., PAPAY ANNOPOULOU, P., GORDON-SMITH, E. C., et al. Defect in glycosylation of erythrocyte membrane proteins in congenital dyserythropoietic anaemia type II (Hempas). *Brit. J. Haematol.*, 1984, roč. 56, s. 55–68.

GENC, S., ERTEN, N., KARAN, M. A., et al. Soluble transferrin receptor-ferritin index for evaluation of the iron status in elderly patients. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2004, roč. 202, s. 135–142.

GREINER, T. C., BURNS, C. P., DICK, F. R., et al. Congenital dyserythropoietic anemia type II diagnosed in a 69-year old patient with iron overload. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1992, roč. 98, s. 522–525.

HEIMPEL, H., WENDT, F. Congenital dyserythropoietic anaemia with karyorrhexis and multinuclearity of erythroblasts. *Helv. Med. Acta*, 1968, roč. 34, s. 103–115.

HOOKS, J. J., MOUTSOPOPOULOS, H. M., GEIS, S. A., et al. Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease. *New Engl. J. Med.*, 1979, č. 5–8, s. 301.

CHEN, R., NAGARAJAN, S., PRINCE, G. M., et al. Impaired growth and elevated Fas receptor expression in PIGA(+) stem cells in primary paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J. Clin. Invest.*, 2000, roč. 106, s. 689–696.

CHROBÁK, L. Hemolytické anémie. *Postgrad. Med.*, 2004, roč. 6, č. 3, s. 239–245.

CHROBÁK, L. Mikrocytární a hypochromní anémie. *Vnitř. lék.*, 2001, roč. 47, s. 166–174.

CHROBÁK, L. Sideropenická anémie – umíme ji diagnostikovat a léčit. *Postgrad. Med.*, 2003, roč. 5, č. 6, s. 587–592.

KAUPPI, M. Vitamin B₁₂ – metal disturbs transport. *Heavy Metal Bulletin*, 1995, roč. 2, č. 3, s. 8–10.

KONIJN, A. M., HERSHKO, C.: Ferritin synthesis in inflammation. I. Pathogenesis of impaired iron release. *Brit. J. Haematol.*, 1977, roč. 37, s. 7.

KRANTZ, S. B.: Pathogenesis and treatment of the anemia of chronic disease. *Amer. J. Med.*, 1994, roč. 307, s. 353–359.

LUDWICZEK, S., SIGNET, E., THEURL, I., et al. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood*, 2003, roč. 101, s. 4148–4154.

MACKAY, I. R. Tolerance and autoimmunity. *Brit. Med. J.*, 2000, roč. 321, s. 93–96.

MEANS, R. T. Polycythemia vera. In *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1999, roč. 2, s. 1238–1274.

MILLER, C. B., JONES, R. J., PIANTADO-SI, S., et al. Decreased erythropoietin response in patients with the anemia of cancer. *New Engl. J. Med.*, 1990, roč. 322, s. 1689–1692.

MOYO, V. M., MUKHINA, G. L., GARRETT, E. S., BRODSKY, R. A. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Brit. J. Haematol.*, 2004, roč. 126, s. 133–138.

NISHIMURA, J. L., KANAKURA, Y., WARE, R. E., et al.: Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria in the USA and Japan. *Medicine (Baltimore)*, 2004, roč. 83, s. 193–207.

PARKER, C. H., OMINE, M., RICHARDS, S., et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 2005, roč. 106, č. 12, s. 3699–3709.

PECKA, M. Laboratorní hematologie v přehledu I., Buňka a krvetvorba. Český Těšín, Finidr, 2002, stran 160.

PECKA, M. Laboratorní hematologie v přehledu III., Fyziologie a patofyziologie hemostázy. Český Těšín, Finidr, 2004, stran 237.

PENKA, M. Anémie I. *Postgrad. Med.*, 2003, roč. 5, s. 123–127.

PENKA, M. Anémie II. *Postgrad. Med.*, 2003, roč. 5, s. 355–360.

RING, G. H., LAKKIS, F. G. Breakdown of autoimmunity. *Semin. Nephrol.*, 1999, roč. 19, s. 25–33.

ROSSE, W. F. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as a molecular disease. *Medicine*, 1997, roč. 76, s. 63–93.

SAKALOVÁ, A. Hemolytické anémie. *Hematol. Transfuziol.*, 2000, roč. 10, s. 42–50.

SKALKA, B., VOTAVA, M.: Hemolýzy a he-

molytické interakce bakterií. *Epidemiol. Mikrobiol. Immunol.*, 1997, roč. 46, č. 3, s. 87–98.

TAMURA, H., MATSUMOTO, G., ITAKURA, Y., et al. A case of congenital dyserythropoietic anemia type II associated with hemochromatosis. *Intern. Med.*, 1992, roč. 31, s. 380–384.

TRACEY, K. J., VLASSARA, H., CERAMI, A. Cachectin/tumor necrosis factor. *Lancet*, 1988, roč. 1, s. 1122–1125.

VAN DER SCHOOT, C. E., HUINZINGA, T. W. J., VAN'T VEER-KORTHOF, E. T., et al. Deficiency of glycosyl-phosphatidylinositol – linked membrane glycoproteins of leukocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, description of a new diagnostic cytofluorometric assay. *Blood*, 1990, roč. 76, s. 1853–1859.

WICKRAMASINGHE, S. N. Dyserythropoiesis and congenital dyserythropoietic anaemias. *Brit. J. Haematol.*, 1984, roč. 56, s. 55–68.

ZILOW, G., KIRSCHFINK, M., ROELCKE, D. Red-cell destruction in cold agglutinin disease. *Infusionsther. Transfusionsmed.*, 1994, roč. 21, s. 410–415.

3. NENÁDOROVÉ ZMĚNY V BÍLÉ KREVNÍ ŘADĚ (Reaktivní stavy)

Reaktivní změny bílých krvinek jsou *stavy, při kterých dochází z různých příčin ke změnám v počtu a rozpočtu leukocytů*. Může docházet k vyplavování mladších vývojových forem granulocytární řady z marginálních nebo dřeňových poolů.

Kvantitativní a kvalitativní změny bílé řady

Za chorobných stavů mohou nastat změny v bílém krevním obrazu a to:

- *v počtu leukocytů*
- *ve funkci leukocytů* (granulocytů, monocytů a lymfocytů)
- *v jejich vzájemném zastoupení* (diferenciálním počtu leukocytů)

POČET LEUKOCYTŮ

Snížený počet leukocytů v periferní krvi pod fyziologické hodnoty se nazývá *leukopenie*, zvýšený počet leukocytů *leukocytoza*.

V OBVODOVÉ KRVÍ



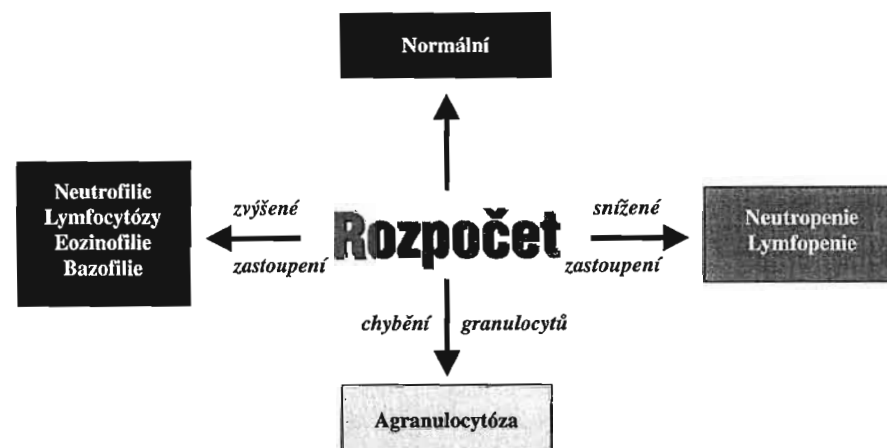
Při změně počtu leukocytů dochází většinou i ke změně jejich vzájemného poměru, *mění se jejich diferenciální počet*.

FUNKCE LEUKOCYTŮ

Poruchy funkce leukocytů se projevují sníženou obranyschopností organismu proti infekcím. Vyskytují se méně často než poruchy jejich počtu. *Počet leukocytů* může být při jejich porušené funkci normální, obvykle je však snížený nebo zvýšený. Tato část je popsána v kapitole „Funkce a fyziologie leukocytů“.

DIFERENCIÁLNÍ POČET LEUKOCYTŮ

ZMĚNY ROZPOČTU LEUKOCYTŮ V OBVODOVÉ KRVÍ



3.1. Změny v počtech buněk bílé řady

LEUKOCYTOZA

Leukocytoza je *stav, při kterém celkový počet leukocytů je přechodně zvýšen nad hodnoty $10 \cdot 10^9/l$, zřídka pak nad hodnotu $50 \cdot 10^9/l$* . U lehkých leukocytoz jde většinou o *vzestup absolutního počtu neutrofilů*.

Výskyt: bakteriální infekce, intoxikace těžkými kovy (Pb, Hg) nebo léky a některé krevní choroby.

LEUKOPENIE

U leukopenických stavů *bývá celkový počet leukocytů snížen pod jejich normální hodnoty $< 4 \cdot 10^9/l$* . Leukopenie bývá nejčastěji vyvolána *snížením absolutního počtu neutrofilů (neutropenie) nebo lymfocytů (lymfopenie)*.

Výskyt: některé infekce, dřeňové útlumy, léčba cytostatiky.

3.2. Změny v počtu a rozpočtu buněk bílé řady

NEUTROFILIE

Neutrofilie u dospělých osob znamená zvýšení neutrofilů nad hodnoty $8 \cdot 10^9/l$, v některých případech až $40 \cdot 10^9/l$.

Příčina: neutrofilie vzniká jako důsledek zvýšené tvorby neutrofilů nebo zvýšeného vyplavování neutrofilů z dřevěného poolu či přesunem z marginálního poolu do oběhu (Kubisz, 2006).

Výskyt: infekce: bakteriální, mykotické, méně často virové, fyzikální a emocionální příčiny, záněty, tumory, toxické vlivy (olovo, toxiny, léky), hematologické choroby (hemolytické anémie, myeloproliferativní stavy), poškození tkání (popáleniny, operace), metabolické poruchy (diabetes mellitus).

NEUTROPENIE

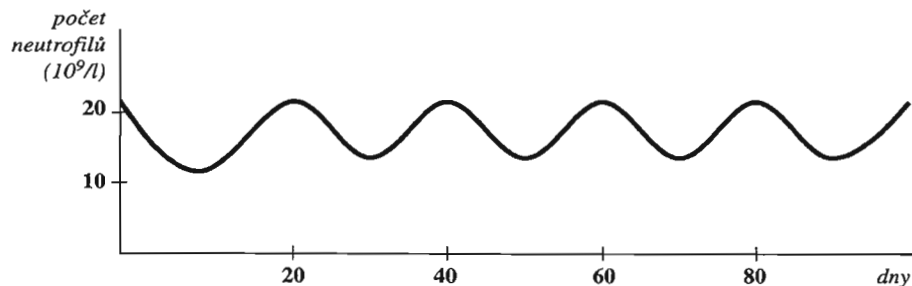
Neutropenie jsou takové stavy, u kterých dochází k poklesu absolutních hodnot zralých neutrofilních granulocytů pod počty $1,5 \cdot 10^9/l$ (u dospělých). Neutropenie mohou být vrozené i získané.

Výskyt: **vrozené neutropenie** vznikají nejčastěji v důsledku defektu na úrovni pluripotentní kmenové buňky a dále při poruchách vyžívání granulocytární řady. **Získané neutropenie** se nachází u nemocí, u kterých dochází k vytvoření patologického klonu na úrovni kmenové buňky (leukemie), u stavů s neefektivní granulopézou (nedostek B_{12} a kyseliny listové), u některých virových (hepatitidy, infekční mononukleóza) a bakteriálních infekcí (salmonelóza, tbc), u některých imunitních onemocnění, po podání některých léků (sulfonamidy, penicilin aj). a z různých fyzikálních (záření) a chemických příčin (těžké kovy Pb, Hg).

CYKlickÉ NEUTROPENIE

U cyklické neutropenie **dochází opakovaně v určitých časových intervalech k neutropenii, kterou provází infekce**. Jde o cyklické změny nejčastěji po 20 dnech a někdy i v nepravidelných obdobích. Onemocnění postihuje obě pohlaví.

Příčina: není známa. Předpokládá se, že by mohlo jít o poruchu zpětnovazebních mechanismů působících na kmenové buňky bílé řady.



- Snížení počtu granulocytů v periferní krvi se nazývá **granulocytopenie**. Pokud dojde k výraznému snížení granulocytů nebo k jejich úplnému vymizení tak se tento stav nazývá **agranulocytoza**. Příčinou granulocytopenie i agranulocytozy je **těžká neutropenie**.

AGRANULOCYTÓZA

Agranulocytoza byla poprvé popsána jako samostatná klinická jednotka v roce 1922 Schultzem.

Při agranulocytoze dochází k **náhlému snížení granulocytů, zejména neutrofilů pod hodnoty $0,5 \cdot 10^9/l$, případně může dojít až k jejich úplnému vymizení z obvodové krve**. Onemocnění provází obvykle projevy prudké infekce (horečka, schvácenost, zánětlivé změny).

Výskyt: dřevěné útlumy, polékové agranulocytozy.

EOZINOFILIE

Eozinofilie jsou stavy, u kterých dochází ke zvýšení počtu eozinofilních granulocytů nad hodnoty $0,5 \cdot 10^9/l$.

Příčina: Eozinofilie je reakce na specifickou T buněčnou imunitní odpověď, namířenou hlavně na zevní alergen nebo na parazitární, výjimečně mykotické či bakteriální infekce.

Výskyt: Eozinofilie mohou vyvolat některá **alergická onemocnění, dermatitidy, tumory, paraziti** (malárie, toxoplazmózy, filariózy). Nachází se i při **hypereozinofilním syndromu** u některých **gastrointestinálních nemocí**, u některých **virových nemocí** (infekční lymfocytoza a monocytoza), u některých **vrozených chorob spojených s eozinofilií** (familiární a hereditární eozinofilie).

- Počet eozinofilů v krvi kolísá v závislosti na věku nemocného, denní době, námaze a vlivech okolního prostředí. Počet eozinofilů je nejnižší ráno a nejvyšší v noci – rozdíly mohou dosahovat až 40 %.

EOZINOPENIE

Bývá zřídka diagnostikována, protože k jejímu odhalení je potřeba speciální metodou zjistit absolutní počet eozinofilů

Výskyt: nachází se u prudkých a těžkých infekcí (např. u břišního tyfu), u kterých dochází k uvolňování nebo podávání adrenalinu nebo nadledvinkových hormonů. Vyskytuje se též u některých zánětových reakcí a u některých viróz.

BAZOFILIE

Pod pojmem bazofilie rozumíme zvýšení absolutního počtu bazofilů nad hodnotu $0,05 \cdot 10^9/l$.

Výskyt: alergické reakce i polékové, infekce (spalničky, plané neštovice), záněty, myeloproliferativní stavy (CML, PV), ozáření (asi u 5–10 % stavů po ozáření).

➤ Bazofilie je poměrně vzácná. Bazopenie nemají diagnostický význam.

MONOCYTOZA

Za monocytózu se považuje takový stav, u kterého dojde k navýšení absolutního zastoupení monocytů nad hodnotu $0,95 \cdot 10^9/l$.

Výskyt: infekce (tbc, endokarditida, brucelosa), některá hematologická onemocnění (MDS, cyklické neutropenie, chronická myelomonocytární leukemie) a jako doprovodný příznak dalších nemocí (revmatoidní artritida, kolagenózy, malignity).

MONOCYTOPENIE

Za monocytopenie lze považovat takové stavy, u kterých dochází k poklesu absolutního počtu monocytů pod hodnoty $0,3 \cdot 10^9/l$.

Výskyt: léky (zejména kortikoidy – mohou ovlivnit signály, které vedou k aktivaci monocytární linie) hematologická onemocnění (aplastická anémie, vlasatobuněčná leukemie, perniciózní anémie).

LYMFOCYTOZA

Lymfocytoza je stav, u kterého dochází ke zvýšení absolutního počtu lymfocytů nad hodnoty $4 \cdot 10^9/l$ u dospělých a $7 \cdot 10^9/l$ u dětí. U lymfocytoz nebývá zpravidla zvýšen celkový počet leukocytů.

➤ Je nutné odlišit relativní lymfocytozu při nízkém počtu neutrofilů. Děti reagují lymfocytozou tam, kde dospělí neutrofilií.

Výskyt: virové infekce (infekční mononukleóza, hepatitidy, HIV, cytomegalovirové infekce), bakteriální infekce (tbc, brucelosa), endokrinologické příčiny, alergie (ITP, autoimunitní hemolytická anémie), hyposplenismus.

LYMFOPENIE

Za lymfopenii se považuje takový stav, u kterého dochází k poklesu lymfocytů pod hodnoty $1,0 \cdot 10^9/l$ (u dospělých) a $1,5 \cdot 10^9/l$ (u dětí).

➤ Je nutné rozlišovat, zda se jedná o pokles T- nebo B-lymfocytů.

Příčina: může jít buď o sníženou tvorbu nebo zvýšenou destrukci lymfocytů či o intestinální úbytek lymfy.

Výskyt: aplastické anémie, ionizační záření, toxické látky, infekce (virové, AIDS), léky (kortikoidy, cytostatika).

INFEKČNÍ MONONUKLEÓZA

Onemocnění bylo poprvé popsáno Pfeifferem r. 1889.

Infekční mononukleóza je akutní infekční onemocnění vyvolané převážně virem EPSTAEIN-BARROVÉ (80 %), v 10 % Cytomegalovirem (CMV) a v některých případech lidským herpetickým virem 6. Postižení vede k lymfoproliferaci a hyperplazii lymfatické tkáně.

Příčina: Virová infekce vyvolá postižení B-lymfocytů, při kterém dochází k tvorbě různých imunoglobulinů, včetně heterofilních protilátek. Z buněk imunitního systému mají jediné lymfocyty B receptory odpovídající na antigeny EBV. Na pozměněné lymfocyty B, které mají na svých receptorech EBV reaguje imunitní systém aktivací a proliferací cytotoxických a supresorových T-lymfocytů. Tyto „blasticky“ transformované buňky působí cytotoxicky na lymfocyty B infikované virem EB.

Převážná část abnormálních lymfoidních buněk („lymfomonocytárního charakteru“) vykazuje povrchové znaky T-lymfocytů (Penka a spol., 2001).

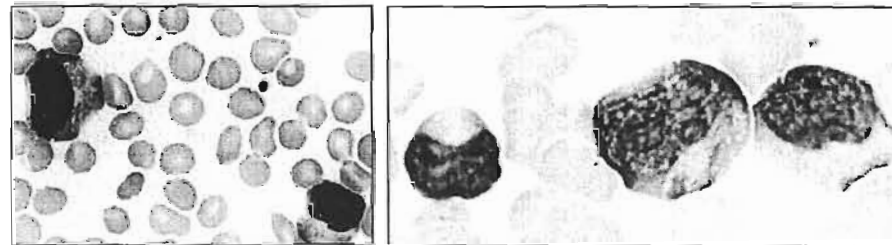
Laboratorní nálezy

- **Krevní obraz:** v počáteční fázi mírná leukopenie, která přechází v další fázi do leukocytozy ($10\text{--}20 \cdot 10^9/l$), může být i mírná trombocytopenie, nachází se neutropenie i neutrofilie, v rekonvalescenci se zjišťuje eozinofilie.
- **Krevní nátěr:** lymfocytoza – přítomnost atypických mononukleárních buněk (morfologicky změněné T-lymfocyty – obtížně se dají odlišit od monocytů).
- **Kostní dřev:** buněčně bohatá, přítomny atypické lymfoidní buňky
- **Titr protilátek proti EBV:** vysoké hodnoty
- **ELFO:** vzestup anti-VCA ve třídě IgM

Atypické lymfoidní buňky

Buňky mají kulatý nebo nepravidelný tvar. Přítomno většinou perinukleolární projasnění, které přechází do cytoplazmy.

- **Průměr:** 15–22 μm .
- **Jádro:** uloženo centrálně nebo excentricky. Tvar jádra může být kulatý, ledvinovitý, oválný nebo laločnatý. Jaderný chromatin většinou hutný s tmavě barvitelnými shluky.



Atypické lymfoidní formy (atypické reaktivní lymfocyty vlevo a lymfomonocyty vpravo)

- **Jadérka:** obvykle přítomna
- **Cytoplazma:** tmavě bazofilní, většinou bez granulace. Jen vzácně se mohou vyskytnout jemná azurofilní granula. Vakuoly nejsou přítomny, ale pěnovitá struktura cytoplazmy je může připomínat

AKUTNÍ INFEKČNÍ LYMFOCYTOZA

Jde o poměrně vzácné *onemocnění, nejasného původu, se středním nebo značným množením lymfocytů (na hodnoty 20–100. 10⁹/l)*. Lymfocytoza přetrvává většinou 2–5 týdnů, někdy až několik měsíců.

Laboratorní nález

- Nachází se většinou leukocytoza s lymfocytozou.

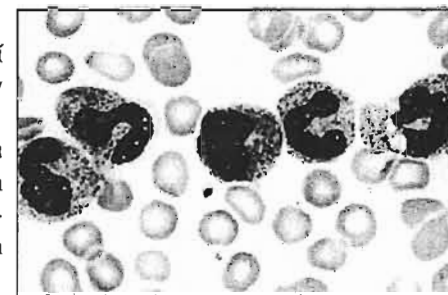
3.3. Reaktivní stavy v bílé řadě

POSUN K MLADŠÍM VÝVOJOVÝM FORMÁM

Při posunech k mladším vývojovým formám jde o reaktivní změny v bílé krevtvarbě, charakterisované *zmnožením mladších vývojových forem granulocytární řady*.

Laboratorní nález

- **Krevní nátěr:** nachází se zde větší množství tyček, mohou být přítomny i metamyelocyty a myelocyty.
- **Kostní dřeň:** dochází k posunu v zastoupení méně zralých forem (metamyelocytů, myelocytů, promyelocytů) na úkor vyzálejších forem (tyče, segmenty).



Posun k mladším vývojovým formám

Příčina: Posun k mladším formám odráží *zvýšené požadavky organismu na leukocyty, který se projevuje jejich zvýšenou tvorbou v kostní dřeni. To může v některých případech vést k vyplavování méně zralých forem do periférie.*

Výskyt: těžké infekce, otravy, krvácení, hemolýza.

Při posouzení, zda jde o posun k nezralým nebo vyzáleším formám granulocytární řady lze použít Hynkovo číslo, které reprezentuje průměrný stav segmentace v granulocytu. Vypočte se podle vztahu:

$$\text{Hynkovo číslo} = \frac{\text{Počet jaderných segmentů ve 100 granulocytech}}{100}$$

- *Fyziologické hodnoty:* 3–4 segmenty/1 granulocyt (průměr 2,73)

Má-li Hynkovo číslo hodnotu:

- < 3 – může jít o *posun k nezralým formám*
- > 4 – může jít o *posun k vyzáleším formám*
- > 6 – může jít o *hypersegmentaci*

LEUKEMOIDNÍ REAKCE

Leukemoidní reakce se projevuje jako reaktivní změna s normálním, sníženým, nebo zvýšeným počtem bílých krvinek (někdy zvýšením až na 50.10⁹/l) a *vyplavením různého počtu nezralých buněk bílé řady* (tyček, metamyelocytů, myelocytů, promyelocytů, myeloblastů a lymfoblastů).

Výskyt: infekce (pneumonie, sepse, TBC, infekční mononukleóza), hemoblastozy a nádorová onemocnění (regenerace dřene), reakce na léky (např. kortikoidy), těžké krvácení, hemolýza, intoxikace (otrava rtutí, popáleniny).

➤ *Projevy onemocnění je nutné odlišit od CML*

LEUKOERYTROBLASTOVÁ REAKCE

U tohoto stavu se jedná o reaktivní změny, u kterých se v obvodové krvi vedle méně zralých buněk granulocytární řady objevují i **jaderné prekurzory červené řady** (orto- a polychromní erytroblasty).

Výskyt: myelofibróza, lymfoproliferativní stavy, megaloblastové anémie, těžké hemolýzy, metastázy karcinomu do dřene.

LEUKOCYTÁRNÍ BIOLOGICKÁ KŘIVKA

(Schillingova křivka)

Jde o **reaktivní změny pozorované u většiny infekcí a zánětů**. Křivka má 3 fáze:

- ☐ **bojová** – na začátku onemocnění se pozoruje leukocytoza se vzestupem neutrofilních granulocytů a se zvýšeným zastoupením tyčů, někdy i myelocytů a metamyelocytů.
- ☐ **obránná** – zpravidla 4.–7. den se objevuje monocytoza.
- ☐ **ozdravná** – zmnožení lymfocytů a eozinofilních granulocytů.

REAKTIVNÍ STAVY – PŘEHLEDNÁ TABULKA

STAV	WBC	TYPY BUNĚK
Normální rozpočet	N	SEG-LY-MO-EO-BA-TY
Posun k ml. formám	H	SEG-LY-MO-EO-BA- ↑ TY-MMY-MY
Leukemoidní reakce	N, H, L	SEG-LY-MO-EO-BA- ↑ TY-MMY-MY-PRO-BL
Leukoerytroblast. reak.	N, H, L	SEG-LY-MO-EO-BA- ↑ TY-MMY-MY-PRO-BL + orto- a polychromní erytroblasty
Leukocyt. biol. křivka		
1. fáze	H	SEG-LY-MO-EO-BA- ↑ TY-MMY-MY
2. fáze	N	MONOCYTÓZA
3. fáze	N	LYMFOCYTÓZA A EOZINOFILIE

H – vysoký, L – snížený, N – normální počet leukocytů (WBC)

Typy buněk uvedené červeně a v rámečku jsou u těchto stavů vyplavovány do obvodové krve

POSUN KE ZRALÝM VÝVOJOVÝM FORMÁM

Jde o reaktivní změny pozorované při **výrazném vyplavení neutrofilů z marginálního poolu nebo při nedostatku některých látek potřebných pro krvetvorbu**.

Laboratorní nález

- **Krevní obraz:** nachází se granulocyty s větším počtem segmentů v jádře, často se vyskytují i hypersegmentované formy.
- **Kostní dřev:** ve větší míře se nachází u granulocytů vyzrálé formy na úkor méně zralých forem.
- **Výskyt:** megaloblastové anémie, sepse.

REAKCE NA STRES

Při zátěži organismu stresem (chlad, infekce, psychická zátěž) dochází k vylučování hormonů (ACTH, kortikosteroidů) z hypofýzy a nadledvin. Vyplavení těchto hormonů vede k **poklesu eozinofilních granulocytů a lymfocytů a k relativnímu vzestupu neutrofilních granulocytů**.

Literatura

KUBISZ P. **Hematologie a transfuziologie**. Bratislava, Grada 2006, stran 323.

PENKA, M, BULIKOVÁ, A., MATÝŠKOVÁ, M., ZAVŘELOVÁ, J. **Hematologie I**, Neonkologická hematologie, Praha, Grada 2001, stran 201.

4. NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ KRVETVORBY

4.1. Akutní leukemie (AL)

Akutní leukemie byly jako samostatná klinická jednotka popsány již v r. 1857 Friedriechem (Friedrich, 1857).

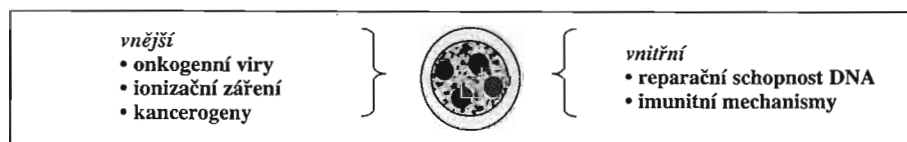
Akutní leukemie představují **heterogenní skupinu zhoubných onemocnění krvetvorby, která vzniká maligní transformací hematopoetické kmenové buňky**. Jde o vícestupňový proces, který může být zahájen transformací jedné, ale nejvýše několika hematopoetických kmenových buněk (Henderson, 1996). V organismu pak vedle sebe existují dvě populace buněk (normální a leukemická).

Defektem patologické buněčné populace je maturační a diferenciací porucha a zvýšená proliferační aktivita. Porucha vyzrávání je způsobena bloádou diferenciacie, její příčiny nejsou známy. Zvýšená proliferace je vyvolána produkty alterovaných genů, kódujících intracelulární signální molekuly. Současně dochází i k inhibici (Klener, 2003).

➤ *Proliferace blastů za fyziologických podmínek podléhá přísným autoregulačním mechanismům. U akutní leukemie se jejich proliferace vymyká fyziologické autoregulaci (Appelbaum, 1999).*

Příčina: Příčina vzniku akutní leukemie není známa, má pravděpodobně komplexní povahu a na vzniku malignity se podílejí:

- **vnější faktory**
- **vnitřní faktory**

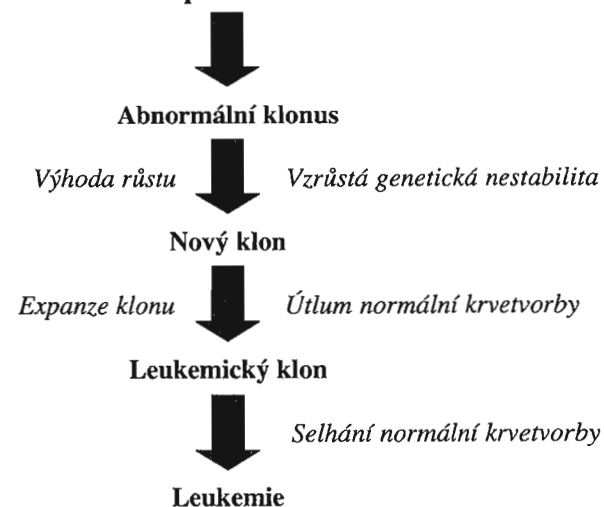


➤ *Virový původ leukózy byl zjištěn u myši, slepic a hovězího dobytka – většinou virus RNA. Po výbuchu atomové bomby v Hirošimě a Nagasaki se objevil zvýšený výskyt leukemie zejména u lidí mladšího věku a u těch, co byli blízko epicentra výbuchu (Whitaker a Holmes, 1998).'*

U leukemií dochází k **přestavbě DNA**, vzniká nový gen, který je zodpovědný za maligní přeměnu buňky a eventuálně za vznik leukemie.

V rámci inefektivní hematopoézy pak dochází ke zvýšení proliferace mutovaných buněk. Zvýšená proliferační aktivita vytváří prostor pro další mutace a karyotypové aberace. Kritickým nahromaděním genetických poruch může vzniknout leukemický klon s autonomní proliferační aktivitou (Willman, 1999).

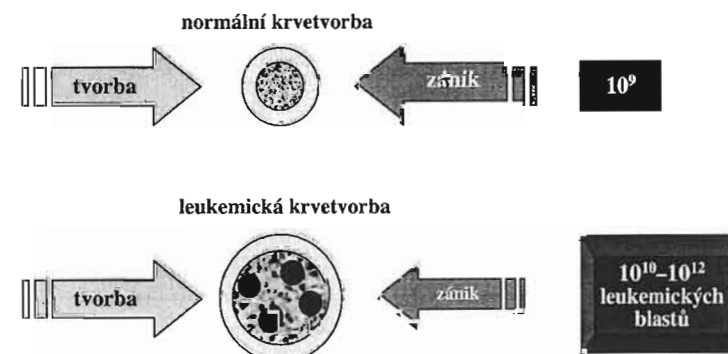
Normální hematopoetická kmenová buňka



Krvetvorba u akutní leukemie

Zatímco **normální krvetvorba** je charakterizována určitou stálostí buněčných systému (*určitá část buněk zaniká a určitá část se jich tvoří*), u **leukemie** převládá tvorba a hromadění leukemických buněk nad jejich zánikem. Generační čas nádorové buňky (časový interval mezi dvěma mitózami) je oproti generačnímu času normální buňky prodloužen (Lowenberg a spol., 1999).

➤ *Po opakované léčbě cytostatiky se rychleji obnovuje krvetvorba.*



Narůstající buněčná proliferace leukemických buněk klade velké nároky na metabolismus organismu a infiltrující buňky narušují funkci postižených orgánů. Anémie, leukopenie a trombocytopenie jsou závažnými důsledky této infiltrace a jsou pří-

činou častých infekcí a krvácivých syndromů. U většiny nemocných se pak tvoří více leukemických buněk, než jich zaniká a ty se pak ve zvýšené míře nachází:

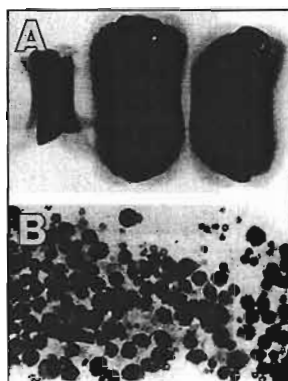
- *v kostní dřeni*
- *v obvodové krvi*

■ Nahromadění leukemických buněk způsobí **narušení a potlačení normální krevtvorby** – vzniká nedostatek konečných buněčných produktů krevtvorby (erytrocyty, destičky, granulocyty). Cytopenie pak vyvolá klinické projevy onemocnění.

■ Leukemické buňky dále infiltrují do některých, především hematopoetických orgánů a hromadí se v nich. Jedná se zejména o tyto orgány:

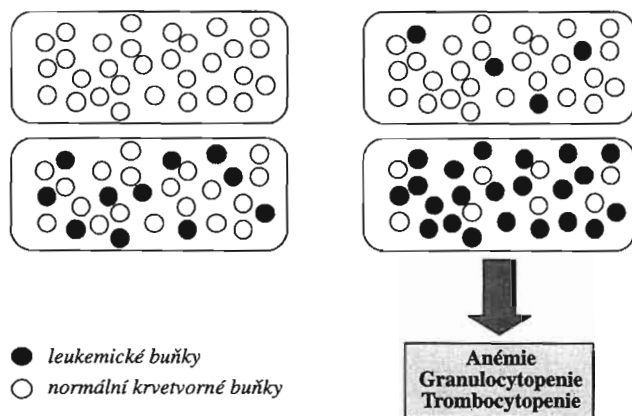
- *slezina, játra, lymfatické uzliny*

■ Současně dochází k **zastavení další diferenciace** (např. u některých forem akutní myeloidní leukemie dochází u granulocytární řady k zastavení diferenciace již ve stadiu myeloblastu nebo promyelocytu).



A – vlevo normální slezina u myši, uprostřed a vpravo leukemické sleziny
B – kostní dřeň u myši s leukemií

POSTUPNÁ INFILTRACE KOSTNÍ DŘEŇE LEUKEMICKÝMI BUŇKAMI

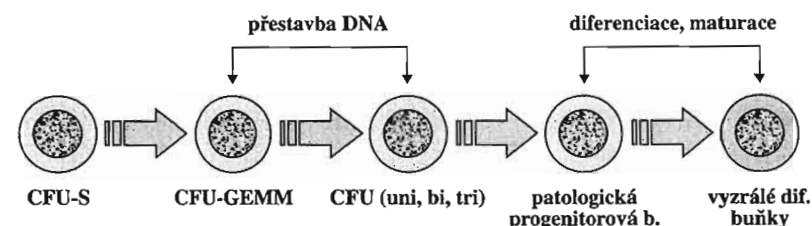


● leukemické buňky
○ normální krevtvorné buňky

Leukemické buňky

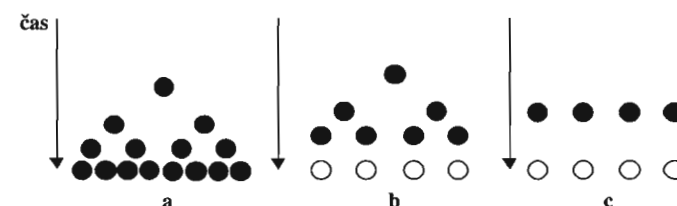
Leukemické buňky se často nacházejí v různých fázích buněčného cyklu, kdy mají odlišný obsah DNA, RNA, proteinů aj. To vše přispívá k tomu, že populace leukemických buněk vykazuje značnou heterogenitu.

DIFERENCIACE LEUKEMICKÉ BUŇKY MYELOIDNÍ ŘADY



Podle schopnosti sebeobnovy a proliferace leukemických buněk můžeme rozlišit 3 druhy nádorových buněk:

- nádorové buňky s **neomezenou schopností proliferace** (a)
- nádorové buňky s **omezenou schopností proliferace** (b)
- nádorové buňky **bez schopnosti proliferace** – přežívají a posléze odumírají (c)



➤ Zastoupení těchto tří skupin nádorových buněk se mění v průběhu onemocnění. Zpočátku převládají první dvě skupiny buněk (a, b), u rozvinuté formy onemocnění pak poslední stadium (c).

Leukemické buňky se liší nejen schopností proliferace, ale při částečné schopnosti vyžívání se mohou lišit i **morfologicky**.

Typy blastů u akutních leukemií:

■ **Typ I** – blasty bez azurofilních granul s výrazně vysokým poměrem jádra vůči cytoplazmě. V jádře výrazná jadérka.



Typ I

■ **Typ II** – blasty s několika azurofilními zrny, s menším jádrem v porovnání s cytoplazmou.



Typ II

- **Typ III** – podobné blasty jako II typ, ale s větším počtem granulí (> 20).

➤ *Většina lymfoblastů neobsahuje granule a je proto řazena k typu I. Myeloblasty typu I jsou menší než ostatní myeloblasty, mají mírně kondenzovaný chromatin a menší podíl cytoplazmy.*

Rozdělení AL

Podle toho, zda leukemická transformace postihuje buňky myeloidní nebo lymfatické řady se akutní leukemie dělí na dva hlavní typy:

- ❑ **myeloblastické (AML)** – vznikají na úrovni CFU-GEMM nebo na úrovni dále diferencovaných progenitorových buněk
Imunofenotypizace: antigeny myeloidní řady – MPO, CD13, CD33, Cdw65
- ❑ **lymfoblastické (ALL)** – vznikají na úrovni mladších stadií lymfoidních buněk.
Imunofenotypizace: B linie – cCD79a, CD19, cCD22
T linie – CD2, cCD3, CD5, CD7

Rozlišení AML a ALL má značný význam pro volbu léčebné strategie.

4.1.1. Klasifikace akutních leukemií

FAB (FRENCH-AMERICAN-BRITISH) klasifikace akutních leukemií

V roce 1976 navrhla francouzsko-americko-britská kooperativní skupina klasifikaci na základě vyšetření nátěru periferní krve a kostní dřeně barvených panoptickým barvením za použití cytochemické detekce depozit, či enzymů v buňkách.

Tato klasifikace byla opakovaně revidována v letech 1982, 1985 a 1990. Rozlišuje sedm subtypů AML (M0–M7) na základě vyšetření nátěru periferní krve a kostní dřeně ve světelném mikroskopu. Typ M1–M3 se liší stupněm maturace. Později po rozšíření palety vyšetření se pro **příslušnost nádorových buněk k určité vývojové řadě krvetvorby** využívaly tyto znaky:

- **Morfologické**
- **Cytochemické**
- **Imunologické**
- **Molekulárně biologické**
- **Cytogetické**

S rozvojem těchto nových diagnostických metod (imunofenotypizace, cytogenetika a molekulární biologie) byla kooperativní skupinou navržena integrovaná klasifikace:

MORFOLOGICKO-IMUNOLOGICKO-CYTOGENETICKÁ (MIC: Morphology-Immunology-Cytogenetic)

Koncem 90. let se objevuje pod patronací WHO snaha o sjednocení všech nádorových onemocnění v hematologii a tedy i skupiny leukemií. Klasifikace byla publikována v roce 2001.

KLASIFIKACE AKUTNÍCH LEUKEMIÍ – WHO 2001

Rozdíl mezi FAB a WHO klasifikací spočívá zejména v rozdílném pohledu na klasifikaci akutních leukemií. U WHO klasifikace je kladen rozhodující důraz na genetické a molekulárně genetické odchylky.

Rozdíly mezi WHO a FAB klasifikací:

- ❑ u FAB klasifikace se podle původního doporučení počet blastických elementů v kostní dřeni počítá z nonerytroidních buněk, u WHO klasifikace ze všech jaderných elementů.
- ❑ FAB klasifikace pro diagnózu akutní leukemie vyžaduje alespoň 30 % leukemických blastů, u WHO postačuje 20 % blastů.
- ❑ Tato hlediska není nutné pro diagnózu AML naplnit, jestliže se zjistí typická cytogenetická nebo molekulárně genetická odchylka.

Laboratorní nálezy

■ Morfologické vyšetření

- **Krevní obraz:** leukocytoza, ale i leukopenie, anémie, trombocytopenie
- **Krevní nátěr:** leukemické blasty v obvodové krvi nad 5 %
- **Kostní dřeň:** infiltrace leukemických buněk většinou uniformního vzhledu (blasty nad 20 %)

➤ Základní technické předpoklady morfologické klasifikace AL:

- **materiál od neléčených nemocných v době stanovení diagnózy**
- **technicky dokonalé a správně obarvené nátěry (KD, periferní. krev)**
- **kostní dřeň hodnotit na nejméně 500 buněk.**

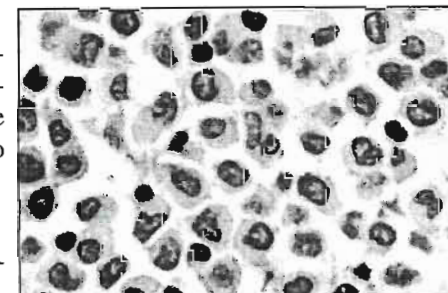
■ Histologické vyšetření

Většinou se nachází obraz hypercelulární kostní dřeně s výraznou infiltrací leukemických buněk. Někdy se však nachází i normocelulární nebo hypocelulární kostní dřeň.

■ Cytochemická vyšetření

Zahrnují reakci pro průkaz myeloperoxidázy, nespecifických esteráz, kyselých fosfatáz, reakci se sudanovou černí B a PAS reakci.

- **Myeloperoxidáza:** slouží k rozlišení buněk myeloidní povahy od buněk lymfoidních
- **Esteráza (naftyl, butyl):** slouží k rozlišení buněk myeloidní povahy od buněk monocytárního charakteru
- **PAS reakce:** přítomna hlavně u buněk lymfoidní linie



Histologický obraz hypercelulární kostní dřeně

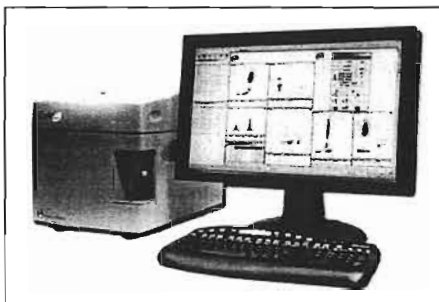
- **Kyselá fosfatáza:** zachytí některé formy lymfoidní linie (zejména slouží k rozlišení izoform kyselé fosfatázy rezistentních k roztoku vinanu)

■ Imunofenotypizace

Jedná se o metody, které prokazují u leukemických buněk produkty jednotlivých genů na úrovni proteinů.

Metoda umožňuje určit:

- přítomnost klonu maligních buněk
- příslušnost maligních buněk k vývojové řadě
- stupeň diferenciaci maligních buněk



■ Cytogenetická analýza

Cytogenetická vyšetření slouží k průkazu získaných chromozomálních odchylek. Změny mohou být na úrovni:

- kvantitativní – *ploidie*
- kvalitativní – *translokace, inverze, delece*

Cytogenetická vyšetření se provádějí na chromozomových preparátech připravených standardními metodami a zjištěné chromozomové odchylky se popisují podle mezinárodní nomenklatury (ISCN 1995). Od každého pacienta se hodnotí nejméně 20 mitóz. K detekci numerických odchylek se používá metoda **fluorescenční in situ hybridizace (FISH)**. Přítomnost fluorescenčních signálů se hodnotí alespoň v 10 mitózách a 200 interfázních buňkách.

- *Vznik leukemie je provázen nenáhodnými genetickými změnami, které představují porušení normální struktury a funkce genů zodpovědných za udržení rovnováhy mezi proliferací a diferenciací hematopoetických buněk. Genetické přestavby jsou specifické pro jednotlivé typy leukemií a fenotyp nádorové buňky je jimi podmíněn. Z historického pohledu byla většina těchto přestaveb popsána a charakterizována na úrovni chromozomů při pečlivě cytogenetické analýze. V současné době lze tyto přestavby charakterizovat na molekulární úrovni a odhalit tak aktivaci onkogenů a inaktivaci tumor – supresorových genů zapojených do procesu leukemogeneze.*
- *Přesné určení chromozomových změn u hematologických malignit má diagnostický, prognostický a léčebný význam. Chromozomové změny maligních buněk jsou jak početní, tak i strukturální nebo obojí. Některé z nich, zejména na strukturální jsou specifické pro daný typ proliferace.*
 - **FISH** (fluorescenční in situ hybridizace) dovoluje pomocí chromozomově specifických sond určit genetické změny jak v dělících se buňkách, tak i v interfázových jádrech užitím centrometrických, či genově specifických sond.

- **CGH** (komparativní genomická hybridizace) dovoluje určit přítomnost a lokalizaci amplifikovaných a deletovaných genomických oblastí nezávisle na mitotické aktivitě nádorových buněk.

■ Techniky molekulární biologie

Z molekulárně biologických metod se provádí vyšetření **aberrantní metylace DNA** při poruchách regulace růstu a diferenciaci v hematopoéze. Plynulý pokles metylační aktivity dobře koreluje s pozitivní odpovědí na léčbu.

■ Kultivační

kultivace leukemických buněk s růstovými faktory hematopoézy a jiné metody.

STAVY BĚHEM LÉČBY

A DALŠÍHO VÝVOJE LEUKEMICKÉHO PROCESU

Remise

Stav při kterém dojde k **vymizení leukemických buněk a k obnovení činnosti funkčních leukocytů**. Většinou též dochází k opětovnému vytvoření rovnovážného stavu mezi jednotlivými buňkami a řadami. K remisi může dojít:

- ☐ **spontánně**
- ☐ **léčbou**

Remisi lze posuzovat ze dvou hledisek **klinického** a **laboratorního**. O laboratorní remisi mluvíme tehdy, dojde-li k úpravě některých parametrů krevního obrazu a to u dospělých většinou na hodnoty (Hb > 100 g/l, trombocyty > 100 . 10⁹/l, granulocyty > 1,5 . 10⁹/l, blasty v kostní dřeni < 5%).

- ☐ **Kompletní (úplná) remise** – úplné vymizení leukemických buněk.
- ☐ **Částečná remise** – leukemické buňky se nachází ve sníženém počtu (v kostní dřeni 0–5 % blastů).
- *Morfologická vyšetření (stanovení krevního obrazu a hodnocení kostní dřene) mají určitou omezenou schopnost zachytu leukemických buněk. I když těmito metodami zjistíme kompletní morfologickou remisi, je nutné počítat s tím, že zbytková masa leukemických buněk se může pohybovat v rozmezí 0–10⁶.*

Relaps

Stav, při kterém **po remisi dochází k proliferaci leukemických buněk**, které znovu potlačí normální krvetvorbu.

4.1.2. Akutní myeloblastická leukemie (AML)

Kmenová hematopoetická buňka u AML diferencuje většinou v myeloidní nebo v myelomonocytární blasty, méně v blasty erytroidní či megakaryocytární. Pro leukemické buňky je typické zastavení vyžívání na úrovni blastů (Adam a Vorlíček, 2001).

Na zvýšení počtu leukemických buněk se podílí různou měrou:

- **proliferativní aktivita leukemických buněk** (daná změnou v genetickém materiálu)
- **ztráta schopnosti zahájit proces programované smrti** – apoptózy

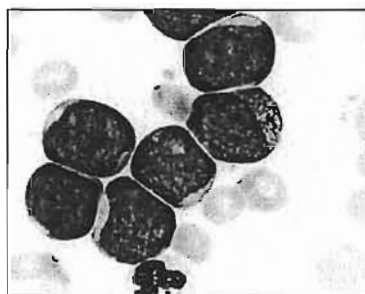
FAB KLASIFIKACE AML

Na základě morfologického, cytochemického a imunofenotypového vyšetření lze v současné době vymezit 8 subtypů AML (M0–M7), lišících se podle diferenciace a stupně maturace leukemických buněk:

Myeloblastická bez vyzrávání (M1)

(Málo diferencovaná myeloblastická leukemie)

- **Morfologie:** leukemické buňky jsou blasty I. a II. typu. Některé obsahují Auerovy tyčky.
 - > 90 % ve dřeni
- monocyty < 10 %
- granulocyty < 10 %
- **Cytochemie:**
 - myeloperoxidáza nebo lipidy > 3 %



Myeloblastická s částečným vyzráváním (M2)

- **Morfologie:**
 - převažují blasty II. typu
 - část leukemické populace vyzrává do promyelocytů, často abnormálně (hrubá až obrovská granula, pelgeroidní formy, 1–3 Auerovy tyčky v buňce, někdy zmnoženy eozinofily). Nachází se i menší množství myelocytů, metamyelocytů, tyčů a segmentů.
- Blasty 30–89 %
 - ◆ monocyty < 20 %
 - ◆ granulocyty > 10 %
- **Cytochemie:**
 - myeloperoxidáza > 80 %
- **Cytogenetika:** translokace t(8;21) (q22;q22) u asi 40 % případů.

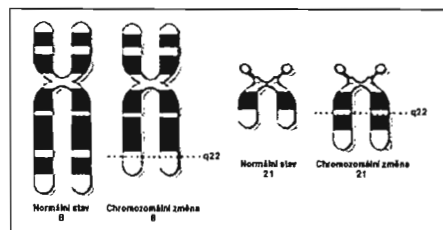


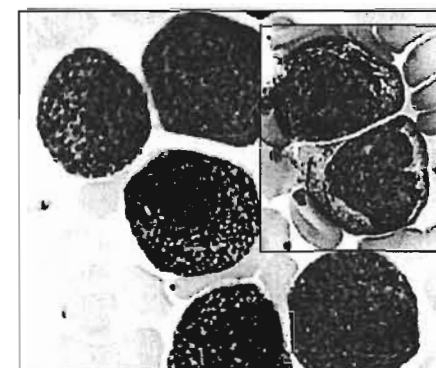
Diagram t(8;21) (q22;q22)

➤ *Pacienti s translokací t(8;21) mají poměrně dobrou prognózu, kdežto nemocní s trisomií 8. chromozomu nebo delecí 7. chromozomu mají prognózu špatnou.*

Promyelocytární (M3)

Rozlišují se tři typy promyelocytární leukemie:

- **standardní typ**
- **hypergranulární** (četná hrubá granula v promyelocytech)
- **mikrogranulární** leukemické buňky připomínají spíše atypické monocyty bez výraznějších granul, jemná granula lze prokázat elektronopticky
- **Morfologie:** nález několika leukemických buněk většinou se dvěma Auerovými tyčkami tvořícími svazky (faggot cells).
 - *Snadněji se tyto buňky naleznou v nátěrech obarvených na PE, CAE, PAS (ta-to barviva pozitivně barví Auerovy tyčky)*



Nález u AML M3 – periferní krev

- **Cytochemie:**
 - myeloperoxidáza silně pozitivní
 - lipidy silně pozitivní
- *Granula obsahují množství aktivátorů koagulační kaskády, proto je často přítomen syndrom DIC.*
- **Cytogenetika:** translokace t(15;17) (q22;q 11-12)

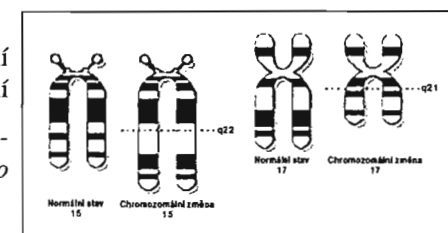


Diagram t(15;17) (q22;q21)

Myelomonoblastická (M4)

- **Charakterizována:** granulocytární i monocytární diferenciací
- **Morfologie:**
 - část leukemických buněk vykazuje znaky neutrofilních granulocytů



- část leukemických buněk vykazuje znaky monocytární řady nebo i obou řad současně

- ◆ blasty > 30 %
- ◆ monocyty > 20 %
- ◆ granulocyty > 20 %

- **Cytochemie:**

- myeloperoxidáza pozitivní
- nespecifická esteráza není tlumena NaF

Monoblastická (M5)

- **Charakterizována:** monocytární diferenciací

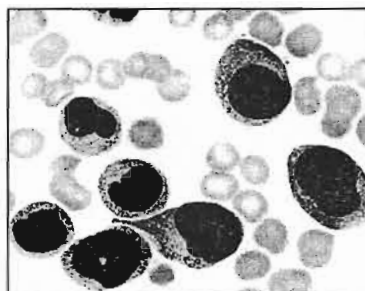
Podle stupně vyzrávání se rozlišují 2 typy:

- **málo diferencovaná** – AML M5a

- monocytární znaky > 80 %
- monoblasty > 80 %

- **vyzrávající** – AML M5b

- monocytární znaky > 80 %
- monoblasty < 80 %



- **Cytochemie:** alespoň 3 % leukemických buněk vykazují výraznou aktivitu NE blokovanou NaF

➤ Pro průkaz monocytární diferenciace je doporučeno měřit hladinu lysozymu v séru či moči. Lysozym je specifický diferenciační produkt buněk řady monocytární, neutrofilní a eozinofilní. Jeho obsah vzrůstá v buňce s jejím vyzráváním. Zvýšený nálezy lysozymu v buňkách je řadí jednoznačně do myeloidní řady.

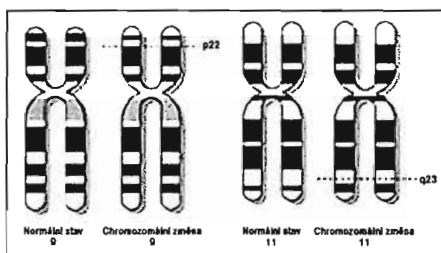


Diagram t(9;11) (p21–22;q23)

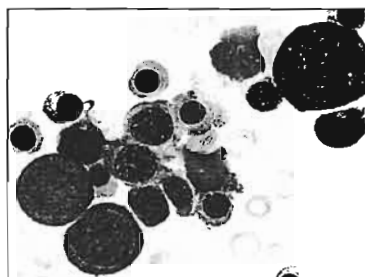
- **Cytogenetika:** translokace t(9,11)

Akutní erytroleukemie (M6)

- **Charakterizována:** velký podíl erytroblastů

- **Morfologie:**

- v kostní dřeni je z leukemických blastů více než 50 % erytroblastů
- v kostní dřeni je více než 30 % blastů I. a II. typu z granulocytární a monocytární řady
- erytroblasty mohou vykazovat dyserythropetické změny



- **Cytochemie:** PAS pozitivita, prstenčité sideroblasty

➤ Tato forma leukemie často přechází do jiných typů AML (M1, M2, a M4).

Megakaryoblastická (M7)

- **Charakterizována:** převaha megakaryoblastů

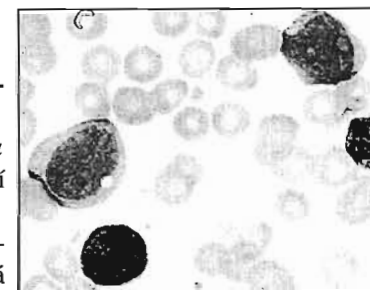
Rozlišujeme 2 typy megakaryoblastové leukemie:

- snáze diagnostikovatelná **leukemická forma**
- forma **aleukemická** (dříve akutní, či maligní myeloskleróza)

Megakaryoblastovou formu AML lze obtížně odlišit morfologicky. K průkazu se využívá fenotypizace. Většinou standardní technikou nelze odebrat kostní dřeň, musí se provést biopsie dřeně.

➤ Megakaryoblasty proliferující v kostní dřeni produkují tzv. destičkový růstový faktor (Platelet derived growth factor – PDGF), který obvykle vyvolá proliferaci fibroblastů v kostní dřeni s její následnou fibrózou – proto se nezdaří provést dřeňový punktát.

- **Morfologie:** destičky mohou vykazovat různé abnormality (např. vakuolizace)



Nediferencovaná AL (M0)

- **Charakterizována:** myeloblasty bez vyzrávání

Jde o typ akutní leukemie s leukemickými blasty, které nelze klasifikovat morfologicky a cytochemicky. Lze je klasifikovat elektronovým mikroskopem, kde vykazují aktivitu myeloperoxidázy nebo je možné se pokusit o navození jejich vyzrávání v buněčných kulturách. Tvoří asi 0,5–5 % všech leukemií.

- **Cytochemie:**

- myeloperoxidáza a lipidy < 3 %
- imunofenotypační znaky myeloidní řady

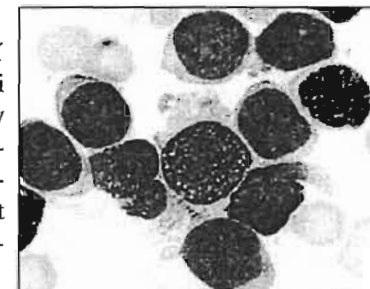
- **Cytogenetika:**

- t(3;21) (q26;q22)

Další typy AML,

které nejsou zavazaty do FAB klasifikace

- AML s blasty bazofilní řady
- AML s blasty eozinofilní řady



Eozinofilní AML

Zastoupení jednotlivých subtypů AML v dospělé populaci:

M0, M1 a M2	50 %
M4	25 %
M3	10 %
M5a a M5b	10 %
M6	< 5 %
M7	< 3 %

Laboratorní nálezy

U AML se nachází v diferenciálním počtu vedle zralých granulocytů různé zastoupení leukemických blastů, ale chybí vývojová stadia progenitorových buněk od blastů k vyzralým formám (hiatus leukemicus). Infiltrace dřeně maligními buňkami vede postupně k potlačení normální hematopoézy s patrnými příznaky anémie, granulocytopenie a trombocytopenie.

- **Krevní obraz:** anémie normochromní, normocytová, počet bílých krvinek (normální, snížený, zvýšený – u více než poloviny nemocných)
- **Krevní nátěr:** anizocytoza a poikilocytoza v červené řadě, neutropenie se zmnožením blastů > 5 %. Mohou být změny v neutrofilech, makrotrombocyty, jaderné erytrocyty
- **Kostní dřeň:** infiltrace leukemických buněk (20–90 % blastů)
- **Cytochemické vyšetření:** upřesňuje typ leukemie
- **Imunofenotypizace:** rozliší typy M0 a M7, které nelze cytochemicky prokázat
 - **myelomonocytární diferenciace**
 - ◆ CD 34, HLA-DR: nezralé kmenové buňky
 - ◆ CD 33, CD 11b, CD 13: myeloblastický klon
 - ◆ CD 14, CD 15: monoblastický klon
 - ◆ CD 34, CD 11b: kratší doba přežití
 - **erytroidní diferenciace**
 - ◆ Gly A
 - **megakaryocytární diferenciace**
 - ◆ CD 41, CD 42b, CD 61
- Znak CD 34 je přítomen u více než třetiny nemocných s AML a je častější u nediferencovaných forem (M0, M1). HLA-DR exprese je většinou nalezena u všech AML kromě M3 subtypu.
- **Cytogenetické vyšetření:** je důležité nejen pro upřesnění diagnózy, ale hlavně pro stanovení prognózy. Vzhledem k tomu, že cytogenetické změny úzce souvisí s biologickým průběhem nemoci mají cytogenetická vyšetření velký význam při rozhodování o agresivitě léčby.

4.1.3. Akutní lymfoblastická leukemie (ALL)

ALL je zhoubné krevní onemocnění způsobené maligní transformací hematopoetické kmenové buňky. Tato buňka se diferencuje v lymfoblasty a postupně nahrazuje normální krvetvorbu. Ke vzniku maligního klonu může docházet na různých vývojových stupních diferenciace lymfoidních blastů. Proliferace blastů se stejně jako u jiných typů akutních leukemií vymyká fyziologické regulaci. Jde o velmi různorodou skupinu leukemií s poruchou kmenové lymfatické buňky. Leukemické buňky postupně zaplňují kostní dřeň, slezinu, lymfatické uzliny. U ALL jsou časté chromozomální translokace (Pui a Evans, 1998).



Krvácivé projevy u ALL

- Je známa souvislost mezi ALL a trizonomií chromozomu 21. U nositelů trizomie je riziko vzniku ALL 20krát vyšší, než u lidí bez této aberace. Vyšší výskyt ALL se nachází i u některých dědičných syndromů (např. Falconiho anémie).

Klasifikace ALL

Morfologické a cytochemické posouzení blastů většinou dovolí odlišení lymfoidní a myeloidní linie. Buňky ALL neobsahují myeloperoxidázu, PAS reakce může být pozitivní i u AML. K leukemii lymfocytové řady může dojít na různém stupni vývoje.

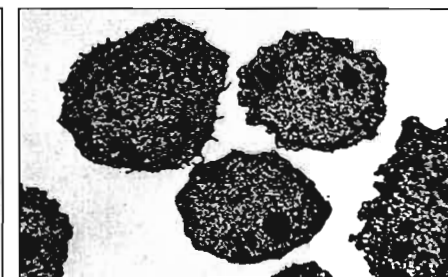
FAB KLASIFIKACE ALL

FAB klasifikace rozlišuje podle morfologie nezralé buňky 3 typy ALL:

- **L1** – leukemické blasty jsou malé uniformní s velkým poměrem jádro/cytoplazma. Cytoplazma je bazofilní. V jádře nevýrazné jádro. Bývá častější u dětí. Vyskytuje se častěji u T-ALL.

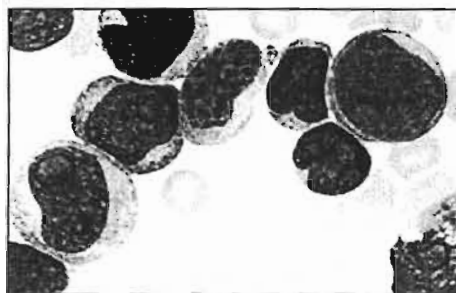


ALL – Typ L1 (periferní krev)

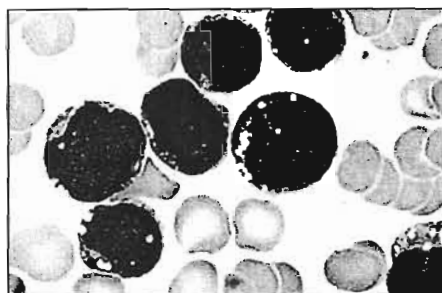


ALL – Typ L1 – periferní krev (el. snímek)

- ❑ **L2** – leukemické blasty mají heterogenní charakter, různé velikosti s bohatší cytoplazmou, nepravidelného tvaru jádra s heterogenním chromatinem a nukleoly různého typu. Vyskytuje se častěji u B-ALL.
- ❑ **L3** – leukemické blasty jsou velké, ale uniformní, podobné buňkám Burkittova lymfomu s vakuolizací cytoplazmy.



ALL – Typ L2 (periferní krev)



ALL – Typ L3 – periferní krev (el. snímek)

➤ Pro malou pestrost blastů ve světelném mikroskopu se systém FAB klasifikace ALL v klinické praxi příliš neosvědčila.

IMUNOLOGICKÁ KLASIFIKACE ALL

Imunologická klasifikace leukemických blastů je nezbytná pro stanovení diagnózy a typu ALL. Imunofenotypizace umožní rozlišení T a B lymfoidních linií a rozdělí leukemické blasty podle míry jejich vyzrání. ALL z B řady zahrnují kolem 75 % případů akutní lymfatické leukemie dospělých. Rozdělení leukemie, které publikoval Bene se spolupracovníky v roce 1995 je uvedeno v následující tabulce (Bene a spol., 1995).

IMUNOLOGICKÁ KLASIFIKACE AKUTNÍCH LYMFATICKÝCH LEUKÉMIÍ

B-linie	Všechny B-ALL jsou CD19+ a/nebo CD79a+ a/nebo CD22+	
B-I	<i>Pro-B</i>	Bez exprese jiných znaků než jsou výše uvedené
B-II	<i>Common</i>	Znaky B linie plus CD10+ (CALLA+)
B-III	<i>Pre-B</i>	Znaky B linie plus cytoplazmatické IgM+
B-IV	<i>Mature</i>	Znaky B linie plus cytoplazmatické nebo povrchové κ nebo λ
T-linie	Všechny T-ALL jsou cytoplazmatické nebo povrchové CD3+	
T-I	<i>Pro-T</i>	Navíc CD7+
T-II	<i>Pre-T</i>	Navíc CD2+ a/nebo CD5+ a/nebo CD8+ či CD4+
T-III	<i>Cortical, thymic</i>	Navíc CD1a+
T-IV	<i>Mature</i>	Povrchové CD3+ a CD1a-

Existuje i forma ALL, u které leukemické blasty nevykazují znaky B a T lymfocytů, tzv. nul ALL. Velmi zřídka se lze setkat i leukemickými blasty, které nesou znaky lymfoidní i myeloidní (Starý, 2005).

Laboratorní nálezy

- **Krevní obraz:** většinou leukocytoza (asi u 60 %), trombocytopenie, anémie
 - **Krevní nátěr:** blastická infiltrace (lymfoblasty až u 90 %)
 - **Kostní dřeň:** hypercelulární dřeň s masivní blastickou infiltrací a potlačením normální hematopoézy
 - **Cytochemie:** pozitivní PAS reakce, není přítomna myeloperoxidáza
 - **Imunofenotypizace:** umožní rozlišení mezi T a B buněčnou linií a rozdělí leukemické blasty podle míry jejich vyzrání.
 - **Cytogenetika:** se zaměřuje hlavně na vyhledávání cytogenetických aberací, které zpřesňují diagnózu. Nejhorší prognóza je u ALL, které vykazují t(9;22) a t(4;11).
 - **Molekulárně biologická vyšetření:** umožňují průkaz sekvencí nukleotidů v DNA, jež jsou typické pro některé chromozomální aberace
- Molekulárně biologické vyšetření lze použít k monitorování minimální zbytkové nemoci po různých léčebných kúrách. (monitoruje se přítomnost zbylých leukemických buněčných forem).

Literatura

ADAM, Z., VORLÍČEK, J. **Hematologie II.** Přehled maligních hematologických nemocí. Praha: Grada, 2001. 677 s.

APPELBAUM, F. R. **Antibody-targeted therapy for myeloid leukemia.** *Semin. Hematol.*, 1999, roč. 36, suppl. 6, s. 2–8.

BENE, M. C., CASTOLDI, G., KNAPP, W., et al. **Proposals for the immunological classification of acute leukemias.** *Leukemia*, 1995, roč. 9, s. 1783–1786.

FRIEDREICH K. **Ein Neuerfall von Leukämie.** *Arch. Pathol. Anat.* 1857, roč. 12, s. 37

HENDERSON, E. S., LISTER, T. A., GREAVES, M. F. (Eds.). **Leukemia.** Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1996, 619 s.

KLENER, P., et al. **Hematologie.** Praha: Galén, 2003. 115 s.

KRAHULCOVÁ, E., PENKA, M., VORLÍČEK, J. **Záhadná akutní leukemie poprvé popsána před 170 lety.** *Zdrav. Nov. Lék. Listy*, 1997, roč. 46, č. 31, s. 6–7.

LOWENBERG, B., DOWNING, J. R., BURNETT, A. **Acute myeloid leukemia.** *Curr. Opin. Hematol.*, 1999, roč. 6, s. 247–252.

PUI, CH., EVANS, H. E. **Acute lymphoblastic leukemia.** *New Engl. J. Med.*, 1998, roč. 339, s. 605–615.

STARÝ, J. **Historie a současnost léčby akutní lymfoblastické leukemie u dětí.** *Trans. Hemat. dnes*, 2005, roč. 11, č. 4, s. 170–175.

WHITTAKER, J. A., HOLMES, J. A. **Leukaemia and related disorders.** Oxford: Blackwell Science Ltd., 1998. 567 s.

WILLMAN, C. L. **Molecular evaluation of acute myeloid leukemias.** *Semin. Hematol.*, 1999, roč. 36, s. 390–400.

4.2. Myelodysplastický syndrom (MDS)

MDS jako diagnostickou skupinu vymezili poprvé Bennet a spol. v r. 1976 (Bennet a spol., 1982).

MDS je označení pro heterogenní skupinu nemocí, charakterisovanou **inefektivní hematopoézou, vyvolanou klonální poruchou pluripotentní kmenové buňky**. Mutace kmenové krvetvorné buňky vede ke vzniku patologického klonu s růstovou výhodou, který může nahradit normální krvetvorbu. Pluripotentní kmenová buňka u MDS je **schopna proliferace, avšak s defektní diferenciací** (Čermák a spol., 2005). Během diferenciace patologického klonu erytroblastů dochází k jejich předčasné terminální diferenciaci (Smetana a spol., 1999).

➤ Onemocnění je některými autory posuzováno jako preleukemický stav a je řazeno mezi maligní onemocnění, jinými mezi nemaligní choroby (Adam a Vorlíček, 2001).

Příčina: Jedná se o **poruchu proliferace a diferenciace mutované pluripotentní kmenové buňky s různými fenotypickými změnami, které se projevují neefektivní hematopoézou různého stupně** u všech krvetvorných řad hlavně v oblasti myeloidní řady (Jean a spol., 1990). Podle současných znalostí, klonální porucha nezahrnuje lymfocyty.

Vlastní příčina spočívá v **defektním systému, který opravuje DNA v hematopoetických buňkách**, dochází ke genetické nestabilitě buněk a k postupné transformaci těchto buněk v maligní formy. Genetická nestabilita vede k postupné změně hematologické buňky, její nezávislosti na regulačních mechanismech a nakonec k malignitě. Další mutace způsobí poruchu diferenciace s následnou cytopenií (Holman a spol., 2004).

➤ Na 5. chromozomu vznikají nejčastěji aberace dlouhého raménka, zejména tam kde jsou umístěny geny pro růstové faktory (G-CSF, GM-CSF, M-CSF) a interleukiny (IL-3, IL-4 a IL5). To způsobuje dysregulaci hemopoetických faktorů a takto poškozené faktory se pak podílejí na patogenezi onemocnění (Steensma a Tefferi 2003).

Kromě mutace kmenové buňky hraje při rozvoji MDS rozhodující roli i abnormální imunitní odpověď organismu, jež za normálních okolností vede k eliminaci poškozené buňky (Čermák a Kačírková, 2004).

➤ Porucha imunitní odpovědi se týká především snížené aktivity NK buňky (Dunbar a Nienhuis, 1995).

Ke vzniku MDS může přispět:

❑ **Věk nemocného** – u starších lidí se zvyšuje četnost genových mutací

- ❑ **Zevní faktory** – některé látky mohou vyvolat vznik chromozomálních aberací. Mezi tyto látky patří např. benzen, toluen, alkylační cytostatika a ionizační záření.
- ❑ **Aktivace onkogenů a inaktivace tumor – supresorických genů** – zatím není znám přesný význam aktivace těchto složek.

Podle současných představ je patogeneze MDS **vícetupňová**. Prvním krokem je zásah do genomu poškozující progenitorovou buňku vyvolaný chemicky, radiací, cytotoxickou látkou nebo náhodnou endogenní mutací. V dalším průběhu může dojít k dalším změnám genů, které jsou zapojeny do řízení buněčného cyklu, transkripce nebo nádorové suprese. Iniciální stadia MDS jsou charakterizována zvýšenou dřeňovou apoptózou, která je odpovědná za neefektivní hematopoézu (Málek, 2005).

MDS může být buď **primární** nebo **sekundární**. Známe-li vyvolávající příčinu, většinou se jedná o zevní faktory viry, mutageny (léky a toxické látky – benzen), záření, chemické látky (amoniak, produkty z nafty) jde o MDS sekundární, v ostatních případech o MDS primární. Pro primární MDS jsou charakteristické aberace některých chromozomů, zatímco u sekundárních se vyskytují mnohočetné změny.

Pro další vývoj onemocnění má význam nestabilita genomu, jež bývá spojena se vznikem dalších mutací, které mohou ovlivňovat proliferaci a diferenciální schopnost kmenové krvetvorné buňky. Důsledkem toho může být progresivní nárůst počtu nezralých krvetvorných buněk s velmi nízkým stupněm apoptózy, s přebytkem blastických forem v kostní dřeni i periferní krvi. Tato tzv. **pozdní fáze MDS** je proto spojena s vysokým rizikem rozvoje akutní leukemie (Čermák a Kačírková, 2004, Yamauchi a spol., 1990).

➤ **Příčinou leukemické transformace ve finálních stádiích MDS je zřejmě alterace genů odpovědných za nádorovou supresi. Dochází ke snížení apoptózy ve prospěch proliferace.**

KLASIFIKACE ONEMOCNĚNÍ

FAB klasifikace

Francouzsko-americko-britská klasifikace (FAB) navržená v roce 1982 rozděluje MDS podle nálezu v kostní dřeni a periferní krvi do 5 podskupin (Bennett a spol., 1982):

- **refrakterní anémie (RA)**
- **RA s prstenčitými sideroblasty (RARS)**
- **RA se zmnožením myeloblastů (RAEB)**
- **RAEB v transformaci do AL (RAEB-T)**
- **chronickou myelomonocytovou leukemii (CMML)**

FAB klasifikace umožňuje základní rozdělení na nemocné s méně pokročilou formou choroby (RA, RARS), lepší prognózou a nízkým rizikem leukemizace a na nemocné s pokročilou fází choroby, závažnější prognózou a vysokým rizikem přechodu do AL (RAEB, RAEB-T a CMML).

Klasifikace myelodysplastických syndromů FAB (French-American-British) 1982			
Subtyp MDS	zkratka	Počet blastů v periferní krvi	Počet blastů v kostní dřeni
Refrakterní anémie	RA	< 1%	< 5%
Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty	RARS	< 1%	< 5%
Refrakterní anémie s nadbytkem blastů	RAEB	< 5 %	5–20%
Refrakterní anémie s nadbytkem blastů v transformaci	RAEBT	> 5%	20–30% nebo Auerovy tyčky
Chronická myelomonocytová leukemie	CMML	monocyty 1.10 ⁹ /l	jakýkoliv nález uvedený výše
Akutní myeloidní leukemie	AML	> 30%	

FAB klasifikace však nezohledňuje některé další důležité prognostické faktory, jakými jsou např. počet a typ změn karyotypu, počet cytopenií v periferním krevním obraze, buněčnost kostní dřene či přítomnost fibrozy (*Germing a spol., 2000*).

WHO klasifikace

Nově navrhovaná WHO (World Health Organization) klasifikace vyřazuje ze skupiny MDS nemocné s RAEB-T, které zařazuje již do skupiny akutních leukemií a též nemocné s CMML, jež jsou zahrnuti do skupiny smíšených myelodysplasticko-myeloproliferativních syndromů. Změny jsou provedeny i v ostatních skupinách. Jako nová skupina byl zařazen tzv. neklasifikovatelný MDS (*Hartus a spol., 1999*).

WHO klasifikace MDS 2000	
Zkratka	Subtyp MDS
RA	Refrakterní anémie
RARS	Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty
RCMD	Refrakterní cytopénie s dysplazií ve více řadách
RCMD-RS	RCMD s prstenčitými sideroblasty
RAEB-I	Refrakterní anémie s nadbytkem blastů < 10%
RAEB-II	Refrakterní anémie s nadbytkem blastů > 10%
MDS-U	MDS s dysplazií v jedné řadě
MDS del 5q	MDS izolovaná delece 5. chromozomu

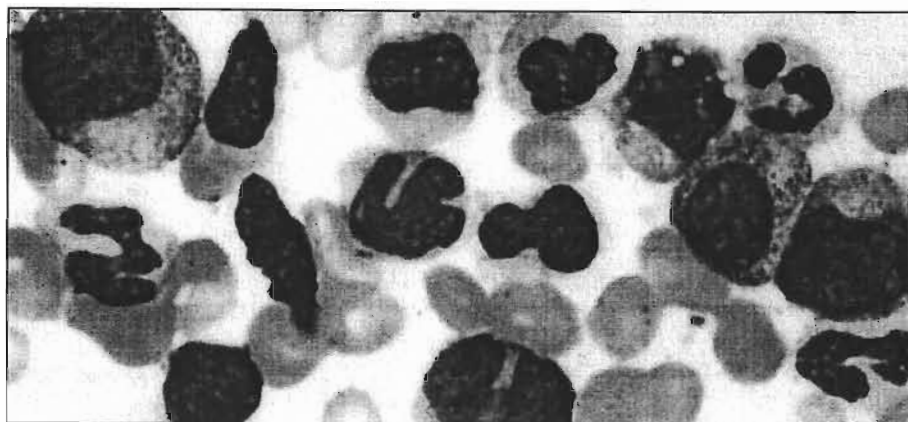
Z klasifikačních schémat vyplývá, že pro diagnostiku MDS má stále rozhodující význam vyšetření morfologických dysplastických změn ve sternálním punktátu doplněné o cytochemické vyšetření nátěru z aspirátu barvením na železo a o histologické vyšetření trepanobiopsického vzorku kostní dřene, jež umožňuje posoudit buněčnost dřene, topické změny a přítomnost ložisek nezralých elementů či fibrósy (*Neuwirtová a spol., 1997*).

Laboratorní nález

Diagnóza MDS je založena na morfologickém vyšetření, při kterém se hodnotí dysplastické změny v krvi a kostní dřeni. Využívá se jak cytologického, tak i histologického vyšetření kostní dřene.

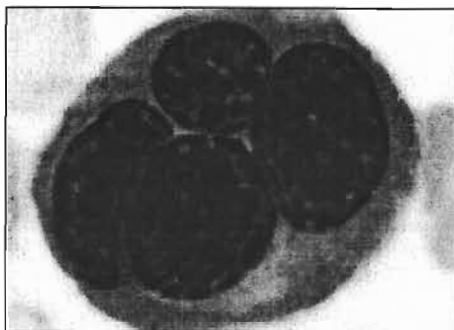
- **Krevní obraz:** v periferní krvi je cytopenie se známkami dysplazie, vyvolaná neefektivní hematopoézou, která postihuje jednu nebo více vývojových linií. U nemocných se zjišťuje jak pancytopenie, tak i izolované cytopenie (anémie, trombocytopenie a neutropenie). Bývá přítomna makrocytoza a retikulocytoza (*Čermák 2002, Raza a spol., 1996*).
- **Krevní nátěr:**
 - **erythrocyty** – megaloblastoidní změny, makroovalocyty, polychromazie, bazofilní tečkování. V případě těžké dyserytropoézy v kostní dřeni může být v periferní krvi poikilocytoza a anizocytoza.
 - **leukocyty** – posun doleva, přítomnost Pseudo-Pelgeroidních forem, monocytoza
- **Kostní dřeň:** může být normo-, hypo- nebo hypercelulární. Jsou v ní morfologické změny, cytogenetické změny a funkční abnormality (hyperplazie červené řady, velké erytroblasty s tvarovými odchylkami jader a Hawell-Jollyho tělísky s více jádry, pozitivní PAS reakce v erytroblastech, prstenčité sideroblasty, zvýšená granulopoéza, mikromegakaryocyty, blasty 5–30 %).
- **Imunofenotypizace:** Průtoková cytometrie může pomoci stanovit počet nezralých buněk v kostní dřeni.
- **Cytogenetika:** Důležitý diagnostický a prognostický význam má vyšetření karyotypu a to jak klasickými metodami, tak pomocí molekulární biologie.
 - **Cytogenetické abnormality u MDS nejsou jednotné. Nejčastěji jsou delece chromozomů 5, 7, 11, 12 a 20 a trizómie 8. chromozomu. Chromozomové aberace se vyskytují u 30–50 % jedinců s primárními MDS a až u 80 % pacientů se sekundárními MDS. U sekundárních MDS jsou častěji přítomny komplexní chromozomové změny zahrnující dalece 5. a 7. chromozomu nebo jejich dlouhých ramének (*Málek, 2005*).**
 - **Ostatní:** většinou zvýšená hladina feritinu a vyšší hodnoty laktátdehydrogenázy, alkalické fosfatázy a aminotransferáz, deficit pyruvátkinázy (*Dunbar a Nienhuis, 1995, Klener, 2001*).
 - **Význam vyšetření kultivace kmenových buněk in vitro je u MDS zatím ve stadiu výzkumu, stejně jako diagnostický a prognostický přínos vyšetření stupně klonality, exprese některých genů či telomerázové aktivity pomocí molekulárně genetických metod.**

NĚKTERÉ PROJEVY DYSPLAZIE
NEBO MORFOLOGICKÝCH ABNORMIT U MDS

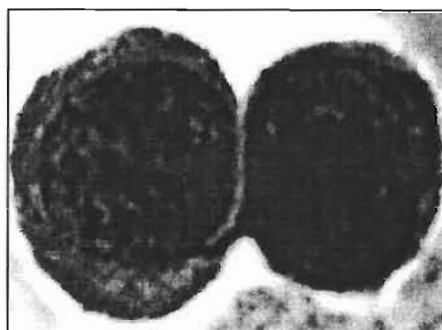


Dysplastické změny v krevních buňkách

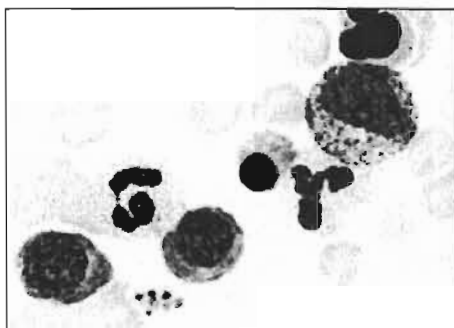
Dysplazie v červené řadě



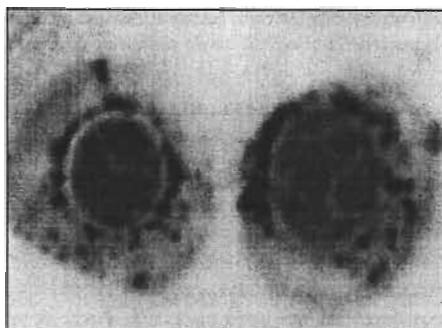
Vícejaderný erytroblast



Jaderný intracelulární můstek



Dyserythropoetické změny

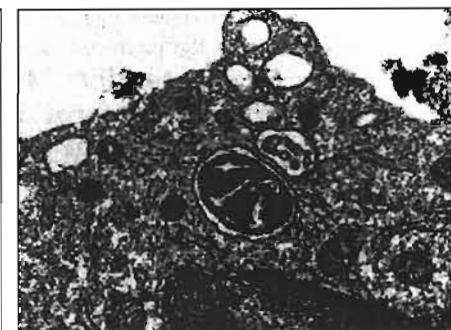


Prstenčité sideroblasty

ABNORMÁLNÍ MITOCHODRIE
S OBSAHEM Fe KOMPLEXU V PRSTENČITÉM ERYTROBLASTU U MDS



Zvětšeno 6 600x

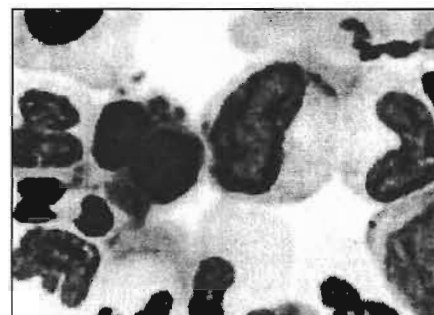


Zvětšeno 33 000x

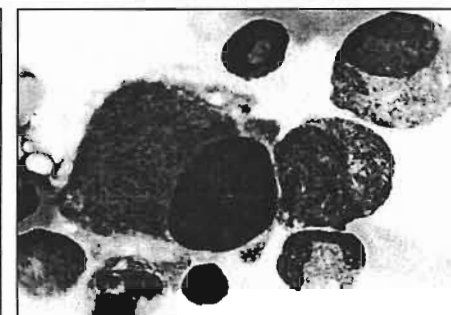
Dále se mohou vyskytovat v červené řadě tyto anomálie:

neokrouhlé, nepravidelné jádro, odštěpky chromatinu, trojlísté jádro, karyorexe, asymetrie mitózy, nepravidelné projasnění cytoplazmy, Howellova-Jollyho tělíska.

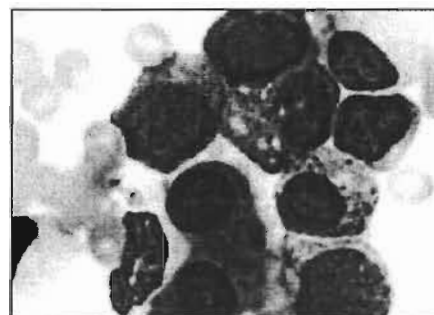
Dysplazie v trombocytové řadě



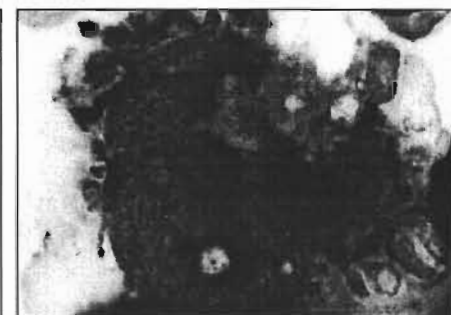
Mikromegakaryocyt



Jednojaderná forma megakaryocytu



Dvoujaderný megakaryocyt



Abnormita jádra megakaryocytu



Poškozená nebo změněná produkce destiček

Dysplazie v granulocytární řadě



Abnormálně velká granule



Abnormální lokalizace granulí

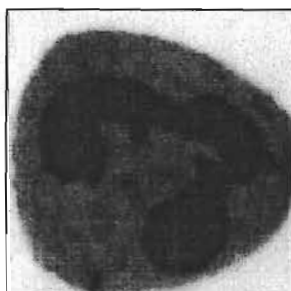


Velké metamyelocyty

Změny při cytochemickém barvení



Snížená nebo chybějící aktivita MPO



Snížená nebo v neutrofilech chybějící aktivita AF

Změny v ostatních buňkách

- ❑ Lymfocyty a plazmocytů
 - nejvíce známky dysplazie

❑ Makrofágy

- makrofágy fagocytující zbytky krvetvorných buněk
- siderofágy
- ojedinělé modré makrofágy s obsahem modrých hrudek

Literatura

ADAM, Z., VORLÍČEK, J. *Hematologie II. Přehled maligních hematologických nemocí*. Praha: Grada, 2001. 677 s. ISBN 80-247-0116-2.

BENNETT, J. M., KATOVSKY, D., DANIEL, M. T., et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Brit. J. Haematol.*, 1982, roč. 51, s. 189–199.

ČERMÁK, J. Myelodysplastický syndrom. In: MAYER, J., STARÝ, J. *Leukemie*. Praha: Grada, 2002, s. 221–234.

ČERMÁK, J., KAČÍRKOVÁ, P. Co je to myelodysplastický syndrom? Diagnostika, klasifikace a prognóza nemocných. *Čas. Lék. Čes.*, 2004, roč. 143, č. 6, s. 423–427.

ČERMÁK, J., VÍTEK, A., MICHALOVÁ, K., BŘEZINOVÁ, J., ZEMANOVÁ, Z. Myelodysplastický syndrom v novém tisíciletí. Jak klasifikovat a jak léčit nemocné? *Vnitř. lék.*, 2005, roč. 51, č. 1, s. 20–30.

DUNBAR, C. E., NIENHUIS, A. W. Myelodysplastic syndromes. In: *Blood: Principles and practice of hematology*. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1995, s. 377–414.

GERMING, U., GATTERMANN, N., STRUPP, C., AIVADO, M., AUL, C. Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leukemia Res.*, 2000, roč. 24, s. 983–992.

HARTUS, N. L., JAFFE, E. S., DIEBOLD, J., et al. World health organisation classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting – Airlie House, Virginia, November 1997. *J. Clin. Oncol.*, 1999, roč. 17, s. 3835–3849.

HOLMANN, W. K., LUBBERL, M., HOELZER, D., PHILLIP, K., KOEFFLER, H. Myelodysplastic

syndromes. *Hematol. J.*, 2004, roč. 5, č. 1, s. 1–8.

JEAN, A., IRRIGUIBLE, D., MELLA, F., et al. Abnormal chromatin clumping in leucocytes: a clue to a new subtype of myelodysplastic syndrome. *Eur. J. Haematol.*, 1990, roč. 45, s. 209–214.

KLENER, P. Myelodysplastický syndrom. In: KLENER, P., et al. *Hematologie*. Druhé doplněné vydání. Praha: Galén, 2001. 365 s.

MÁLEK, F. Myelodysplastický syndrom – pohled internisty. *Interní medicína pro praxi*, 2005, roč. 2, s. 65–69.

NEUWIRTOVÁ, R., MOCIKOVÁ, K., JELÍNEK, J., MUSILOVÁ, J., HAVLÍČEK, F., ADAMKOV, M., MICHALOVÁ, K., et al. Smíšené myelodysplastické a myeloproliferativní syndromy. *Čas. Lék. Čes.*, 1997, roč. 136, č. 23, s. 724–729.

RAZA, A., GREGORY, A., PREISLER, H. D. The myelodysplastic syndromes in 1996: complex stem cell disorders confounded by dual actions of cytokines. *Leukemia Res.*, 1996, roč. 20, s. 881–890.

SMETANA, K., JIRÁSKOVÁ, I., ČERMÁK, J. Incidence of nucleoli in erythroblast in patients suffering from refractory anemia of myelodysplastic syndrome. *Eur. J. Haematol.*, 1999, roč. 63, s. 332–336.

STEENSMA, D. P., TEFFERI, A. The myelodysplastic syndrome: a perspective and review highlighting current controversies. *Leukemia Res.*, 2003, roč. 27, s. 95–120.

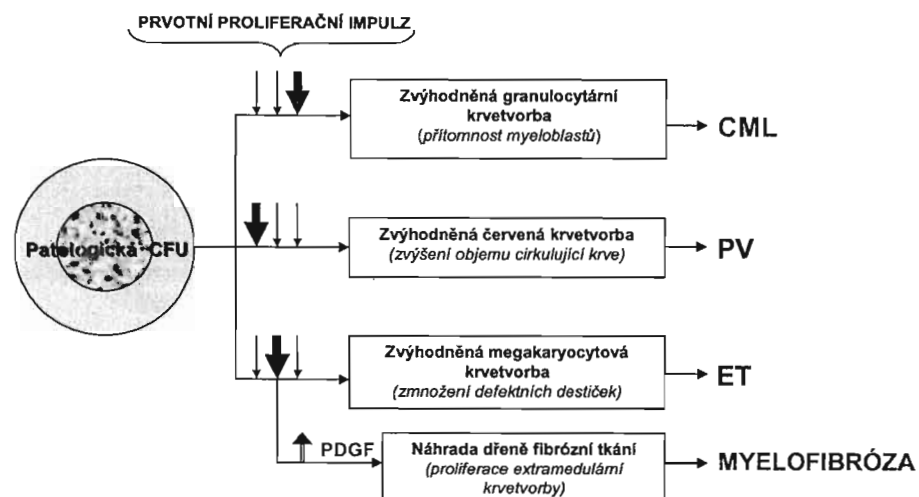
YAMAUCHI, K., ARIMORI, S., NAGAO, T. Transformation of refractory anemia with access of blasts in acute myelogenous leukemia with Ph negative chronic myelogenous leukemia – like characteristics. *Amer. J. Hematol.*, 1990, roč. 33, s. 69–71.

4.3. Myeloproliferativní onemocnění

Skupinu myeloproliferativních onemocnění tvoří několik nevyhraněně vymezených diagnostických jednotek. Jedná se o klonální nádorová onemocnění, která vznikají **neoplastickou transformací hemopoetické kmenové buňky**. Výsledkem transformace je **nekontrolovaná proliferace s následnou diferenciací takto pozměněné buňky**. Většinou se přidruží i extramedulární krvetvorba (slezina, játra). V pokročilém stadiu onemocnění se někdy postupně vyvíjí fibrósa dřeně, která je doprovázena anémií, trombocytopenií a často i granulocytopenií.

Jednotlivé jednotky zařazené mezi myeloproliferativní onemocnění se liší krvetvornou linií, do které se tyto buňky převážně diferencují. Mezi jednotlivými jednotkami nebývá ostrá hranice (Michiels, 1997).

Otázka zvýhodnění proliferační aktivity některých krvetvorných řad u myeloproliferativních onemocnění souvisí pravděpodobně s prvotním stimulem k proliferaci. Pokud by stimul měl stejný dopad na všechny krvetvorné řady, došlo by k jejich rovnoměrnému vzrůstu a to by se projevilo hypercelularitou kostní dřeně. Je-li proliferace některé z krvetvorných řad při počátečním stimulu preferována, pak můžeme pozorovat různé kombinace a různý stupeň proliferace jednotlivých zárodečných řad, jež se klinicky projeví jako trombocytémie, polycytémie nebo CML. Toto proliferační zvýhodnění nemusí být v počátečním vývoji onemocnění tak zvýrazněno, ale projeví se s postupným rozvojem onemocnění (Klener, 2003).



Většinou nedochází k izolovanému poškození jen jedné krvetvorné řady, ale vzhledem k tomu, že **poškození je v oblasti proliferace hematopoetické kmeno-**

vé buňky dochází k poškození všech krvetvorných linií vycházejících z myeloidní řady.

➤ Na rozdíl od akutních leukemií, u nichž nedochází k proliferaci ostatních krvetvorných linií, dochází u myeloproliferativních nemocí ke **zmnožení krevních buněk především jedné řady a k méně výraznému zmnožení buněk ostatních řad.**

Zvýšená proliferace fibroblastů, která provází tato onemocnění a vede k postupné fibróse kostní dřeně je zapříčiněna změnami v megakaryocytové řadě. Vyšší produkce abnormálních megakaryocytů, které produkují defektní destičky, vede k uvolnění zvýšeného množství růstových faktorů (hlavně PDGF) a destičkového faktoru 4 (PF4), které pak stimulují růst fibroblastů a stimulují u nich tvorbu kolagenových struktur.

➤ **Platelet-derived growth factor – PDGF (Růstový faktor pocházející z destiček).** Je to cytokin patřící do skupiny polypeptidových růstových faktorů. Kromě trombocytů, ze kterých se uvolňuje po dobu krevního srážení, jej sekretují i fibroblasty, buňky hladkého svalstva cév, endotelové buňky a makrofágy.

Příčina: Vyvolávající příčiny myeloproliferativních nemocí nejsou přesně známy. Zvýšené riziko představuje expozice radioaktivnímu záření. Ze současných znalostí nelze jednoznačně říci, proč dochází k transformaci progenitorové kmenové buňky a ke zvýšené proliferaci a akumulaci hematopoetických buněk.

Klasifikace myeloproliferativních stavů

Řadu let byla používána FAB klasifikace (Bennet, 1985). Nově byla zavedena klasifikace WHO (Harris, 1997), u které došlo zejména při klasifikování CML k rozdělení tohoto stavu do několika diagnostických jednotek (CML s pozitivním Ph chromozomem, chronická neutrofilní leukémie, atypická CML aj.). Pro přehlednost si zde dovoluji použít dříve používanou FAB klasifikaci.

Mezi myeloproliferativní onemocnění se podle FAB klasifikace řadí:

- **Chronická myeloidní leukémie (CML)**
- **Polycythemia vera (pravá polycytémie)**
- **Trombocytémie**
- **Myelofibróza**

Jednotlivá onemocnění, která se řadí do této skupiny se liší nejen krevním obrazem, ale i biologickým průběhem onemocnění. Pro tyto stavy je typická genetická nestabilita, vlivem které dochází ke stupňování agresivity nemoci a někdy i k přechodu v akutní leukemii.

➤ **Další podrobnější otázky klinických projevů, průběhu, léčby a laboratorních ukazatelů u CML jsou řešeny v kapitole Chronické leukémie.**

4.3.1. Pravá polycytemie (PV)

Polycythaemia vera (Polycytemia vera rubra)
(z řečtiny: *poly* = mnoho, *kytos* = buňka)

Poprvé popsal polycytemii r. 1892 Vaquez, později popis rozšířil Osler (Osler, 1903). Někdy se toto onemocnění popisuje jako Vaquezova-Oslerova choroba.

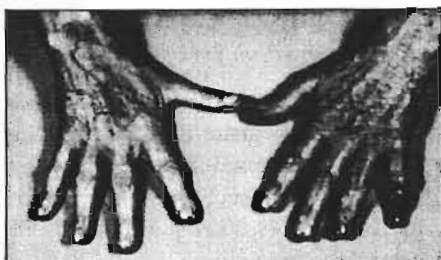
Pravá polycytemie je onemocnění, u kterého je **na úrovni CFU-GEMM narušena rovnováha v regulaci tvorby krvinek**. V kostní dřeni zvýšeně proliferuje hlavně červená, ale i granulocytární a megakaryocytární řada. Výsledkem je vzestup erytrocytů doprovázený zvýšením granulocytů a trombocytů.

Příčina: nemoc je způsobena klonální proliferací poškozené hemopoetické kmenové buňky, která proliferuje převážně do červené řady. U nemocných s PV se vyskytuje mutovaný gen, který vytváří erythropoetinový receptor, jež má zvýšenou citlivost k erythropoetinu. Nedochází tedy ke snížení erythropoézy při normální hodnotě hematokritu a normální oxygenaci. Zvýšená erythropoéza sice utlumí tvorbu erythropoetinu a jeho hladina v séru se sníží, ale tato nízká hladina sice postačuje potřebám patologického klonu, ale nepostačuje požadavkům normálních progenitorových kmenových buněk BFU-E a CFU-E, které jsou pravděpodobně ve dřeni zachovány.

Dochází k tomu, že **patologické buňky výrazně proliferují zejména do červené řady i při nízkých hladinách erythropoetinového receptoru, zatímco normální erythropoéza je utlumena, protože hladina erythropoetinu je pro její stimulaci příliš nízká** (Means, 1999).

Onemocnění by pak mohlo být zapříčiněno **abnormální citlivostí patologické kmenové buňky k erythropoetinu**. Příčina vzniku tohoto klonu, však není objasněna.

➤ **Od pravé polycytemie je nutné odlišit sekundární polyglobulii, která obvykle etiologicky souvisí s nějakým patofyziologickým dějem, který zvyšuje tvorbu erythropoetinu (v ledvinách, případně ektopicky mimo ledviny). O této diagnostické jednotce je pojednáno v kapitole o polyglobuliích.**

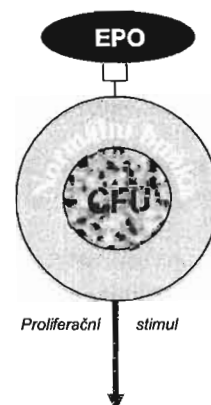


Zabarvení pokožky u PV

PROLIFERAČNÍ AKTIVITA NORMÁLNÍ A PATOLOGICKÉ KMENOVÉ BUŇKY U PRAVÉ POLYCYTEMIE

Normální stav

Normální hladina EPO



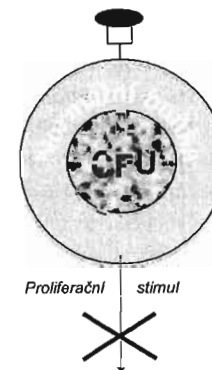
Normální proliferace

Polycytemie

Snížená hladina EPO



Klonální proliferace



Normální proliferace

Laboratorní nález

Počáteční stadium nemoci:

- **KO:**
 - Hb – ženy > 160 g/l, muži > 180 g/l
 - WBC – nepřesahují hodnotu $30 \cdot 10^9/l$
 - Plt – trombocytóza, často lehce nad $400 \cdot 10^9/l$
 - RBC – ženy > $5,9 \cdot 10^{12}/l$, muži > $6,6 \cdot 10^{12}/l$
 - Rtc – normální až lehce zvýšené
 - Hct – 0,50 až 0,70
- Hematokrit (Hct) je brán jako objektivnější ukazatel spíše než hemoglobin (Hb), protože u deficitu železa může být Hct proporcionálně vyšší než Hb.
- Erythropoetin: nízká hladina (rozdíl od polyglobulie, kde bývá hladina zvýšena)
- Kostní dřev: hyperplastická, zvýšena hlavně erythropoéza, ale částečně i megakaryopoéza (přítomna větší seskupení megakaryocytů s laločnatými jádry a hyperploidií)
- Celková erytrocytární masa: zvýšená o více než 25 % oproti normálu (ženy > 32 ml/kg hmotnosti, muži > 36 ml/kg)
- FW: snížené hodnoty (1 - 2 mm/hod)
- Viskozita krve: zvýšené hodnoty
- Ostatní: zvýšený index AF v neutrofilech

- *Vyšetření celkové erytrocytární masy radioizotopovou metodou ztrácí význam u obézních pacientů, neboť tuková tkáň nebývá vaskularizována (výrazněji protkána cévami).*

Pozdější stadium nemoci:

- navíc – KO: změny MCV, MCH, MCHC
- *Krevní nátěr:* anizocytoza, hypochromie, ovalocytoza, poikilocytoza. Při vyšších počtech WBC posun k nezralým formám granulocytární řady, občas eozinofilie a bazofilie.
- *Sideroblasty:* < 0,20
- *Funkce trombocytů:* bývá často narušena

4.3.2. Esenciální (primární) trombocytémie (ET)

Stav poprvé popsal v r. 1920 di Guglielmo a v r. 1934 Epstaein a Goedel. Onemocnění bylo označováno dříve různými názvy, jako primární hemoragická, idiopatická trombocytémie, megakaryocytární leukemie či megakaryocytární myeloza.

Esenciální trombocytopenie je myeloproliferativní onemocnění charakterizované **zmnožením počtu patologických krevních destiček v důsledku abnormální proliferace megakaryocytů z abnormálního klonu hemopoetické kmenové buňky**. Onemocnění doprovází trombotické nebo krvácivé poruchy způsobené defektními trombocyty. Mohou se nacházet zvýšené hodnoty krvinek ostatních krevních řad (Kutti a Wadenvik, 1996).

Příčina: Jde o klonální onemocnění na úrovni hematopoetické kmenové buňky. Příčina vzniku patologického klonu není známa. Abnormální proliferace megakaryocytů může souviset se zvýšenou produkcí trombopoetinu nebo by případně mohlo jít o poruchu funkce jeho receptoru, podobně jako u PV (Ghilardi a Skoda, 1999).



Cévní poruchy u ET

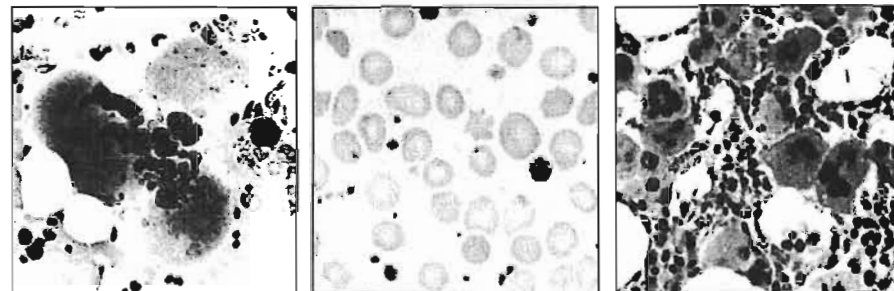
Laboratorní nález

ET není definována ani cytogeneticky, ani morfologicky.

- *KO:* normocytární, normochromní anémie (v případě krevních ztrát), počet destiček výrazně zvýšen (někdy se počty pohybují v rozmezí 3000–5000 · 10⁹/l), WBC: do 20 · 10⁹/l.

- *Krevní nátěr:* morfologické odchylky destiček (makrotrombocyty), agregáty, úlomky megakaryocytů někdy změny morfologie červené krvinky (poikilocytoza).

NÁLEZY U TROMBOCYTEMIE



Kostní dřev

Periferní krev

Histologie

- *Kostní dřev:* nachází se hyperplazie všech buněčných elementů, zvláště megakaryocytů (velké laločnaté megakaryocyty tvořící shluky, někdy se nachází zmnožení retikulinových vláken).
- *U reaktivní trombocytozy je morfologie megakaryocytů normální a u destiček není patrná tendence ke shlukování.*
- *Kostní dřev:* zmnožení atypických forem megakaryocytů
- *Histologie:* myeloidní metaplasie ve slezině, lymfatických uzlinách, v ledvinách
- *Funkční poruchy destiček:* narušena uvolňovací reakce, dále adhezivita a agregace
- *Koagulace:* časté poruchy koagulačního systému
- *Ostatní:* AF bývá lehce zvýšená nebo normální

4.3.3. Primární myelofibroza (Myeloskleroza)

Poprvé toto onemocnění popsal v r. 1879 Heuck. Pro toto onemocnění se v současné době začínají používat názvy jako myelofibroza s myeloidní metaplazií. V anglosaském písemnictví agnogní myeloidní metaplasie.

Myelofibroza je chronické myeloproliferativní onemocnění s **extrémní fibrózní přeměnou (zmnožením kolagenního pojiva) krvetvorné kostní dřevě**, někdy osteosklerozou a proliferací extramedulární krvetvorby, zejména ve slezině, játrech, ale i v jiných orgánech či uzlinách. Fibroza kostní dřevě vede nakonec k náhradě krvetvorné tkáně vazivem. Doprovodným syndromem myelofibrózy je zvýšená proliferace endotelových buněk (Castro-Malspina, 1984).

- *Primární myelofibrozu je nutné odlišit od sekundární fibrotizace kostní dřeně, která se může vyvinout působením některých toxických látek (benzen, rentgenové záření), či u některých nádorových chorob.*

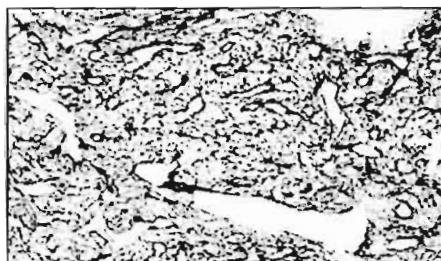
Příčina: zůstává prozatím neznámá. Vedle zmnožení retikulárního pojiva se předpokládá **transformace hematopoetické kmenové buňky, která vede převážně k tvorbě patologických megakaryocytů**. V patofyziologii onemocnění může hrát roli zvýšená exprese nebo bodová mutace receptoru pro růstový faktor kmenových buněk SCF (Stem-cell factor). Uvažuje se i o určité úloze nádorového růstového faktoru β -TNF (Tumor necrosis factor β) či bazického růstového faktoru fibroblastů b-FGF (bazic-Fibroblast growth factor). V genezi onemocnění může sehrát určitou roli i trombopoetin a jeho receptor Mp1 (Barosi, 1997).

- *Na buňkách CD 34+ byla u nemocných s primární myelofibrózou zjištěna vyšší denzita receptorů pro b-FGF a naopak nižší denzita receptorů pro β -TNF.*

Fibroza je podobně jako u pravé polycytemie sekundárním jevem. Fibroblasty jsou funkčně i fyzikálně stejné jako fibroblasty zdravých jedinců. Vzniklý kolagen má normální strukturu, ale jeho depozice je abnormální.

Laboratorní nález

- **KO:**
 - **anémie** **normochromní a normocytová** (vyvolaná neefektivní erytropoézou a zkráceným přežíváním erytrocytů)
 - **leukocyty:** $10\text{--}20 \cdot 10^9/l$ (u 20 % nemocných bývá leukopenie)
 - **trombocyty:** v počáteční fázi většinou počet krevních destiček zvýšen (až $1\,500 \cdot 10^9/l$) později se vyvine trombocytopenie
 - **bazofily:** absolutní počet zvýšen
- **Krevní nátěr:** ojediněle mladší formy granulocytů (blasty až do 10 %), normoblasty, úlomky jader megakaryocytů (velikost $5\text{--}12\ \mu\text{m}$), anizocytoza, poikilocytoza s typickými dakrocyty, polychromazie, bazofilní tečkování erytrocytů, hypersegmentace granulocytů (deficit vitamínu B_{12}).
- **Kostní dřeň:** v počátcích může být hyperplastická, později hypocelulární, nemoc končí fibrozou dřeně.
- *V pozdějších stádiích onemocnění nelze kostní dřeň punkcí odebrat – k vyšetření dřeně je nezbytná trepanobiopsie.*
- **Trepanobiopsie:** nachází se různý stupeň fibrózy se střídáním hypercelulárních a amorfních hypocelulárních ložisek. Přítomny atypické megakaryocyty nebo



Myelofibróza – zmnožené retikulární pojivo

mikromegakaryocyty s hypo- či hyperlaločnatým jádrem a hrubým chromatiem. Jsou zmnoženy plazmatické a retikulární buňky.

- **AF v granulocytech:** zvýšená

Literatura

BAROSI, G. Myelofibrosis with myeloid metaplasma: diagnostic definition and prognostic classification for clinical studies and treatment guidelines. *J. Clin. Oncol.*, 1997, roč. 17, s. 2954–2970.

BENNET, J., KATOVSKY, D., DANIEL, M., et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann. Intern. Med.*, 1985, roč. 103, s. 620–625.

CASTRO-MALSPINA, H. Pathogenesis of myelofibrosis: Rule of ineffective megakaryopoiesis and megakaryocyte compacts. New York: Alan R. Liss, 1984. 478 s.

DI GUGLIELMO, G. Eritroleucemia a piastrinemia. *Folia Med.*, 1920, roč. 1, s. 36.

GHILARDI, N., SKODA, R. C. A single-base deletion in the thrombopoietin (TPO) gene causes familial essential thrombocythemia through a mechanism of more efficient translation of TPO mRNA [letter]. *Blood*, 1999, roč. 94, č. 4, s. 1480–1482.

HARRIS, N. L., JAFFE, E. S., DIEBOLD, J., et al. The World health organization classification of neoplastic diseases of the hema-

topoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November. *Ann. Oncol.*, 1997, roč. 10, s. 1419–1432.

KLENER, P. Vnitřní lékařství. Svazek VIII, Hematologie. Praha: Grada, 2003. 115 s.

KUTTI, J., WADENVIK, H. Diagnostic and differential criteria of essential thrombocythemia and reactive thrombocytosis. *Leukemia Lymphoma*, 1996, roč. 22, suppl. 1, s. 41–45.

MEANS, R. T. Polycythemia vera. In Wintrobe's Clinical Hematology. 10th ed. Vol. 2. Baltimore: Williams and Wilkins, 1999, s. 2374–2388.

MICHIELS, J. J. Diagnostic criteria of the myeloproliferative disorders: essential thrombocythaemia, polycythaemia vera and chronic megakaryocytic granulocytic metaplasia. *Neth. J. Med.*, 1997, roč. 51, s. 57–64.

OSLER, W. Chronic cyanosis with polycythemia and enlarged spleen: a new clinical entity. *Amer. J. Med. Sci.*, 1903, roč. 126, s. 187.

4.4. Chronické leukemie

Mezi chronické leukemie se řadí:

- ☐ Chronická myeloidní leukemie
- ☐ Chronická B lymfocytární leukemie
- ☐ Prolymfocytová leukemie
- ☐ Vlasatobuněčná leukemie

- *Poznámka autora:* I když podle klasifikace WHO se taxonomicky řadí CML mezi myeloproliferativní stavy a B-CLL, prolymfocytová leukemie a HCL mezi lymfoproliferativní stavy, pokládám z didaktických důvodů za účelné je zařadit do skupiny chronických leukemií.

4.4.1. Chronická myeloidní leukemie (CML)

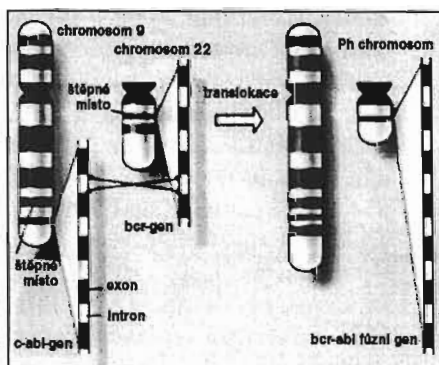
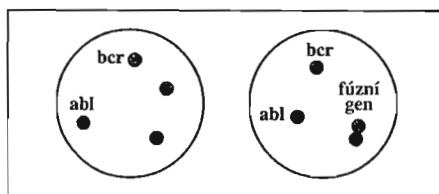
CML byla poprvé popsána Bennetem a Virchowem v r. 1845.

- Z diagnostického pohledu někteří autoři (WHO klasifikace) zařazují CML do skupiny chronických leukemií, názory však nejsou jednotné.

CML je zhoubné nádorové onemocnění postihující hemopoetickou kmenovou buňku, které se projevuje změnami v myeloidní vývojové řadě a to zvláště v její granulocytární linii a vznikem Ph chromozomu. Jde o myeloproliferativní onemocnění, při kterém *dochází ke značné proliferaci a současně i k poruše dělení myeloidních buněk*. Porucha zčásti postihuje i červenou a megakaryocytovou řadu. Porucha časem přechází v blastickou krizi, jejíž průběh je podobný akutní leukemii, ale s horší odezvou na cytostatickou léčbu.

Příčina: Příčina, která vyvolává změnu na úrovni kmenové buňky a tvorbu Ph chromozomu, není známa. Za transformaci kmenové buňky je zodpovědný gen *bcr/abl* a jeho produkt onkoprotein p210 (Druker a spol., 2001).

Dnes víme, že u Ph chromozomu jde o přestavbu, která je výsledkem recipro-



Tvorba fúzního genu *bcr/abl*

ké translokace (označuje se t) mezi chromozomy 9 a 22 [t(9;22)(q34; q11)], při které dochází k fúzi protoonkogenu *abl* (Abelsenova myší leukemie) z chromozomu 9 a genu *bcr* (Breakpoint Cluster Region) z chromozomu 22. Výsledkem této fúze je **nový fúzní gen *bcr/abl*** (Rowley, 1973). Chromozóm 22 se touto translokací zkrátí a chromozóm 9 se naopak prodlouží. Předpokládá se, že vznik tohoto genu je příčinou CML.

- Roku 1960 Nowell a Hungerford ve Philadelphii popsali nejprve u dvou mužů a v témže roce u sedmi nemocných s CML ztrátu genetického materiálu na raménku chromozomu skupiny G (Nowell a Hungerford 1960a, Nowell a Hungerford, 1960b). Přestavěný chromozóm 22 byl později nazván **chromozóm Philadelphia (Ph1)**. Ph¹ proto, že se objevitelé domnívali, že je první ze série charakteristických abnormalit karyotypu, které bude možné nalézt u různých typů leukemií, později se od označení Ph¹ upustilo – označuje se pouze Ph (Druker a spol., 2001).

Normální gen *abl* generuje vznik tyrozinkinázy. Tyrozinkináza p145 genu *abl* představuje jeden ze signálních proteinů regulace buněčné populace. Fúzní *bcr/abl* onkogen, který má oproti normálnímu genu zvýšenou aktivitu *bcr* genu, pak v oblasti exonu *bcr* 12–16 determinuje tvorbu fosfoproteinu s tyrozinkinázovou aktivitou, označovaného jako **protein p210**.

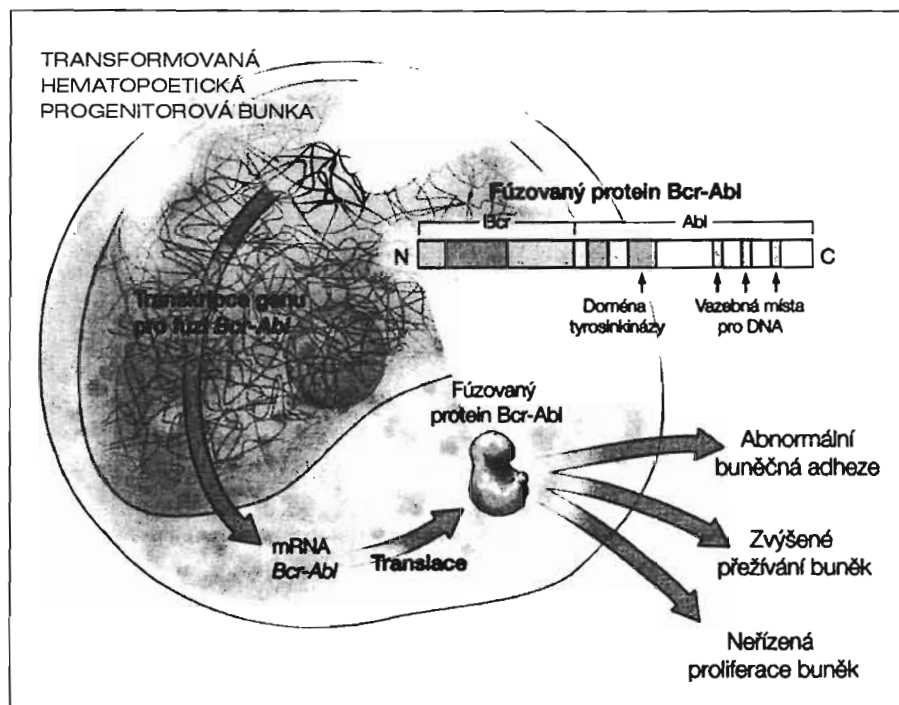
- Po translokaci mezi 9. a 22. chromozómem dochází k transkripci fúzního genu *bcr/abl*. Poté dojde k translaci výsledné chimerické *bcr/abl* mRNA. To vede k syntéze proteinu p210.

Abnormální protein p210 vyvolá **chaotickou fosforylaci zbytků cytoplazmatických proteinů**, které hrají důležitou roli v regulaci adheze, motility, proliferace, diferenciace a apoptózy. To postupně vede k abnormální aktivitě řady signálních drah a v konečném důsledku ke vzniku nádorového klonu s charakteristickým fenotypem (Sawyers, 1999).

- Při popsané translokaci se současně přenáší *c-sis* gen z chromozomu 22 na chromozóm 9. Gen koduje růstový faktor PDGF (Platelet derived growth factor). Není jasné, zda i tento gen se nepodílí na vzniku CML.

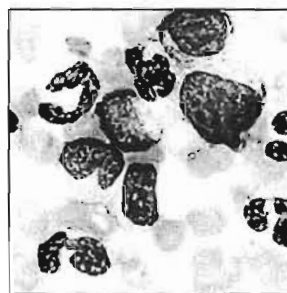
VZNIK CHIMERICKÉHO GENU BCR/ABL JE DNES POVAŽOVÁN ZA PODMÍNKU VZNIKU MALIGNÍHO KLONU CML. PŘESTO SE VŠAK PŘEDPOKLÁDAJÍ DALŠÍ ZATÍM JEŠTĚ NEDOSTATEČNĚ DEFINOVANÉ MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY, KTERÉ SE V TOMTO PROCESU UPLATŇUJÍ.

TVORBA ABNORMÁLNÍHO PROTEINU P210



V průběhu onemocnění bývá **celkové množství granulocytů zvýšeno 10-15krát (v ojedinělých případech až 100krát)**. Myeloidní buňky se ve zvýšené míře hromadí v kostní dřeni, případně ve slezině a v játrech. Do obvodové krve jsou vyplavována méně zralá vývojová stadia buněk granulocytární řady. Ke zvýšené proliferaci a k morfologickým a funkčním změnám dochází i u megakaryocytové a červené řady.

➤ **Blastický zvrát CML** je spojený s nahromaděním dalších mutací, včetně defektů transkripčních faktorů. Velmi vzácný je blastický zvrát postihující megakaryoblasty nebo erytroblasty.



CML – nález v periferní krvi

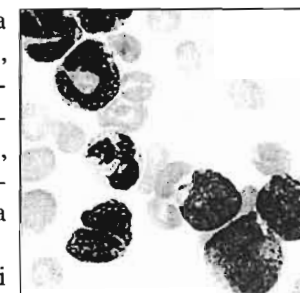
Laboratorní nález

- **KO:** leukocytoza (až $400 \cdot 10^9/l$), trombocytoza, někdy anémie již na začátku onemocnění
- **Krevní nátěr:** vyplavování nezralých prekurzorů (metamyelocyty, myelocyty), dále bývá přítomna eozinofilie a bazofilie

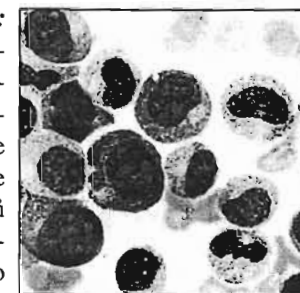
- **Kostní dřev:** hyperplastická s výrazně zmnoženou granulocytární řadou, přítomna eozinofilie, bazofilie a megakaryocytoza.
- **Ostatní:** výrazně snížená AF v neutrofilech (0–20/100), zvýšená hladina vit. B₁₂, LDH a kyseliny močové v séru.
- **Cytogenetika:** nález Ph chromozomu (přítomen u 90–95 % nemocných), průkaz přestavby genu bcr/abl pomocí PCR.

ATYPICKÉ FORMY CML

- ☐ **Juvenilní CML:** nemoc se zjišťuje zejména u malých dětí. Laboratorně se nachází monocytóza, častá je trombocytopenie, normální nebo lehce zvýšená hodnota ALP, zvýšené hladiny fetálního hemoglobinu, bývají zvýšeny imunoglobuliny v séru, antinukleární protilátky a protilátky proti lidským imunoglobulinům. U syndromu chybí přestavba bcr/abl (nenachází se Ph chromozom).
- ☐ **Chronická neutrofilní leukemie:** Jedná se o velmi vzácnou formu CML, která se vyskytuje hlavně u starých lidí. Vyznačuje se přetrvávající neutrofilii, hepatosplenomegálií. Laboratorně se zjišťuje zvýšená hladina vitamínu B₁₂, kyseliny močové a ALP v neutrofilech. Nachází se vyvráté formy neutrofilů s toxickým zrněním a Döhleho inkluze. Kostní dřev je hyperplastická.
- ☐ **Ph negativní CML:** CML, u které se neprokáže Ph chromozom. Morfologické a klinické známky jsou podobné jako u CML. Laboratorně je nutné PCR vyšetření bcr/abl translokace. Vyskytuje se velmi sporadicky. Je leukemií lidí staršího věku (nad 70 let). Zjišťuje se anémie, granulocyty vykazují dysplastické změny (hypogranulace, Pelgeroidní tvary). Nezralé formy jsou přítomny u více než 15% případů. Nachází se monocytóza a chybí eozinofilie a bazofilie. V kostní dřeni je granulocytární hyperplazie a potlačena erytropoéza a megakaryopoéza. Blasty se vyskytují většinou jen do 30 %.
- ☐ **Chronická myelomonocytární leukemie (CMML):** U této formy leukemie dochází ke zmnožení monocytárních buněčných forem a k dysplazii všech buněčných linií v kostní dřeni. Počet blastických forem v kostní dřeni je < 20%. WHO klasifikace doporučuje považovat za CMML pouze nemocné se známkami myeloproliferace a s počty monocytů v periferní krvi nad $5 \cdot 10^9/l$. Stavy, u kterých je počet monocytů v rozmezí $1-5 \cdot 10^9/l$ se zařazují jako MDS/MPS. Více viz kapitola – myelodysplastický syndrom.



Juvenilní CML



Chronická myelomonocytární leukemie

4.4.2. Chronická B-lymfocytární leukemie (B-CLL)

CLL poprvé popsal r. 1847 Virchow. Virchow popsal dva typy chronických leukemií, odpovídající CLL a CML. Tato malignita byla poprvé charakterizována před 30 lety Galtonem a Dameshem jako progresivní hromadění zrale vypadajících, ale funkčně inkompetentních, dlouhodobě přežívajících lymfocytů.

Chronická B-lymfocytární leukemie je lymfoproliferativní onemocnění s nízkou malignitou. Zjišťuje se převážně u starších osob (věk nad 50 let) a je **charakterizované množením a nahromaděním lymfoidních buněk** a to zpočátku ve dřeni a krvi, později v uzlinách, slezině a játrech.



Zvětšené uzliny u B-CLL

➤ Termín „chronická lymfatická leukemie“ se používá pro širší skupinu nemocí, u nichž dochází k vyplavování lymfoidních buněčných forem, vzhledu malých vyzrálých lymfocytů do periferní krve. Mimo B-CLL se sem řadí T-CLL, B- a T-prolymfocytární leukemie, splenický lymfom s vilózními lymfocyty a CLL s velkými granulárními lymfocyty.

Příčina: Příčina onemocnění není známa. Popisuje se častější výskyt onemocnění tam, kde se pracovalo s azbestem, u pracovníků v zemědělství a tam, kde osoby byly vystaveny působení silných elektromagnetických polí.

➤ Incidence B-CLL není na rozdíl od ostatních typů leukemií zvýšena u lidí vystavených expozici radioaktivního záření nebo vlivu alkylačních cytostik. Rovněž nebyla prokázána souvislost s imunodeficiencí nebo s infekcí nějakým typem onkogenního viru.

Podstatou onemocnění je proliferace klonálních, maligně transformovaných vyzrálých B-lymfocytů s charakteristickým imunofenotypem. Porucha nespočívá jen v nekontrolovatelné klonální proliferaci, ale také v narušené apoptóze těchto lymfoidních buněk. Tyto patologické buňky mají dlouhou životnost, nízkou proliferativní kapacitu a jsou imunologicky dysfunkční. **Zmnožení nádorové masy zde není vyvoláno zvýšenou proliferací B buněk, ale jejich neschopností vstoupit do apoptózy**, která za fyziologických podmínek udržuje počet buněk v rovnováze (Catovsky, 1996).

➤ V patogenezi onemocnění se uplatňuje gen *bcl-2*. K jeho expresi dochází jiným mechanismem než u folikulárních lymfomů. Výsledkem exprese genu *bcl-2* je inhibice apoptické smrti patologických lymfocytů.

Asi polovina případů B-CLL má původ v paměťových B buňkách, které po kontaktu s antigenem prošly germinálním centrem, kdežto druhá polovina pochází z naivních B buněk.

➤ Prognóza prvního typu B-CLL je příznivá, kdežto u druhého typu choroba velmi rychle progreduje.

V roce 1996 Caligaris a Capio určili tři abnormity charakteristické pro B-CLL:

- CD5+: B-CLL buňky **exprimují malá množství povrchových imunoglobulinů**.
- CLL buňky se hromadí v **G0 fázi** buněčného cyklu.
- **Patogenní autoprotilátky** často pozorované u pacientů s B-CLL jsou polyklonální.

Klasifikace onemocnění

Pro zhodnocení stupně pokročilosti choroby a velikosti masy maligních buněk se používají kritéria podle Raie (Raie a spol., 1977) a Bineta (Binet a spol., 1977). Kritéria podle Raie klasifikují nemocné do 5 skupin (O, I – IV) a kategorizace podle Bineta rozlišuje u nemocných stadia A,B,C.

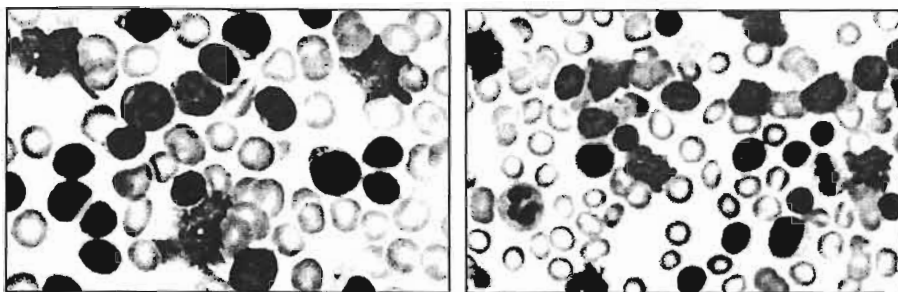
Klinická stadia CLL – upravená klasifikace podle Raie:

- **s nízkým rizikem** – lymfocytoza v krvi a kostní dřeni
- **se středním rizikem** – lymfocytoza v krvi a kostní dřeni + zvětšené uzliny, lymfocytoza v krvi a kostní dřeni + slezina nebo játra (uzliny +, či –)
- **s vysokým rizikem** – lymfocytoza v krvi a kostní dřeni + anémie (Hb < 110 g/l), lymfocytoza v krvi a kostní dřeni + trombocytopenie (destičky < 100.10⁹/l)

Laboratorní nález

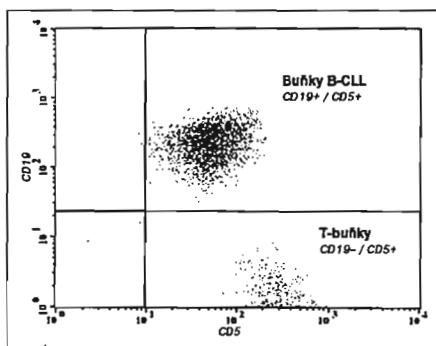
Kritéria k určení diagnózy B-CLL zahrnují **absolutní lymfocytozu (více než 5 . 10⁹/l) v periferní krvi a kostní dřeni nad 30 % spolu s charakteristickým imunogenotypickým obrazem monoklonálních lymfocytů**. Lymfocytoza v obvodové krvi a ve dřeni musí být zachycena opakovaně při několika po sobě následujících vyšetřeních.

- **KO:** lymfocytoza, snížení absolutního počtu neutrofilů, může být anémie a trombocytopenie (buď v důsledku potlačení krvetvorby nadprodukcí maligních forem nebo stav vyvolají autoimunitní mechanismy).
- **Původně vyžadovaná limitní hodnota absolutního počtu lymfocytů byla 15 . 10⁹/l, ale na doporučení National Cancer Institutes Working Group a International Workshop on CLL byla snížena na 5 . 10⁹/l.**
- **Krevní nátěr:** nález malých vyzrálých lymfocytů s hutným jaderným chromatiem, četné Gumprechtovy (jaderné) stíny.



Nález u CLL (nátěr periferní krve)

- **Kostní dřeň:** hypercelulární nebo normocelulární s infiltrací více než 30 % lymfocytů.
- **Samotná punkce kostní dřeně** svým způsobem dnes ztratila na významu při diagnóze B-CLL. Vhodnější je vyšetření trepanobiopsie kostní dřeně. Toto je důležité nikoliv pro diagnózu, ale spíše pro prognózu (dle typu infiltrace kostní dřeně lze částečně soudit na další průběh – nodulární infiltrace kostní dřeně většinou znamená pro pacienta lepší prognózu než infiltrace difúzní).
- **Imunofenotypizace:** Užitečnou metodou v diagnostice CLL se ukázalo stanovení imunofenotypu lymfocytární populace. Za tímto účelem je prováděna analýza periferní krve, či aspirátu kostní dřeně na **průtokovém cytometru** (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorter). Vzhledem k poměrně vysoké citlivosti tohoto vyšetření lze CLL diagnostikovat z periferní krve ještě v době, kdy je lymfocytóza jediným projevem počínající choroby.
- **ZÁKLADNÍ IMUNOFENOTYP „TYPICKÉ“ B-CLL BY SE DAL ZAPSAT TAKTO:** CD19+, CD5+, CD23+, CD20 slabě+, CD22 nebo slabě+, FMC7 nebo slabě+, slabá pozitivita povrchového Ig s jedním typem lehkých řetězců (kappa nebo lambda). Kromě typické B-CLL s téměř stoprocentní expresí znaků CD5 a CD23 existují „atypické“ formy, u kterých klesá procento positivity uvedených dvou znaků a často se zároveň zesiluje pozitivita s Ig a FMC7. Asi osm procent chronických lymfadenóz je negativních na znak CD5, tzv. CD5-B-CLL (DiGuiseppe, 1998).
- **Cytogenetika:** U B-CLL bývají pozorovány četné cytogenetické změny, ale žádné z nich nebývají u více než 20 až 25 procent pacientů. Vzhledem k této nižší



Záznam z průtokového cytometru

četnosti pozitivních nálezů a vzhledem k menší dosažitelnosti není v rutinní cytogenetické vyšetření k samostatnému určení diagnózy nezbytné a není ani vyžadáno.

- **Mutace IgH genů a vznik mutované formy p53 je sdružen s lepší prognózou.** Některé změny (13q- a +12q) ukazují u nemocného na dobrou prognózu, kdežto změny 17q- a 11q- ukazují na podstatně agresivnější průběh onemocnění s horší prognózou (Döhner a spol., 2000).
- **Ostatní:** hypogamaglobulinemie (zejména snížení IgG až na hodnoty pod 5 g/l), deficit T-buněčné imunity (funkce všech T-lymfocytů je narušena), snížená aktivita NK-buněk.
- **Maligní buňky B-CLL produkují cytokin TGF-β (Tumor growth factor β), který inhibuje proliferaci normálních lymfocytů.** Maligní buňky nejsou schopny se transformovat v plazmocyty a tím dochází ke snížení frakce imunoglobulinů. Nedostatek imunoglobulinů má vliv i na změnu sedimentační rychlosti erytrocytů (FW).
- **T-chronická lymfatická leukemie vlastně neexistuje, je to název pro skupinu post-tymických T-lymfoproliferativních nemocí, do kterých se zahrnuje (leukemie z velkých granulárních lymfocytů, T-prolymfatická leukemie, HTLV1 T-buněčná leukemie dospělých a Sézaryho syndrom (Adam a Vorlíček 2001).**

4.4.3. Prolymfocytová leukemie

Prolymfocytová leukemie byla jako samostatná diagnostická jednotka poprvé popsána v r. 1974 Galtonem (Galton, 1974).

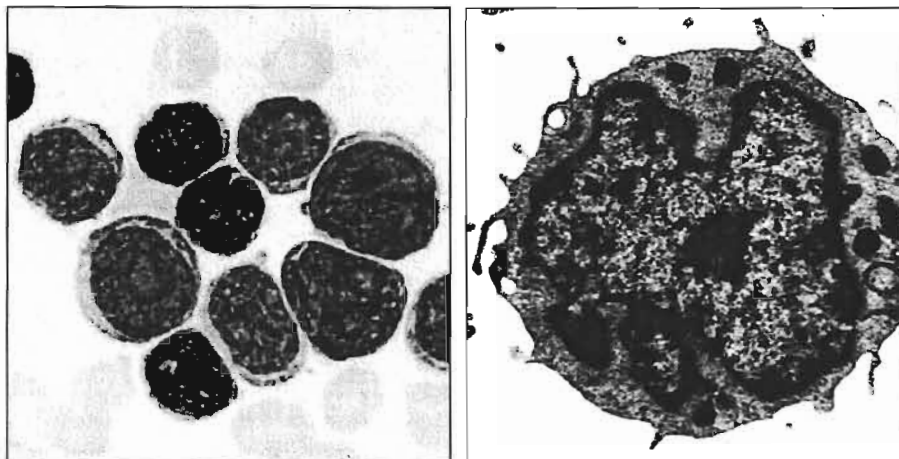
Prolymfocytární leukemie se řadí mezi skupinu lymfoproliferativních onemocnění. Je poměrně dobře odlišitelná od B-CLL.

Laboratorní nález

- **KO:** výrazná leukocytoza (často > 100 . 10⁹/l, někdy až 500 . 10⁹/l), anémie a trombocytopenie (v době stanovení diagnózy asi u 50 % případů).
- **Krevní nátěr:** jsou přítomny typické velké **prolymfocytární buňky** s velkým centrálně uloženým jádrem a výrazným centrálním jadérkem. Jsou dvakrát větší než malý lymfocyt s kondenzovaným chromatinem. Buňku obklopuje menší podíl negranulární bledé cytoplazmy. Asi z 80 % pocházejí tyto buňky z B řady, 20 % z T - řady. Maligní buňky tvoří více než 55 % všech jaderných buněk.
- **Kostní dřeň:** difúzní infiltrace prolymfocyty
- **Cytogenetika:** časté chromozomální aberace (11;14) (q13;q32), zjišťuje se mutace genu p53.
- **Imunofenotypizace:** Buňky prolymfocytové leukemie mají na svém povrchu

společné B lymfocytární znaky (CD19, CD20, CD24, CD37) a obvykle exprimují CD22 a FMC7. Na rozdíl od B-CLL neexprimují CD23 a u většiny nebývá přítomen ani CD5.

- **Histologie:** výrazná infiltrace prolymfocyty ve slezině a v játrech.



Buňky prolymfocytové leukemie – velké jádro

4.4.4. Vlasatobuněčná leukemie

(Hairy Cell Leukaemia – HCL, Trichocelulární leukemie)

Choroba byla poprvé popsána r. 1923 Ewaldem. Jako samostatná nosologická jednotka byla vyčleněna v roce 1958 Bertou Bouronclovou pod názvem leukemická retikuloendotelióza (Bouroncle, 1958). Název leukemie s vlasatými buňkami byl použit až v r. 1966 Schrekem a Donellym (Schrek a Donelly, 1966).

- Český název „vlasatobuněčná“ leukemie vznikl překladem z angličtiny, kde přídatné jméno „hairy“ má dva významy vlasatý a chlupatý od slova „hair“ = vlasy, chlupy. Zůstává tedy otázkou, jak správně do češtiny přeložit anglické spojení „Hairy cell leukemia“ (Chrobák, 1999).

U vlasatobuněčné leukemie vychází patologické lymfoidní buňky z vývojové linie B-lymfocytů. Jde o chronické lymfoproliferativní onemocnění klonálního charakteru s pozvolným nástupem. Název je odvozen od patologicky změněných lymfoidních buněk o průměru 10–25 µm, které mají na celém povrchu vilózní výběžky, které se stávají jasně viditelnými až



Lymfoidní buňky s vilózními výběžky

v elektronovém mikroskopu. Buňky postupně zaplňují kostní dřeň, slezinu a játra. Ve dřeni vzniká fibróza (Chrobák 1999).

- **Původ buněk u HCL** nebyl po delší dobu jasný. Bouronclova soudila, že onemocnění je způsobeno proliferací retikulárních buněk. V 70. a 80. letech minulého století se buňkám přisuzoval monocytárně-fagocytární původ. Současné genetické studie prokázaly klonální B-lymfocytární původ patologických buněk (Chrobák 1999).

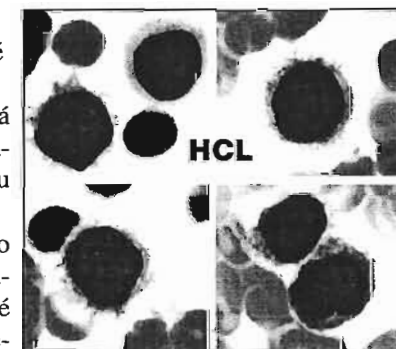
Příčina: není známa. Ukazuje se, že buňky u HCL jsou odvozeny od klonální expanze buněk na pozdějším stadiu vývoje než buňky B-CLL a prolymfocytární leukemie. Patologické buňky vlasatobuněčné leukemie produkují četné cytokiny, jež jsou zřejmě hlavní příčinou pancytopenie. Maligními buňkami produkován TNFα má významný podíl na potlačení normální krvetvorby. Na potlačení krvetvorby se značnou měrou podílí i infiltrace dřene maligními buňkami. Na druhé straně nejsou maligní buňky schopny syntetizovat cytokiny, které krvetvorbu stimulují.

Laboratorní nález

- **KO:** pancytopenie
- **Krevní nátěr:** leukopenie, nález leukemických buněk s vilózními výběžky.

Morfologie lymfoidní buňky HCL

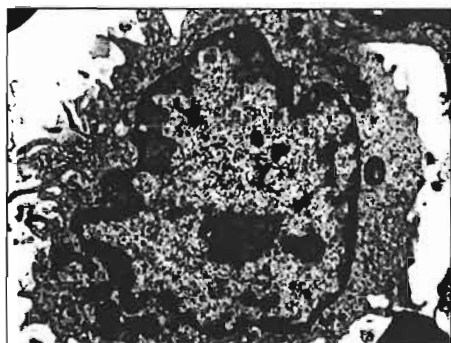
- **Průměr:** 10–18 µm
- **Jádro:** kulaté, oválné někdy dvoulaločnaté
- **Chromatin jádra:** jemný
- **Cytoplazma:** slabě bazofilní, šedavěmodrá jemně skvrnitá, neostře ohraničená, bez granulace s vilózními výběžky podoby vlásku nebo chlupu.
- **Kostní dřeň:** získává se obtížně, často suchá punkce (fibróza). Je infiltrována patologickými lymfoidními buňkami, které produkují fibronectin a stimulují tvorbu retikulinových vláken (Žák, 2006).
- **Histologie:** dřeň bohatá, zaplněná leukemickými buňkami s patrným projasněním kolem buněk a častou fibrozou dřene. Histologicky se zjišťují patologické buňky i ve slezině.
- **Elektronová mikroskopie:** Jsou přítomny ribosomálně-lamelární komplexy.



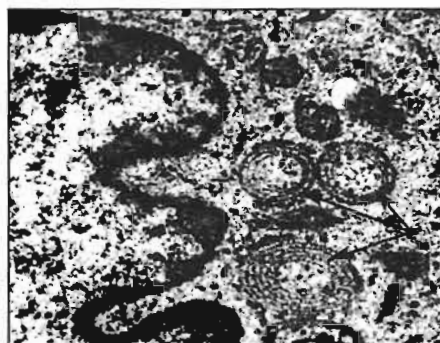
Leukemické buňky u vlasatobuněčné leukemie

- **Ribosomálně-lamelární komplexy** byly poprvé popsány Katayamou a spol. v r. 1972. Jejich funkce v buňce není známa. Vyskytují se přibližně u 50 % ne-

mocných s HCL. V menší míře se vyskytují i u jiných onemocnění. Jejich zvýšený výskyt má určitou diagnostickou hodnotu (Chrobák 1999).

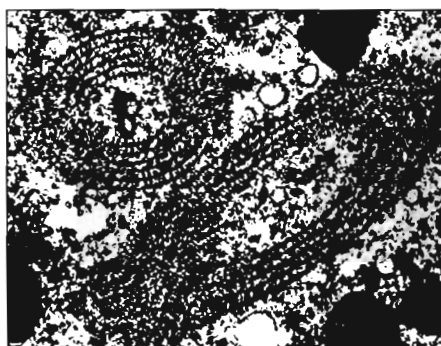


Ultratenký řez leukemickou buňkou



Ribosomálně-lamelární komplexy

- **Fázový kontrast:** na buňkách cytoplazmatické výběžky, jádra lehce excentricky uložena.
- **Cytochemie:** pozitivní kyselá fosfatáza rezistentní na tartarát
- **Fenotypizace:** u většiny případů vykazuje příslušnost k vývojové řadě B-buněk.



Ribosomálně-lamelární komplexy – elektron. snímek (zvětšení 20 000krát)

Literatura

ADAM, Z., VORLÍČEK, J. *Hematologie II. Přehled hematologických maligních nemocí*. Praha: Grada, 2001. 677 s.

BASARA, N., MARKOVÁ, J., SCHMETZER, B., et al. Chronic eosinophilic leukemia: Successful treatment with an unrelated bone marrow transplantation. *Leukemia Lymphoma*, 1998, roč. 32, s. 189–193.

BINET, J. L., LEPRIER, M., DIGHERO, G., et al. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 1977, roč. 40, s. 855–864.

BOURONCLE, B. A., WISEMAN, B. K., DOAN, C. A. Leukemic reticuloendotheliosis. *Blood*, 1958, roč. 13, s. 609–630.

CATOVSKY, G. Current approach to the biology and treatment of chronic lymphoid malignancies other than CLL. *Hematol. Cell. Ther.*, 1996, roč. 38, s. 63–66.

DIGUISEPPE, J. A. Clinical utility of flow cytometry in chronic lymphoid leukemias. *Semin. Oncol.*, 1998, roč. 25, č. 1, s. 6–10.

DÖHNER, H., STILGENBAUERM, S., BANNER, A., et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *New Engl. J. Med.*, 2000, roč. 343, s. 1910–1913.

DRUKER, B. J., SAWYERS, C. H., KANTARJIAN, M. Activity of specific inhibitor of the BCR. ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *New Engl. J. Med.*, 2001, roč. 344, č. 14, s. 1038–1042.

GALTON, D. A. G., GOLDMAN, J. M., WILTSHAW, E., et al. Prolymphocytic leukaemia. *Brit. J. Haematol.*, 1974, roč. 27, s. 7–23.

CHROBÁK, L. *Leukemie s vlasatými buňkami*. Praha: Galén, 1999. 104 s.

NOWELL, P. C., HUNGERFORD, D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1960a, roč. 25, s. 85.

NOWELL, P. C., HUNGERFORD, D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 1960b, roč. 132, s. 1497.

RAI, K. R., SAWITSKY, A., CRONKITE, E. R., et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1977, roč. 46, s. 219–234.

ROWLEY, Y. D. A new consistent abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinidine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 1973, roč. 243, s. 290–293.

SAWYERS, C. L. Chronic myeloid leukemia. *New Engl. J. Med.*, 1999, roč. 340, s. 1330–1338.

SCHREK, R., DONNELLY, W. J. „Hairy“ cell in blood in lymphoreticular neoplastic disease and „flagellated“ cells of normal lymph nodes. *Blood*, 1966, roč. 27, s. 199–211.

ŽÁK, P. *Vlasatobuněčná leukemie a přínos 2-chlorodeoxyadenosinu v léčbě*. Nukleus Hk 2006, Hradec Králové, stran 110.

4.5. Lymfoproliferativní choroby

Lymfoproliferativní choroby zahrnují **všechny formy chorobných proliferací lymfoidních buněk**, od stadia lymfoidní kmenové buňky, přes vývojové řady B- a T-lymfocytů až po plazmocyt v řadě B- nebo zralý T-lymfocyt v řadě T. Lymfocyty, jako buňky imunitního systému jsou funkčně heterogenní a mohou být přítomny prakticky ve všech tkáních a orgánech. Proto u těchto stavů je postiženo většinou více orgánů.

Skupina chorob řazených do kategorie **maligní lymfomy** vyniká mnohotvárností biologického průběhu a odlišností léčebných postupů u jednotlivých nozologických jednotek. Lze konstatovat, že jediné, co mají všechny maligní lymfoproliferativní choroby společné, je jejich vznik z lymfoidní tkáně a tedy i přítomnost receptorů pro kortikosteroidy, jejichž stimulace může iniciovat, podobně jako u fyziologických lymfatických buněk, v části buněk apoptotickou smrt (Müller-Herme-link, 1997).

➤ **Lymfom** = *maligní nádor lymfoidní tkáně, nejčastěji lymfatických uzlin*

Agresivní typy lymfomů jsou schopny zahubit svého neléčeného nositele řádově v týdnech či měsících, zatímco pacienti s nízkou maligními lymfomy mohou bez léčby žít roky, někdy více než 10 let. Některé typy lymfomů (lymfocytární a folikulární lymfomy) mají tendenci k rychlému šíření po celém organismu, jiné naopak po dlouhou dobu proliferují jen v jednom místě a diseminují až po dlouhém čase lokálního růstu (např. lymfomy žaludku). Proto klasifikace maligních lymfoproliferativních chorob představovala a představuje pro kliniku i patologii velký problém (Lennert a spol., 1975).

➤ *Některé klinické jednotky byly popsány již na sklonku minulého století. Nej přesněji byla charakterizována Hodgkinova choroba, kdežto ostatní lymfoproliferace snad s výjimkou chronické lymfatické leukemie se delší dobu nedařilo jednoznačně identifikovat. Tyto stavy byly zpočátku kategorizovány do dvou podskupin, jako lymfosarkomy nebo retelosarkomy (retikulosarkomy).*

LYMFOMY (I JINÉ NÁDORY) DNES MŮŽEME S URČITOU NADSÁZKOU POVAŽOVAT ZA ZÍSKANOU GENETICKOU PORUCHU, KTERÁ VZNIKÁ ZTRÁTOU, POŠKOZENÍM NEBO CHYBNOU REGULACÍ GENŮ ODPOVĚDNÝCH ZA BUNĚČNÝ RŮST A VÝVOJ. PROCES VZNIKU LYMFOMU CHÁPEME Z TOHOTO POHLEDU JAKO VÍCESTUPŇOVÝ DĚJ – CHOROBA SE ROZVÍJÍ POSTUPNĚ, „STRÁDÁ GENETICKÉ ZMĚNY“.

KLASIFIKACE LYMFOPROLIFERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ

Vývoj klasifikací maligních lymfoproliferativních nemocí těsně následuje vývoj poznání fyziologické lymfatické tkáně. Historicky se maligní lymfomy dělí na

Hodgkinův lymfom a dále skupinu definovanou per exclusionem (nejsou přítomny Hodgkinovy a Sternberga-Reedové buňky) – *nehodgkinské lymfomy*. Skupina Hodgkinova lymfomu má relativně ustálené názvosloví, opak platí pro nehodgkinské lymfomy (Sander a spol., 1997).

Klasifikace Rappaportova, Lukese a Collinse

Rappaport publikoval svoji klasifikaci lymfomů v padesátých letech minulého století, v době, kdy se vědělo jen málo o funkci lymfatické tkáně, a proto jeho klasifikace byla založena čistě na **morfologii**. Klasifikace rozlišovala lymfomy z malých, středních či velkých buněk a navíc se přidávalo adjektivum difúzní a folikulární lymfom.

V sedmdesátých letech Lukes a Collins navrhli **imunologicky charakterizovanou klasifikaci** (dělení na T- a B-lymfomy) a také zavedli morfologický pojem *cleaved* a *noncleaved* (lymfocyty s rozštěpeným a nerozštěpeným jádrem).

Kielská klasifikace

V této imunologicky orientované klasifikaci, kterou navrhl Lukes a Collins, pokračoval Lennert se spoluautory z německého města Kielu. Kielská klasifikace vycházela z nových poznatků **fyziologie lymfocytů** a sice, že každá maligní jednotka se odvíjí od určitého typu a diferenciačního stadia fyziologického lymfocytu a může být definována morfologicky a imunologicky. Od názvu výchozí fyziologické buňky je odvozen název příslušného lymfomu.

Klasifikace „Working Formulation“

Na Rappaportovu terminologii navázala v roce 1982 americká klasifikace nazvaná „*Working Formulation for Clinical Use*“, do češtiny překládaná jako „pracovní formulace“. Klasifikace „Working Formulation“ je založená na původní **Rappaportově klasifikaci s upravenou terminologií Lukese a Collinse**. Názvy jednotlivých jednotek vychází z velikosti buněk (malé, velké, smíšená populace), z jejich růstu (folikulární a difúzní) a z tvaru jádra (naštěpené, nenaštěpené), nejsou zde rozlišeny T- a B-lymfomy.

Klasifikace „REAL“

V roce 1993 byla vytvořena skupinou evropských a amerických patologů *International Lymphoma Study Group* nová klasifikace, která se nazývá *A Revise European-American Classification of Lymphoid Neoplasms* – REAL. Klasifikace REAL vychází ze stejné teorie jako Kielská a přidává další kritéria. **Mimo morfologických kritérií to jsou kritéria imunologická, topografická, cytogenetická a také kritérium klinické manifestace a průběhu.**

REAL klasifikace dělí lymfomy na *Hodgkinovy lymfomy* a skupinu *nehodgkinských lymfomů*, která se dělí na lymfomy vycházející z „B“, z „T“ a „NK“ lymfatické řady. Obě skupiny nehodgkinských lymfomů se dále rozčleňují na lymfomy

vycházející z prekurzorů B- a T- řady a lymfomy vycházející z periferních funkčních lymfocytů. Pro každou jednotku jsou popsány příslušné morfologické, biologické a klinické charakteristiky.

WHO klasifikace

Klasifikace vychází ze stejných principů jako REAL klasifikace: „jednotlivá nologická jednotka je optimálně definována kombinací morfologických znaků, imunofenotypu, cytogenetických znaků, klinických projevů i průběhu a její klasifikace by se měla odvíjet od fyziologického protějšku maligních buněk, pokud je to možné.

U lymfoproliferativních nemocí rozlišujeme:

- ❑ **Hodgkinův lymfom** (Hodgkinova choroba)
- ❑ **Nehodgkinské lymfomy** (NHL)

4.5.1. Hodgkinova nemoc

(Hodgkinův lymfom, Morbus Hodgkin)

Roku 1832 popsal anglický patolog Thomas Hodgkin ve své práci „On Some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen“ poprvé zvětšení uzlin, které se vyskytuje spolu se zvětšením sleziny. Na přelomu století zjistili rakouský patolog Carl Sternberg (1898) a americká patoložka Dorothy Reedová (1902) v uzlinách nemocných charakteristické buňky (Sternberga-Reedové buňky). Tento objev umožnil jistou a reprodukovatelnou diagnostiku, a tím odlišení onemocnění např. od tuberkulózy a syphilis. Malignita tohoto onemocnění byla prokázána teprve ke konci minulého století (Kaplan, 1980).



Thomas Hodgkin

Hodgkinova nemoc je systémové nádorové onemocnění, které spojuje zajímavým způsobem příznaky zánětlivé reakce s příznaky neoplazie (Wolf, 1995). Jde o onemocnění lymfatické tkáně (převážně postihující lymfatické uzliny, ale i jiné orgány s lymforetikulární tkání). V uzlinách se nachází buňky Sternberga-Reedové. Maligní buňky se šíří z původní lymfatické uzliny přes přilehlé lymfatické cesty do ostatní lymfatické tkáně přímým tokem s možností přestupu do krevního řečiště. U Hodgkinovy nemoci jsou nádorovou populací Sternberga-Reedové buňky (HRSb), jejichž méně vyzrálými prekurzory jsou tzv. Hodgkinovy buňky. Další, často znač-

ná, buněčná přítomnost, představovaná především lymfocyty, je reaktivní povahy (Marková, 1997).

Teprve průkaz přestavby genu pro imunoglobuliny (Ig) molekulárně biologickými metodami jednoznačně potvrdil, že patologické buňky se **diferencují z postgerminálních B-buněk**.

- *Pomocí PCR byla prokázána u části případů monoklonalita a B-lymfocytární původ buněk Sternberga-Reedové. Průkaz aktivovaných T-lymfocytů, jako převládající buněčné populace v postižené lymfatické tkáni znamenají výraznou, dokonce ale nedostatečnou T-buněčnou reakci proti ještě nezjištěnému (virovému) antigenu exprimovanému buňkami Sternberga-Reedové.*

Jedná se o pre-apoptické buňky zárodečného centra lymfatického folikulu, které nejsou určeny k další diferenciaci a proliferaci a za fyziologických podmínek podléhají apoptóze. U Hodgkinových buněk dochází ke změnám, které je činí rezistentními k signálům vedoucím k apoptóze (Adam a Vorlíček, 2001).

- *Mechanismy, které chrání Hodgkinovy a Sternberga-Reedové buňky před apoptózou, nejsou zatím jasné. Mohlo by jít o expresi inhibitoru apoptózy c-FLIP nebo o ovlivnění tyrosinkinázových receptorů. Tyto buňky mají obecně sníženou hladinu mRNA pro znaky B-lymfoidní linie.*

Buňky Sternberga-Reedové produkují řadu faktorů, které vyvolávají neobvyklou reakci organismu, která se projevuje nejen celkovými příznaky, ale i místní reakcí se vznikem hyperplazie uzlin a tvorbou typických zánětlivých infiltrátů v tkáních, které byly nemocí postiženy.

Příčina: Původ onemocnění není dosud zcela objasněn. Uvažuje se o genetické predispozici, připouští se i účast virů a eventuálně narušená imunita. U tohoto onemocnění dochází ke zmnožení různých forem nezralých lymfoblastů a lymfocytů, většinou z vývojové řady B-buněk, méně T-buněk. Morfologie maligních buněk je značně pestrá a fenotyp není pravidelný, ani specifický. Ve vysokém procentu u nemocných s Hodgkinovou chorobou je přítomen virus Epstein-Baarrové (EBV). Současné poznatky dovolují předkládat, že EBV infekce se uplatňuje v nádorové transformaci a proliferaci centrofolikulárních lymfocytů, mezi které se řadí i maligní lymfogranulom.

- *Hodgkinova choroba se častěji vyskytuje u některých fenotypů HLA systému a je u ní až 30 % pozitivita protilátek proti EBV – antigenu virové kapsidy (VCA). S použitím metod molekulární biologie je prokazován genom EBV v 50–70 % případů. Z komponent EB viru jsou to především antigeny jádra (EBVNA1) a latentní membránové proteiny především (LMP 1,2).*

Klasifikace M. Hodgkin

V oblasti subklasifikace Hodgkinovy nemoci nedošlo k žádným výrazným změnám. Nová WHO klasifikace prakticky převzala Kielskou klasifikaci. Četnost buněk

HSRb a stupeň celulární reakce se staly základem pro histologické třídění Hodgkinovy nemoci.

Histologické třídění

- ☐ **I. typ:** bohatý na lymfocyty
- ☐ **II. typ:** nodulárně sklerotický
- ☐ **III. typ:** smíšeně buněčný
- ☐ **IV. typ:** chudý na lymfocyty
- ☐ **V. typ:** neklasifikovatelný

K určení histologického typu onemocnění se provádí histologické a imunohistochemické hodnocení biptického preparátu. Cytologická diagnostika není k určení diagnózy zásadní.

Klinické třídění (*Ann Arbor Staging System*)

Rozsah nemoci je stále určován podle **modifikované Ann Arbor klasifikace**, která je založena na určení počtu postižených oblastí a jejich vztahu k bránici a existenci orgánového postižení. Rozsah uzlinového postižení má význam pro terapeutický postup a vyjadřuje se čtyřmi klinickými stadii.

- **Stadium I:** postižení jedné skupiny lymfatických uzlin (*označení:* I) nebo jednoho extralymfatického orgánu případně místa (*označení:* I E)
- **Stadium II:** postižení dvou nebo více skupin lymfatických uzlin na téže straně bránice (*označení:* II) nebo lokalizované postižení extralymfatického orgánu nebo místa a jedné nebo více skupin lymfatických uzlin na téže straně bránice
- **Stadium III:** postižení skupin lymfatických uzlin na obou stranách bránice (*označení:* III), které může být provázeno lokalizovaným postižením extralymfatického orgánu nebo místa (*označení:* III E), nebo postižení sleziny (*označení:* III S) nebo obou (*označení:* III ES)
- **Stadium IV:** difúzní nebo diseminované postižení jednoho nebo více extralymfatických orgánů nebo tkání, případně bez současného zvětšení uzlin

Každé stadium se ještě dělí na **kategorii A a B**. Označení **A** znamená chybění, **B** přítomnost symptomů (horečky neinfekčního původu s teplotami nad 38 °C, profúzní noční pocení, hmotnostní úbytek > 10 % tělesné hmotnosti v posledním půl roce).

➤ *Tato klasifikace je některými pracovními skupinami různě modifikována podle rizikových a prognostických faktorů.*

Laboratorní nález

- **KO:** mikrocytová nebo normocytární hypochromní anémie charakteru anémie chronických onemocnění, mírná trombocytoza, normální nebo mírná leukocytoza (u pokročilejších stadií).
- **Krevní nátěr:** lymfopenie (u pokročilejších stavů), eozinofilie

- **Histologie:** určí diagnózu onemocnění – nachází se obrovské buňky Sternberga-Reedové, eventuálně i buňky Hodgkinovy.
- **FW:** výrazně zvýšené hodnoty (sleduje aktivitu choroby)
- **Imunologická vyšetření:** funkční defekty T-buňkami zprostředkované imunity
- **Ostatní:** zvýšená CRP (mapuje aktivitu choroby)

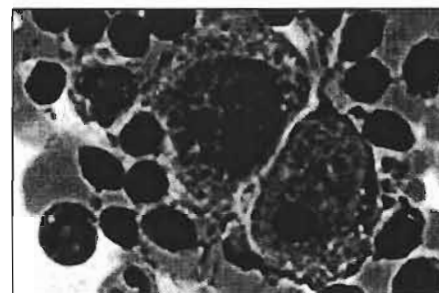
Buněčná populace u Hodgkinovy nemoci

Hodgkinovy buňky bez ohledu na to jak a kde se vyskytují se pohybují jak lymfatickými, tak krevními cestami a přednostně se usídlují a rostou v lymfatické tkáni. Maligní buněčná populace je různorodá, buňky Sternberga-Reedové představují jen její malou část. Morfologicky změněné lymfoidní buňky u M. Hodgkin tvoří nejvýše 0.1–3 % celkové buněčné populace ze vzorku lymfatické tkáně. Jsou obklopeny reaktivními lymfocyty, histiocyty, fibroblasty, plazmatickými buňkami a eozinofily (*Marková, 1997*). Tyto tzv. doprovodné buňky tvoří většinu proliferujících buněk u Hodgkinova lymfomu.

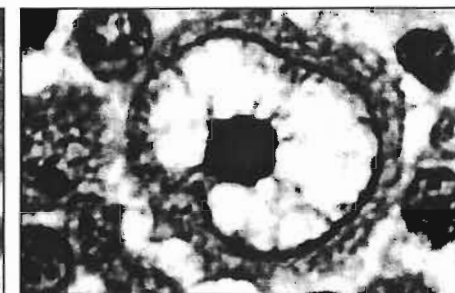
Hodgkinovy buňky

Hodgkinovy buňky jsou vlastně prekurzory buněk Sternberga-Reedové. Jsou to velké buňky s kulatým nebo lehce vkleslým jádrem.

- **Chromatin jádra:** jemný nevýrazně se barví
- **Cytoplazma:** hojná, nezrnitá, bleděmodrá či zřetelně bazofilní s vakuolami, jemná většinou bohatá, barvitelná bledě.



Hodgkinovy buňky – periferní krev



Hodgkinovy buňky – histologický preparát

Buňky Sternberga-Reedové

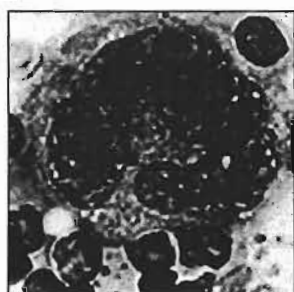
Jejich morfologie je různorodá a jsou různého typu, většinou se dvěma (uloženy zrcadlově) nebo i více laločnatými jádry (uloženy řetězkovitě).

- **Průměr:** 25–60 μm
- **Jádra:** nápadně velká a světlá s hrubým rozptýleným chromatinem. V jeho okách jsou patrná bělavá vyjasnění. V každém jádře většinou v jeho středu je velké sférické jadérko.

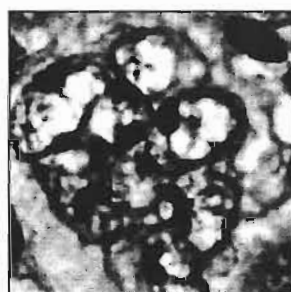
- **Chromatin jádra:** řídký, síťovitě uspořádaný, růžovofialové barvy
- **Cytoplazma:** jemná většinou bohatá, barvitelná bledě šedomodře. Má neostrou kresbu a obsahuje vakuoly.



Vícejaderná buňka
Sternberga-Reedové –
periferní krev



Laločnaté jádro buňky
Sternberga-Reedové –
periferní krev



Buňka
Sternberga-Reedové –
histologický preparát

4.5.2. Nehodgkinovské lymfomy (NHL)

Nehodgkinovské lymfomy tvoří značně heterogenní skupinu lymfoproliferativních nemocí různorodého biologického chování a s odlišnou odpovědí na léčbu. Odlišují se od Hodgkinovy nemoci nejen svým klinickým průběhem, ale i biologickým chováním a histopatogenickým původem (Brice a spol., 1997).

Onemocnění vzniká **malignt transformací (nádorovou přeměnou) buněk lymfoidních tkání na kterékoliv úrovni buněčného vývoje**, počínaje kmenovou lymfoidní buňkou až po zralá vývojová stadia B- a T-lymfocytární řady, ojediněle NK buněk. Transformovaná buňka jeví klonální expanzi, přičemž si zachovává funkční i migrační charakteristiky svých normálních protějšků. **Zjednodušeně můžeme NHL popsat jako zhoubné nádory buněk imunitního systému** (Cavalli a Bernier, 1995).

Během vývoje nemoci proběhne v lymfatické buňce na nižším vývojovém (zárodečném) stupni prvotní genetická změna. V genech pro těžké řetězce imunoglobulinů (u B-nehodgkinovských lymfomů) nebo v genech pro T-buněčné receptory (u T-nehodgkinovských lymfomů) probíhají somatické mutace. Jeden z klonů je posléze antigenně zvýhodněn a klonálně expanduje. V něm se somatické mutace dále hromadí, klon se vyvíjí a mohou se v něm vyčlenit určité dílčí klony s agresivnějším chováním. Po čase proběhne další (přídavná) genetická změna, která zasáhne některý z důležitých onkogenů v buňce. Nádor výrazně změní své chování, bují a dále se šíří. V dalším průběhu, ať už vlivem přirozeného vývoje, či jakýmkoliv selekčním tlakem, se v lymfomových buňkách hromadí genetické změny, které mohou vyvolat histologickou přeměnu v nádor s průběhem klinicky velmi agresivním (Issacson, 1992).

- **Příčina:** není zcela jasná. Virový původ byl prokázán jen u některých lymfomů (Burkittův lymfom – EBV a T-lymfom dospělých – HTLV 1). Je pravděpodobný vztah mezi vznikem NHL a poruchami imunitních mechanismů.

Některé abnormality spojené se vznikem nebo vývojem nehodgkinovských lymfomů byly přesně rozpoznány a objasněny:

- Část z nich **narušuje nebo blokuje přirozenou (programovou) buněčnou smrt** – buňky, které neodumírají, se hromadí (nepodléhají apoptóze).
- Další **změny postihují geny regulující buněčný cyklus** – buňky se množí neustále, překotně a neregulovaně.

Soudí se, že v patogenezi NHL mají významnou úlohu:

- **molekulárně genetické změny** – bylo zjištěno, že u 90 % NHL s nízkou malignitou a u 30 % vysoce maligních NHL se nacházejí charakteristické chromozomální aberace (Magrath, 1990).

➤ Nejčastěji zjišťovanou změnou je translokace $t(14;18)$, při které je gen *bcl-2* přesunut z 18. chromozomu na 14. chromozom do blízkosti genu pro těžké řetězce imunoglobulinu. Dostává se tak pod vliv transkripčních „urychlovačů“ (enhancerů) sdružených s lokusem IgG. Jejich účinkem dochází k dysregulaci exprese genu *bcl-2*, kódujícího protein *bcl-2*. Tento protein inhibuje apoptózu patologického klonu lymfocytů, působící jejich akumulaci a snižuje citlivost k nejrůznějším podnětům indukujícím buněčnou smrt (včetně cytostatik). To vysvětluje, proč i při nízké proliferativní aktivitě postupně narůstá pool lymfomových buněk a proč u těchto NHL bývá omezená odpověď na chemoterapii. Nejde však o jedinou chromozomální změnu (The International, 1993). Další změny jsou charakteristické pro jiné typy NHL a mohou v praxi posloužit jak k přesnější identifikaci lymfomu, tak zejména k průkazu klonality a k určení zbytkové populace po terapii (např. translokace $t(11;14)$ u lymfomu z pláštěvých buněk).

- Nepochybný se zdá vztah NHL k **poruchám imunitních mechanismů (vrozená a získaná imunitní nedostatečnost)**, neboť pravděpodobnost vzniku lymfomu u imunodeficitních pacientů je výrazně zvýšena. Snad zde má význam aktivace onkogenních virů. Podobný účinek může mít i chronická imunostimulace a autoimunitní onemocnění.

- Na vzniku se mohou podílet i některé **cytoplazmatické viry** (EBV, HTLV a jiné).

➤ **Virový původ byl prokázán pouze u Burkittova lymfomu (EB – virus) a u T-lymfomu dospělých (HTLV-1).**

NHL se mohou vyskytovat i mimo lymfatickou tkáň, neboť normální lymfocyty jsou také přítomny v různých extralymfatických orgánech.

- Tyto extranodální NHL vznikají nejčastěji v trávicím traktu, v ORL oblasti, v mozku, ve štítné žláze, v měkkých tkáních, v kůži aj.

Podle biologického chování můžeme NHL rozdělit do dvou hlavních skupin:

- ❑ **Indolentní lymfomy** (s nízkým stupněm malignity)
- ❑ **Agresivní lymfomy** (s vysokým stupněm malignity)

Laboratorní nález

Laboratorní diagnostika onemocnění se dnes podle nového klasifikačního systému (REAL/WHO) opírá o histologický obraz postižené tkáně, o imunohistochemii, genetické a molekulárně genetické změny nádorové buňky a charakteristiku fyziologického protějšku nádorové buňky (Harris a spol., 1999).

- **Molekulárně genetické metody** mají v primární diagnostice maligních lymfomů dvě základní využití:
 - slouží k detekci **klonálních abnormit** v případě diferenciální diagnózy mezi reaktivní a nádorovou proliferací (Arber, 2000)
 - s jejich pomocí lze identifikovat **chromozomální změny**, jako např. nádorově specifické chromozomální translokace. Jejich detekce přináší užitek v diagnostice lymfomů (Arber, 2000).
- V praktické diagnostice NHL se stále více uplatňují metody na molekulární úrovni. Kromě základní diagnostiky lymfomů se osvědčují i **ve sledování úspěšnosti terapie a minimální reziduální nemoci (MRN)**. Pro detekci MRN má význam zejména sledování specifických translokací přítomných v původním nádoru, což je umožněno vysokou citlivostí PCR (Abdel-Reheim a spol., 1996), lze využít i FISH a Southern blotting.
- V posledních letech se dostávají v diagnostice do popředí metody genové analýzy, tzv. *gene profiling expression DNA microarraye*. Tyto metody odliší jinak morfologicky a fenotypově podobné jednotky NHL (např. u difuzního B-velkobuněčného lymfomu) na ty, které mají genovou expresi podobnou buňkám germinálního centra (GCB – germinal center B-like), nebo jsou genovou expresí podobné postgerminálním buňkám, které dostaly název ABC (activated B-cell like). Kromě tohoto nového molekulárně genetického prognostického modelu je studiem genotypu postupně odhalována etiopatogeneze vzniku NHL (Kinney a Kadin, 1999).

Klasifikace NHL

Klasifikace NHL je velmi komplikovaná, neboť existuje více než 40 definovaných typů NHL. Převážná většina NHL má původ v lymfocytech řady B (až 90 %), menší část vychází z řady T (asi 10 %). Nejčastějším typem je difuzní velkobuněčný B-lymfom (30–40%), následuje folikulární B-lymfom (20%), malobuněčný B-lymfom typu B-SLL, lymfom plášťové zóny (mantle cell lymphoma) (10–15%).

Pokud jde o stanovení příslušnosti k předpokládaným fyziologickým protějškům v diferenciální posloupnosti lymfocytů, doporučuje se (vzhledem k nejasnostem v této posloupnosti) dělení NHL pouze na skupinu **lymfomů prekurzorových** (méně diferencovaných) a **zralých** (tzv. periferních).

Klasifikace lymfoproliferativních stavů podle WHO

B-lymfoproliferativní onemocnění

- ❑ **Prekursorové**
 - akutní B-lymfoblastická leukemie/lymfoblastový lymfom
- ❑ **Periferní**
 - B-chronická lymfatická leukemie/lymfocytární lymfom
 - prolymfocytární leukemie
 - vlasatobuněčná leukemie
 - lymfom z plášťových buněk
 - folikulární lymfom, stupeň 1–3
 - difuzní B-velkobuněčný lymfom – mediastinální velkobuněčný (varianta)
 - difuzní B-velkobuněčný lymfom – primárně exsudativní (varianta)
 - difuzní B-velkobuněčný lymfom – intravazální lymfom (varianta)
 - Burkittův lymfom – Burkitt-like lymfoma
 - extranodální lymfom z marginální zóny B-MALT
 - nodální lymfom z marginální zóny B-buněk
 - splenický lymfom z buněk marginální zóny (± vilózní lymfocyty)
 - lymfoplazmocytární lymfom
 - myelom/plazmocytom

T-lymfoproliferativní onemocnění

- ❑ **Prekursorové**
 - akutní T-lymfoblastová leukemie/lymfoblastový lymfom
- ❑ **Periferní**
 - T-buněčná prolymfocytární leukemie
 - T-buněčná leukemie z granulárních buněk (LGL)
 - agresivní lymfom z NK-buněk
 - T-buněčný lymfom/leukemie dospělých (ATLL-HTLV1+)
 - T/NK nasální lymfom
 - T-lymfom spojený s enteropatií
 - hepatosplenický $\gamma\delta$ T-buněčný lymfom
 - T-lymfom podkožní podobný pannikulitidě
 - Mycosis fungoides/Sézaryho syndrom
 - anaplastický velkobuněčný lymfom, T/null, kožní
 - anaplastický velkobuněčný lymfom, T/null, systémový
 - periferní T-lymfom (jinak necharakterizovaný)
 - angioimunoblastický T-lymfom

I přes nově zavedené klasifikace NHL, které odstranily nepřesnosti vyplývající z nestejněho označování identických jednotek, může činit histopatologická diagnóza obtíž. Proto je u NHL bezpodmínečně nutné tzv. **druhé čtení**, tj. posouzení nálezu dvěma nezávislými hematopatologi z různých pracovišť. Definitivní závěr se stanoví s přihlédnutím k dalším výsledkům pomocných vyšetření a stanovení různých biologických markerů.

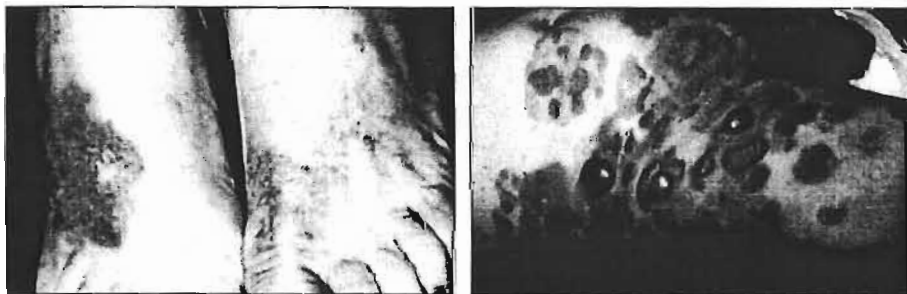
Nejčastěji se vyskytující typy NHL se vzájemně liší, morfologií, fenotypem, biologickým chováním i odpovědí na léčbu. V další části jsou popsána některá laboratorně zajímavá onemocnění, která jsou podle současné klasifikace řazena do WHO klasifikace lymfoproliferativních onemocnění.

- ☐ **Chronická lymfatická leukemie (CLL)** – probrána v kapitole chronické leukemie
- ☐ **Vlasatobuněčná leukemie** – probrána v kapitole chronické leukemie
- ☐ **Prolymfocytární leukemie** – probrána v kapitole chronické leukemie
- ☐ **Mycosis fungoides a Sézaryho syndrom**
- ☐ **Maligní histiocytoza**
- ☐ **Monoklonální gamapatie** – mnohočetný myelom, Waldenströмова makroglobulinemie, amyloidóza

Mycosis fungoides a Sézaryho syndrom

Mycosis fungoides byla poprvé popsána r. 1806 Alibertim. Sézaryho syndrom byl poprvé zmíněn r. 1938 Sézarym a Bouvraínem.

Mycosis fungoides je nízké maligní T-lymfom, u kterého se infiltrace poměrně dlouho omezuje pouze na kůži, kde se projevuje nespecifickými ekzémy, později většinou postihuje i lymfatické uzliny a jiné orgány (Adam a Vorlíček, 2001).



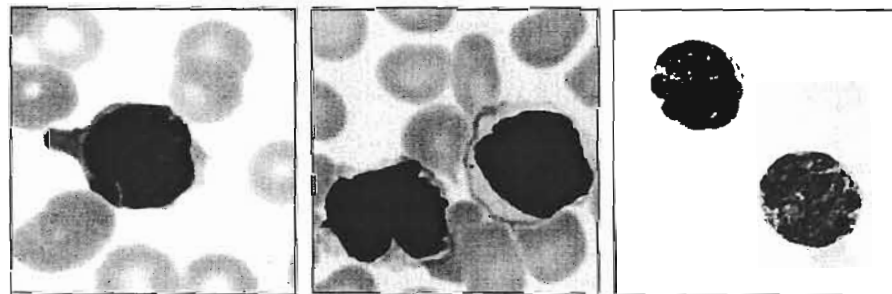
Generalizovaná erythrodermie (kožní výsevy a pigmentace na ploskách nohou – vlevo)

Sézaryho syndrom je leukemická varianta Mycosis fungoides. Obě onemocnění vychází z řady T-pomocných (helper) lymfocytů. Diagnóza se stanoví na základě histologického a imunohistologického vyšetření kůže (Kim a Hoppe, 1999).

Příčina: Choroba se odvozuje od maligní přeměny epidermotropních lymfocytů. Jde tedy o **patologickou proliferaci lymfoidních buněk z vývojové řady T-lymfocytů**. Nachází se T-lymfocyty s cerebriformním jádrem, které si i přes svou maligní transformaci po dlouhou dobu zachovávají svůj dermatotropismus. Sézaryho syndrom je leukemická a erythrodermická varianta kožního T-lymfomu.

Laboratorní nález

- **KO:** u 2/3 nemocných leukocytoza ($20 \cdot 10^9/l$)
- **Krevní nátěr:** nachází se buňky lymforetikulárního charakteru se zašitým jádrem. U Sézaryho syndromu se nachází v periferní krvi více než 5–10 % patologických cerebriformních lymfocytů.
- **Elektronový mikroskop:** v ultratenkých řezech se vyskytují buňky s charakteristickými cerebriformními jádry a různými typy nukleolů – Sézaryho-Lutznerovy buňky (Smetana a spol., 1997).



Sézaryho-Lutznerovy buňky (periferie)

Maligní histiocytoza

Maligní histiocytoza je neobvyklá, velmi agresivní a maligní lymfoproliferace. Končí většinou do 6 měsíců smrtí.

Je charakterizována **maligní proliferací cytologicky neoplastických histiocyty** v lymfatických orgánech a hematopoetických orgánech.

Maligní monocyto-histiocytární buňky mají vzhled nezralých buněk s bohatou bazofilní cytoplazmou, které vykazují při cytochemických reakcích a imunofenotypizačním vyšetření znaky histiocyty. Dále se vyskytují monocytoidní buňky s nukleoly a jemnou azurofilní granulací a makrofágy s bohatou pěnovitou a vakuolizovanou cytoplazmou, obsahující hlavně zbytky fagocytovaných erytrocytů, někdy leukocytů a trombocytů (Bucsky a Egeler, 1998).

Laboratorní nález

- **KO:** hemolytická anémie, leukopenie, trombocytopenie (destičky jsou zvýšeně fagocytovány ve slezině).
- **Krevní nátěr:** v 5–90 % se nachází se maligní monocyto-histiocytární buňky

- **Trepanobiopsie kostní dřeně:** pozitivní nález anaplastických histiocytů, přítomen syndrom hemofagocytozy.
- **Cytochemie:** zvýšena aktivita alkalické fosfatázy, silná pozitivita kyselé fosfatázy a přítomna pozitivita esteráz.
- **Imunofenotypizace:** monocyto-histiocytární buňky vykazují znaky CD11b, CD11c, CD14, CD36, CD68, MAC 387.
- **Cytogenetika:** chromozomální změny t(2;5).

4.5.3. Monoklonální gamapatie

Monoklonální gamapatie je termín laboratorní i klinický. V laboratorním smyslu tohoto slova rozumíme pod tímto pojmem patologickou přítomnost monoklonálního imunoglobulinu v séru nebo moči. V klinice se používá k označení nemoci do jejichž celkového obrazu patří přítomnost tohoto imunoglobulinu. Jen velmi vzácně se vyskytují tzv. nesecernující myelomy, kdy nelze v séru ani v moči současnými metodami paraprotein prokázat.

Monoklonální gamapatie jsou onemocnění, která jsou **charakterizována proliferací maligního B-buněčného lymfocytárního klonu**. Takto diferencované buňky tvoří monoklonální strukturně homogenní patologické monoklonální proteiny nebo jejich částí (M-komponenty, M-proteiny, monoklonální imunoglobulin, paraprotein), které lze zjistit v séru nebo moči (Greip, 1996). Jde tedy o onemocnění pro která je charakteristická kvalitativní nebo kvantitativní porucha syntézy imunoglobulinů.



Myelomová buňka

Monoklonální gamapatie jsou velmi heterogenní skupinou nemocí. Nejčastější a nejzávažnější monoklonální gamapatií je **mnohočetný myelom (MM)**, u kterého je produkce paraproteinu kvalitativně i kvantitativně nejvýznamnější.

- Při užití citlivých imunofluorescenčních metod lze monoklonální komponentu prokázat i u dalších lymfoproliferací, zvláště u některých typů ne Hodgkinových maligních lymfomů (NHL), resp. chronické lymfatické leukemie.

Příčina: monoklonální gamapatie vznikají maligní mutací buněk B lymfocytární řady. Pozměněný B lymfocyt získá určitý stupeň autonomie (znak malignity), charakteristický pro jednotlivé nemoci, proliferuje a vyzrává v buňky produkující monoklonální imunoglobulin – paraprotein (M-Ig).

- Monoklonální imunoglobulin (paraprotein) je imunoglobulin (nebo část mole-

kuly Ig), který je tvořen jednou třídou těžkých řetězců ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$) jednou podtřídou a jedním typem lehkých řetězců (κ, λ). Na elektroforéze v agarózovém gelu se monoklonální imunoglobulin projevuje jako homogenní úzká frakce lokalizovaná v oblasti γ až $\alpha 2$. Může být tvořen kompletním Ig nebo lehkými či těžkými Ig řetězci.

Klasifikace onemocnění

Klasifikace monoklonálních gamapatií podle Kyleho rozlišuje maligní monoklonální gamapatie a monoklonální gamapatie nejasného významu.

- ❑ **Maligní monoklonální gamapatie** – řadí se sem mnohočetný myelom s přítomností monoklonální gamapatie se všemi svými variantními formami a další zhoubné lymfoproliferativní stavy, jako je Waldenströмова makroglobulinemie, maligní lymfomy, chronická lymfatická leukemie, nemoci těžkých řetězců a amyloidóza (Greip, 1996).

- Monoklonální gamapatie nejasného významu je termín, který je používán pro případy, kdy:

- M-Ig nevyvolává žádné příznaky nemoci
- koncentrace M-Ig nepřesahuje v séru 35 g/l M-IgG a M-IgM nebo 20 g/l M-IgA, či v moči 1 g/24 hodin
- ve dření je méně než 5 % plazmocytů.

Pacienti s monoklonální gamapatií nejasného významu nesmí mít žádné kostní příznaky, anémii či poškození ledvin. U těchto stavů se po určité době může vyvinout maligní lymfoproliferativní onemocnění (Adam, 1997).

- U řady těchto onemocnění dochází k rozvoji **Bence-Jonesovy proteinurie (BJP)**, stavu, kdy nízkomolekulární frakce paraproteinu (lehké řetězce či jejich fragmenty) přechází do moči pacientů. Přítomnost monoklonální komponenty v séru a moči přináší řadu klinických problémů, jejich význam stoupá s prodlužující se dobou přežití pacientů. Postižení ledvin je z nich klinicky nejzávažnější. Paraprotein a zejména jeho lehké řetězce se vylučují ledvinami a způsobují postupně jejich těžké poškození, při kterém dochází k atrofii až degeneraci tubulů. Volné lehké řetězce imunoglobulinů (LC) nebo jejich fragmenty mohou tvořit intratubulární depozita ve formě válců (myelomová ledvina), mohou precipitovat jako krystaly v tubulárních buňkách (Fanconiho syndrom), deponovat se v tubulární a glomerulární bazální membráně a mesangiu (nemoc lehkých řetězců LCDD-light chain deposition disease), nebo kondenzovat jako amyloidové fibrily ve stěně cév – primární amyloidóza (Radl, 1990).

Do skupiny maligních monoklonálních gamapatií se řadí mimo jiné:

- ❑ mnohočetný myelom
- ❑ Waldenströмова makroglobulinemie
- ❑ primární amyloidóza

Mnohočetný myelom (MM)

(Kahlerova choroba, plazmocytom)

První zmínky o chorobě je možno nalézt již v roce 1848. Termín mnohočetný myelom byl použit v roce 1873 von Rustickým, který popsal i typický vzhled myelomových buněk. Charakteristický obraz nemoci popsal profesor Kahler v roce 1889 v *Prager Medicinische Wochenschrift*.

Podstatou nemoci je **maligní mutace B lymfocytu ve folikulu lymfatické tkáně. Dochází k nekontrolované proliferaci a diferenciaci této mutované formy na patologicky změněné plazmocyty, které si zachovávají schopnost proliferace a migrace.** Konečným stadiem je zralá myelomová buňka, o které se předpokládá, že již neproliferuje.

➤ Fyziologické plazmocyty žijí za normálních okolností v kostní dřeni průměrně dva dny. Během této doby produkují gamaglobuliny a po vyčerpání svého potenciálu zanikají – podléhají apoptóze. Maligní plazmocyty (myelomové buňky) prakticky nepodléhají apoptóze, přežívají déle a pozvolna infiltrují oblast kostní dřene nebo jiných orgánů a vyvolávají jejich poškození (Landowski a Dalton, 2002).

Maligní buňky migrují z folikulů lymfatických tkání přes oblast periferní krve do kostní dřene, kde proliferují a diferencují na myelomové buňky. Buňky stromatu kostní dřene vytváří pro proliferaci a vyžívání myelomových buněk vhodné mikroprostředí a stimulují jejich vývoj vlastními cytokiny.

➤ Produkci plazmocytárních buněk významně ovlivňuje především růstový hormon interleukin-6 (IL-6) v součinnosti s jinými cytokiny.

Myelomové buňky mají nestabilní genom, u kterého v průběhu nemoci dochází k dalším mutacím a chromozomálním změnám. Tyto změny umožní autonomní růst nezávislý na stromatu kostní dřene a proliferace myelomových buněk může probíhat i mimo mikroprostředí kostní dřene – v oblastech mimo kostní dřeň.

➤ Extramedulární (extraoseální) plazmocyty se svojí biologii odlišují od buněk mnohočetného myelomu, rostou pomalu, mohou mít destruktivní vliv na své okolí, nepřechází však do stadia mnohočetného myelomu s postižením kostí.

Myelomové buňky vylučují do svého okolí mnoho cytokinů (TNF α , IL-6, IL-1 β) a ty způsobují pestré klinické projevy choroby.

➤ Cytokiny stimulují osteoklasty k odbourávání kosti (osteoporóza) a brzdí krvetvorbu (pancytopenie). Monoklonální imunoglobulin (M-Ig) produkovaný myelomovými buňkami, inhibuje negativní zpětnou vazbu tvorby γ globulinů zbývajících fyziologickými plazmocyty (Wolf a Diehl, 1995).

Nekontrolovaná proliferace klonu plazmatických buněk je zodpovědná nejen za produkci paraproteinu, ale vede i k poruše vyžívání normálních plazmocytů, a tím

ke snížení syntézy vlastních protilátek, což vede k poruše protilátkové imunity a s ní související vysokou incidencí infekcí.

Příčina: není zatím známa. Na vzniku onemocnění se může podílet ionizující záření, uplatňují se zřejmě i genetické faktory. Mnohočetný myelom je zhoubné klonální onemocnění postihující elementy konečné fáze diferenciaci B-buněčné linie, vyznačující se **nahromaděním neoplasticky transformovaných plazmocytů v kostní dřeni, které mají nízkou proliferativní aktivitu a zvýšenou rezistenci k apoptóze.** Porucha regulace a omezená pohotovost k apoptóze jsou považovány za klíčové mechanismy, uplatňující se v procesu neoplastické transformace a nádorové expanze.

U mnohočetného myelomu dochází k monoklonální proliferaci buněk tvořících imunoglobulin. Ve dřeni se nachází buňky morfologicky podobné plazmatickým buňkám tzv. **myelomové buňky** (viz dále). Maligní klon se tvoří hlavně ve dřeni, méně v uzlinách a ve slezině. Myelomové buňky tvoří molekuly imunoglobulinů IgG, IgM, IgD, IgA, případně IgE. Méně často jsou produkovány samotné těžké nebo lehké řetězce lambda nebo kappa (Bence-Jonesova bílkovina), anebo kompletní molekula IgM společně s volnými lehkými řetězci. Vzácné jsou nesekreční formy (Witzik a spol., 1999). Maligní klon produkuje patologický imunoglobulin – **paraprotein**, který lze prokázat v séru, nebo v moči.

➤ Kromě paraproteinu dochází k uvolňování ještě další molekuly, tentokrát z povrchu myelomových buněk, tzv. **syndecanu-1**. Molekula podle nové nomenklatury nese označení solubilní CD 138 (sCD 138). Bylo prokázáno, že jde o nový nezávislý prognostický ukazatel mnohočetného myelomu.

Laboratorní nález

- **KO:** v počátečním stadiu se nachází normocytová normochromní anémie, mírná leukopenie a trombocytopenie, později pancytopenie
- **Krevní nátěr:** penízkovatění erytrocytů
- **Kostní dřeň:** je infiltrována myelomovými buňkami, které tvoří 10–95 % všech jaderných buněk dřene. Morfologie odvisí od zralosti myelomových buněk (zralé plazmocyty se prakticky neliší od normální populace plazmatických buněk).
- **FW a vizkozita krve:** zvýšeny (vysoká sedimentace erytrocytů – FW se nachází jen u pacientů s kompletní molekulou IgM).
- **Vysoká koncentrace paraproteinu může vést ke spontánní tvorbě vysokomolekulárních komplexů (hlavně IgA), které se projeví vznikem hyperviskózního syndromu.**
- **ELFO:** nález monoklonálních imunoglobulinů (vyžaduje se kvalitativní i kvantitativní vyšetření).
- **Moč:** nachází se Bence-Jonesova bílkovina

- *Součástí průkazu monoklonálního proteinu musí být i vyšetření moči, neboť při tvorbě paraproteinů (pp) z lehkých řetězců může být hladina v séru nižší, než je citlivost běžně používaných metod. Průkaz paraproteinurie také upozorňuje na možnost současné nebo hrozící Bence-Jonesovy nefropatie.*
- *Kvalitativním a kvantitativním posouzením nátěrů kostní dřeně můžeme určit nejen stupeň zralosti proliferujícího klonu buněk, remisi, relaps, progresi nemoci, ale někdy můžeme odhalit dřevňové šíření extramedulárního plazmocytómu, zdvojené hematologické onemocnění nebo sekundární leukemii.*

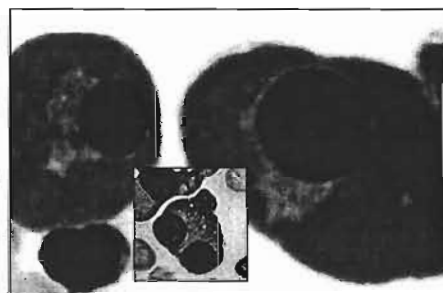
Myelomová buňka

Liší se od normální plazmatické buňky velikostí, barvitelností a strukturou. Obsahuje dvě i více větších výrazných jader, která mohou obsahovat globulární inkluze cytoplazmatického původu (Smetana a spol., 1971).

- *Průměr:* 15–35 μm
- *Chromatin:* jemná struktura u nezralých a hrubá struktura u zralých buněk. U rozvinutých myelomů zpravidla dochází k asynchronii ve vyzářování jadra a cytoplazmy (Smetana a spol., 1973).
- *Cytoplazma:* je výrazně bazofilní, bez perinukleárního projasnění, které je typické pro zralý plazmocyt. Lze v ní někdy vidět nahromaděné imunoglobuliny (IgG, IgA) v podobě kapiček a cytoplazma tím získává hroznovitý vzhled („grape cells“). Jindy bývá na okrajích zbarvená do červena – **plamenné plazmatické buňky** nebo jsou v ní červenavé inkluze zvané **Rousselova tělíska**. Často jsou přítomny vakuoly.



Myelomové buňky



Plamenné plazmatické buňky

- *Plazmatické buňky mohou být v obvodové krvi i u jiných stavů (chronické infekce, zánětlivé stavy). Paraprotein se může vyskytovat i u jiných lymfoproliferativních onemocnění a u karcinomu.*

Plamocelulární malignity podle typu infiltrace kostní dřeně a kostních projevů dělíme na: extraoseální plazmocytom, solitární kostní plazmocytom, multifokální myelom bez difúzní infiltrace kostní dřeně, difúzní postižení kostní dřeně myelomovými buňkami, plazmoblastický sarkom, mnohočetný myelom bez dominujících

osteolytických projevů, mnohočetný myelom s dominující imunosupresí a infekcemi a myelom s dominujícím poškozením ledvin a případnou anémií.

Waldenströмова makroglobulinemie

Nemoc byla poprvé popsána Waldenströmem r. 1944 (Waldenström, 1944). Autor popsal případ dvou nemocných s krvácením z nosu, se závažnou normocytární a normochromní anémií, vysokou hodnotou sedimentace a nízkou koncentrací fibrinogenu. Další výzkum prokázal, že u obou nemocných přítomnost monoklonálního imunoglobulinu typu IgM.

- *IgM vzhledem ke své veliké molekule a vysoké molekulové hmotnosti byl nazván makroglobulin, odtud název makroglobulinemie.*

Makroglobulinemie je maligní chronická proliferace lymfoplazmocytární, při které se tvoří monoklonální paraprotein IgM. Na rozdíl od mnohočetného myelomu nejsou výrazné změny na kostech. U tohoto onemocnění dochází **k proliferaci plazmocytoidních lymfocytů**, které infiltrují kostní dřeň (Dimopoulos a Alexanian, 1994).

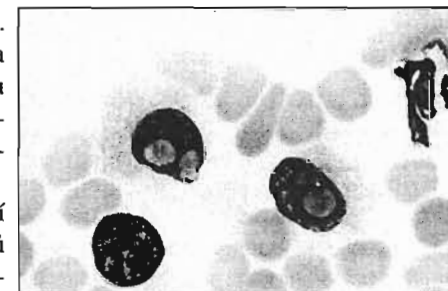
Příčina: není známa. **Podstatou Waldenströmovy makroglobulinemie je maligní mutace B-lymfocyty a jeho proliferace a diferenciaci na lymfoplazmocytární buňky** (Merlini, 1999).

Poškození organismu a patologické projevy nemoci jsou vyvolány proliferací maligních B-lymfatických buněk a monoklonálním IgM. Asi 10 % makroglobulinu tvoří kryoglobuliny, které jsou odpovědné za tzv. **Raynaudův fenomén**.

Laboratorní nález

Morfologický nález je podobný nálezu u chronické lymfatické leukemie.

- **Krevní obraz:** projevy anémie (nedostatečná tvorba erytrocytů, jejich zkrácené přežívání a eventuálně nedostatek železa vyvolaný častými ztrátami krve). Častý nález zvýšeného objemu plazmy se dále podílí na nižším podílu erytrocytů a snížené koncentraci hemoglobinu. Může být mírná trombocytoza, leukocytoza s lymfocytozou a monocytózou.
- **Krevní nátěr:** penízkovatění erytrocytů
- **Kostní dřeň:** většinou hypocelulární. Nachází se tzv. Dutcherova tělíska (intranukleolární vakuoly), která jsou složena z monoklonálního imunoglobulinu. Navíc jsou přítomny lymfoplazmocytární buňky.
- **Trepanobiopsie:** hypercelulární s větším zastoupením lymfocytů a mladších forem lymfoplazmocytoidních buněk.



Dutcherova tělíska

- **ELFO:** průkaz monoklonálního IgM
- **Viskozita krve:** velmi vysoká (hodnoty kolem 4) – je vyvolána přítomností monoklonálního IgM.
- **FW:** vysoké hodnoty
- **Doba krvácivosti:** prodloužena
- **Moč:** Bence-Jonesova bílkovina bývá přítomna až u 80 % nemocných, ale většinou jen v malém množství.
- **Imunofenotypizace:** na monoklonálních lymfocytech bývají znaky CD19, CD20, CD22 a CD 24. Na rozdíl od fyziologických lymfocytů jsou někdy přítomny antigeny CD 5 nebo CD 10 (CALLA), CD 11b a CD9.
Monoklonální IgM vyvolává poruchy hemostázy, protože narušuje některé funkce trombocytů, hlavně adhezivitu a agregabilitu.

Amyloidóza

Termínem amyloid pojmenoval Virchow v r. 1854 patologický extracelulární materiál v játrech (Virchow, 1854). Zhruba po 100 letech byla pomocí elektronového mikroskopu zjištěna speciální fibrilární struktura amyloidu.

Pod pojmem amyloidóza rozumíme skupinu nemocí, které mají společnou vlastnost a sice **ukládání nerozpustných fibrilárních proteinů**.

- *Všechny druhy amyloidu jsou složeny z lineárních, nerozvětvených fibrilárních proteinů v β -konfiguraci. Amyloidová hmota obsahuje dále nefibrilární glykoprotein a glukosaminoglykany (Tichý, 1999).*

Podstatou některých typů amyloidů jsou fragmenty lehkých řetězců imunoglobulinů. Později se zjistilo, že i jiné proteiny mohou vytvářet amyloidové hmoty. To je podstatou sekundární amyloidózy a familiárních amyloidóz.

Příčina: spouštěcí mechanismus, který vede ke vzniku vzniku fibrilárních struktur není znám. Není rovněž zatím vysvětleno, proč se amyloidové fibrily usazují specificky jen v některých orgánech.

Vlastní proces přeměny prvotní bílkoviny na amyloidové fibrily je ovlivněn řadou faktorů a liší se u jednotlivých typů amyloidóz. U AL-amyloidózy mají lehké řetězce, které tvoří amyloid ve své variabilní části typickou sekvenci aminokyselin, případně jde o neúplné lehké řetězce. Záměna aminokyselin v lehkém řetězci nebo chybění některých aminokyselin destabilizuje lehký řetězec a podporuje tvorbu fibrilárních struktur (Gertz, 1999).

- *Tvorbu fibrilárních struktur ovlivňují některé fyzikální a chemické stimuly (pH prostředí, elektrický náboj, hydratace, osmolarita).*

Klasifikace amyloidóz

(WHO – IUIS Nomenclature subcommittee, 1993)

Je založena na identifikaci plazmatických proteinů, které tvoří amyloidové fibrily. Tyto složky jsou velmi různorodé a chemicky nepříbuzné.

AL-amyloidóza

AL-amyloidóza je ze všech typů amyloidóz nejčastější. Přívlastek AL (-) aklita (*amyloid light chain*) lze volně interpretovat jako amyloidóza z lehkých řetězců. Patofyziologickou podstatou primární systémové AL-amyloidózy je klonální expanze patologického B-lymfocytárního klonu, v němž dochází k diferenciaci na plazmatické buňky, které produkují amyloidogenní lehké řetězce. Většinou se produkuje jen vyriabilní část lehkého řetězce. Klon nemusí mít mít maligní vlastnosti (Sakalová, 1997).

- *Nejčastějšími nálezy je přítomnost lehkého řetězce lambda-IV a kappa-I (Tichý, 1999).*

AL-amyloidóza může být:

- ☐ **sekundární** – doprovází některou z maligních monoklonálních gamapatií
- ☐ **primární systémová** – není spojitost z žádným lymfoproliferativním onemocněním

Laboratorní nález

- **Kostní dřev:** lehce zvýšený počet plazmocytů
- **Moč:** nachází se většinou lehké řetězce lambda, jen ojediněle kappa

Sekundární AA-amyloidóza

Sekundární amyloid je tvořen sérovým amyloidovým proteinem (SAA). Jedná se o protein akutní fáze tvořený jako odpověď na zánět. U lidí je tento amyloid tvořen nejméně 5 molekulárními formacemi A-proteinu.

- *Častý výskyt AA-amyloidu byl popsán u chronických zánětlivých chorob včetně tuberkulózy a osteomyelitidy. Dnes je možné se s ním setkat u pacientů s revmatickým kloubním onemocněním (revmatická artritida, Bechtěrevova choroba) a u nespecifických chronických zánětů střeva (Crohnova choroba).*

Literatura

ABDEL-REHEIM, F. A., EDWARDS, E., ARBER, D. A. Utility of a rapid polymerase chain reaction panel for the detection of molecular changes in B-cell lymphoma. Arch. Pathol. Lab. Med., 1996, roč. 120, s. 357–363.

ADAM, Z. Hematologické choroby nízkého stupně malignity. Brno: Masarykova univerzita, 1997. 251 s.

ADAM, Z., VORLÍČEK, J. Hematologie II. Přehled maligních hematologických nemocí. Praha: Grada, 2001. 677 s.

ARBER, D. A. **Molecular diagnostic approach to non-Hodgkin's lymphoma.** *J. Mol. Diagn.*, 2000, roč. 4, s. 178–190.

BUCKY, P., EGELER, M. **Malignant histiocytosis disorders in children.** *Hematol. Oncol. Clin. North Amer.*, 1998, roč. 12, s. 465–471.

BRICE, P., BASTION, Y., LAPAGE, E., *et al.* **Comparison in low tumor burden follicular lymphomas between an initial no treatment policy, prednimustin or interferon alpha. Randomized study of the Groupe D Etude des lymphomes folliculaires.** *J. Clin. Oncol.*, 1997, roč. 15, s. 1110–1117.

CAVALLI, F., BERNIER, J. **Non-Hodgkin's lymphoma in adults.** In Peckham, M., Pinedo, H. M., Veronesi, U. (eds). *Oxford Textbook of oncology.* Oxford: Oxford University Press, 1995, 2481 s.

DIMOPOULOS, M., ALEXANIAN, R. **Waldenström's macroglobulinaemia.** *Blood*, 1994, roč. 83, č. 6, s. 105–108.

GERTZ, M. A., LACY, M. Q., DISPENZIERI, A. **Amyloidosis: recognition confirmation, prognosis and therapy.** *Mayo Clin. Proc.*, 1999, roč. 74, s. 490–500.

GREIPP, R. R. **Relationship between monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and multiple myeloma.** In *Advances in biology and treatment*, Vídeň 13.–14. 9. 1996. Vídeň: 1996. Abstr., s. 26.

HARRIS, N. L., JAFFE, E. S., DIEBOLD, G., *et al.* **The World health organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissue.** *Ann. Oncol.*, 1999, roč. 10, s. 1419–1432.

ISSAACSON, P. G. **The pathology and biology of non-Hodgkins lymphoma.** In Peckham, M., Pinedo, H. M., Veronesi, U. (eds). *Oxford Textbook of Oncology.* Oxford:

Oxford University Press, 1992, s. 1768–1788.

KAPLAN, H. S. **Hodgkin's disease.** 2nd ed. Cambridge: Harvard University Press, 1980, s. 52–115.

KIM, Y. H., HOPPE, R. T. **Mycosis fungoides and the Sézary syndrome.** *Semin. Oncol.*, 1999, roč. 26, s. 311–314.

KINNEY, M. C., KADIN, M. E. **The pathologic and clinical spectrum of anaplastic large cell lymphoma and correlation with ALK gene dysregulation.** *Amer. J. Pathol.*, 1999, roč. 111, suppl. 1., s. 56–67.

LANDOWSKI, T. H., DALTON, W. S. **Molecular biology of plasma cell disorders.** In Mehta, J., Singhal, S. (Eds). *Myeloma.* London: Martin Dunitz, 2002, s. 25–37.

LENNERT, K., MOHRI, N., STEIN, H., *et al.* **The histopathology of malignant lymphoma.** *Brit. J. Haematol.*, 1975, roč. 31, suppl., s. 193–202.

MAGRATH, I. T. **The non Hodgkin's lymphomas.** London: E. Arnold, 1990.

MARKOVÁ, J. **Hodgkinova choroba – některé nové názory na staré onemocnění (krátký přehled).** *Klin. Onkol.*, 1997, roč. 10, č. 5, s. 143–144.

MERLINI, G. **Waldenström's macroglobulinaemia – clinical manifestations and prognosis.** In *Hematology.* New Orleans: American Society of Hematology Education Program book, 1999, s. 358–369.

MÜLLER-HERMELINK, H. K. **Histopathology and classification of non-Hodgkin's lymphomas.** *Internist*, 1997, roč. 38, č. 2, s. 113–121.

RADL, J. **Age related monoclonal gammopathies: Clinical lessons from the afig C57BL mouse.** *Immunol. Today*, 1990, roč. 11, s. 234–236.

SAKALOVÁ, A., ŠKULTÉTYOVÁ, D., GAŽOVÁ, S., *et al.* **Primární amyloidóza a amyloidová angiopatia.** *Hematol. Transfuziol.*, 1997, roč. 7, s. 24–33.

SANDER, CH. A., KIND, P., KAUDEWITZ, P., *et al.* **The Revised European-American Classification of Lymphoid neoplasms (REAL): a new perspectives for the classification of cutaneous lymphomas.** *J. Cutan. Pathol.*, 1997, roč. 24, s. 329–341.

SMETANA, K., DASKAL, Y., GYORKEY, F., *et al.* **Nucleolar and nucleolar ultrastructure of Sézary cells.** *Cancer Res.*, 1977, roč. 37, s. 2036–2042.

SMETANA, K., GYORKEY, F., GYORKEY, F. **Ultrastrukturnal studies on human myeloma plasmacytes.** *Cancer Res.*, 1973, roč. 33, s. 2300–2309.

SMETANA, K., HEŘMANSKÝ, F., KOBLÍŽKOVÁ, H. *et al.* **A further note on the ultrastructure of myeloma plasmacytes.** *Neoplasma* 1971, roč. 18, s. 3–13.

The International Non-Hodgkin's Lymphoma prognostic factors. Project:

A predictive model aggressive NHL. *New Engl. J. Med.*, 1993, roč. 329, s. 987.

TICHÝ, M. **Primární amyloidóza.** *Lék. zprávy LF UK Hradec Králové*, 1999, roč. 44, s. 99–107.

VIRCHOW, V. R. **Über einem Gehirn und Rückenmark des Menschen auf gefundene Substanz mit chemische Reaction der Celulose.** *Virchows Arch. Pathol. Anat.*, 1854, roč. 6, s. 135–138.

WALDENSTRÖM, J. **Incipient myelomatosis or essentials hyperglobulinemia with fibrinogenopenia a new syndrome?** *Acta Med. Scand.*, 1944, roč. 117, s. 216–246.

WITZIK, T. E., TIMM, M., LARSON, D., *et al.* **Measurement of apoptosis and proliferation of bone marrow plasma cells in patients with plasma cell proliferative disorders.** *Brit. J. Haematol.*, 1999, roč. 104, s. 131–137.

WOLF, J., DIEHL, V. **Biology and therapy of Hodgkin's disease.** *Eur. J. Cancer*, 1995, roč. 31 A, s. 830–831.

Zkratky

ABO	krevní skupinový systém ABO
ADP	adenosindifosfát
AF	alkalická fosfatáza
ACHN	anémie chronických nemocí
AIHA	autoimunitní hemolytická anémie
AL	akutní leukemie
ALL	akutní lymfoblastická leukemie
AML	akutní myeloidní leukemie
ATP	adenosintrifosfát
BPG	bifosfoglycerát
CFU-E	progenitorová kmenová buňka erytroidní linie
CLL	chronická lymfatická leukemie
CML	chronická myeloidní leukemie
CMV	cytomegalovirus
CNS	centrální nervový systém
DIK	diseminová intravaskulární koagulace
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTS	densní tabulární systém
EBV	Epstein-Barrové virus
EDTA	etylendiaminotetraoctová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor
ELFO	elektroforéza
EPO	erythropoetin
ET	esenciální trombocytopenie
FAB klasifikace	francouzsko-americko-britská klasifikace
GIT	gastrointestinální trakt
GP	glykoprotein
GPI-kotva	glykosylfosfatidylinsitolová kotva
Hb	hemoglobin
Hct	hematokrit
HLA	hlavní histokompatibilní systém leukocytů
HON	hemolytické onemocnění novorozenců
HS	hereditární sférocytoza
HUS	hemolyticko-uremický syndrom
CHAE	chloracetátesteráza
IgA, IgG, IgM	imunoglobuliny
KDA	kongenitální dyserythropoetická anémie
KF	kyselá fosfatáza
KO	krevní obraz
LAPF4	PF4 o nízké afinitě (Low Affinity PF4)
LDH	laktátdehydrogenáza
LE buňky	buňky u Lupus erythematodes
LIA	světelná imunoabsorbce
LPS	lipopolysacharidy
MCD	střední průměr erytrocytů
MCT	střední tloušťka erytrocytů

MCV	střední objem erytrocytů
MDS	myelodysplastický syndrom
MFS	monocyto-makrofágový systém
MCH	střední koncentrace Hb v erytrocytu
MCHC	střední koncentrace Hb v ery mase
MPO	myeloperoxidáza
MPV	střední objem trombocytu
MW	molekulová hmotnost (relativní)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotid fosfát (reduková forma)
NE	nespecifické esterázy
NK buňky	Natural Killer (přirození zabíječi)
NRBC	normochromní erythroblasty
OCS	otevřený kanálkový systém
PAF	destičkový aktivační faktor
PAS reakce	Periodic-acid-Schiff reakce
PC	protein C
Pct	destičkový hematokrit
PDGF	destičkový růstový faktor
PDW	šíře distribuce krevních destiček
PF4	destičkový faktor 4
PH-anomálie	Pelgerova-Huetova anomálie
pH	záporný logaritmus koncentrace vodíkových iontů
PHE	procento hypochromních erytrocytů
Plt	počet destiček
PNH	paroxysmální noční hemoglobinurie
PRP	na destičky bohatá plazma
PV	pravá polycytemie
RBC	počet erytrocytů
RDW	šíře distribuce erytrocytů
RES	retikuloendoteliální systém
RI	retikulocytový index
RNA	ribonukleová kyselina
RRBC	na lýzu rezistentní erytrocyty
RT	retikulotrombocyt
SIRS	systémová zánětová reakce
SLE	systémový lupus erythematodes
Tbc	tuberkulóza
TKB	transplantace kostních buněk
TTP	trombotická cytopenická purpura
TXA₂	tromboxan A ₂
UV	ultrafialové záření
vWF	von Willebrandův faktor
WBC	počet erytrocytů
WHO	světová zdravotnická organizace
βTG	βtromboglobulin

Rejstřík

A

absolutní počet buněk 149

adheze

- krevních destiček 106, 109–110, 112, 120
- leukocytů 99
- trombocytů 110

agranulocytoza 225

agregace

- krevních destiček 113–114, 120–121, 136
- primární 113, 117–118
- samovolná 122
- sekundární 113, 118
- stimulovaná 117, 122

agregační křivka 121

agregáty

- neutrofilů 48
- trombocytů 50, 140

AIHA

- s bitermickými protilátkami 209, 211
- s chladovými protilátkami 209–211
- s tepelnými protilátkami 209–211
- idiopatická 209–210
- sekundární 209–210

aktivace

- krevních destiček 104–107, 124

akutní erytroblastopenie (Gasserova) 162

akutní infekční lymfocytoza 228

AL-amyloidóza 295

albinismus 43

analýzátor krevních buněk 135–140, 145

anémie

- aplastická 28, 76, 157–158, 160–161
- Blackfanova-Diamondova 163
- čistá aplazie červené řady (PRCA) 171–172
- dyserythropoetická 172
- Fanconiho 162
- hemolytické (viz hemolytické anémie)
- chronických chorob 27, 174, 178–179
- makrocytární 162
- megaloblastová 78, 158, 187
- normocytové 192, 262, 199
- normochromní 192, 262, 163
- perniciózní 33, 76, 189

- sideroblastická 27, 78, 174, 180–181
- sideropenická 27, 29, 34, 174–178
- z akutní a chronické ztráty krve 171, 191–192
- z kombinovaných příčin 171, 218
- z nedostatečné tvorby erytrocytů 171
- ze zvýšené destrukce erytrocytů 171, 192

anomálie erytrocytu

- achromocyty 27, 30
- akantocyty 27, 32–33
- akantocytoza 32, 195–196
- anizochromie 27, 35
- anizocytoza 26, 28,
- anulocyty 27, 29
- bazofilní tečkování 27, 35–36, 186,
- Cobotovy-Schleipovy prstence 27
- dakrocyty 33
- drepanocyt 27, 31, 204
- echinocyty 26–27, 32
- eliptocyty 32
- eliptocytoza 195
- Heinzova tělíska 27, 35–36, 201
- Howellova-Jollyho tělíska 27, 36, 185, 204
- hypochromie 27, 34, 186
- karyorexe 27, 37–38, 173
- keratocyty 33
- leptocyty 27, 29, 163, 186, 204–205
- makrocyty 27, 28
- mikrocyty 26–28
- normocyty 26, 28, 31, 140
- ovalocyty 27, 31, 195
- Pappenheimerova tělíska 37
- penízkovatění erytrocytů 27, 37
- planocyty 27, 29
- poikilocyty 26–27, 31–32
- polychromazie 27, 34, 94, 194, 202, 205
- schistocyty 27, 34, 218
- sférocyty 16, 27, 30, 195, 197
- stomatocyty 27, 32–33
- stomatocytoza 195

anomálie leukocytu

- Alderova-Riellyho 42
- Mayova-Hegglinova 44
- Auerovy tyčky (tělíska) 45–46, 77, 83
- Chediakova-Steinbrinckova-Higashiho 42, 93
- Döhleho inkluze 44

- filamentozní granulocyty 39–40
- Gumprechtovy stíny 45
- hypersegmentace granulocytů 42
- LE buňky 46–48
- nefilamentozní granulocyty 39–40
- obrovské granulocyty 41–42
- Pelgerova-Huetova 40
- reaktivní formy lymfocytů 44
- Riederovy formy 44–45
- pseudo PH-anomálie 41
- sexchromatin 39
- toxická granulace 43
- vakuolizace 43
- virocyty 44

anomálie trombocytu

- anizocytoza trombocytů 49
- destičkový satelismus 49, 136
- mikrotrombocyty 49
- makrotrombocyty 49
- syndrom šedých destiček 49–50

antigenní specifita 97

antigeny 212

aplazie červené řady (Owrenova) 162

apoptóza 86, 240, 268

- neutrofilů 48

autohemolýza 68

autoimunitní choroby 161

autoimunitní stavy 98

autoprotilátky 207–208

B

bazofily 54

berlínská (pruská) modř 78

buňka

- apoptotická 48
- atypická lymfoidní 227
- dendritická 88, 97–98
- endotelová 131
- Gaucherova 94
- Hodgkinova 278, 281
- leukemická 83, 234–235, 273
- myelomová 288, 291, 292
- neúplná 14, 62
- Niemanova-Pickova 94
- natural killer – NK 86, 102
- plazmatická 14, 163, 292
- prolymfocytární 271
- Sézaryho-Lutznerova 287

- Sternberga-Reedové 279, 281–282
- Tartova 48

C

Coombsův test 199, 210, 212, 214

cyklické neutropenie 24

cytochemie

- barvení jadérek v lymfocytech 77
 - barvení na lipidy 76–77
 - barvení na polysacharidy (glykogen) 75
 - barvení na železo 78
 - esterázy 81–83
 - fosfatázy 79–81, 196
 - chloracetátsteráza 81–82
 - myeloperoxidáza 83–84, 100, 237
 - Perlsonova reakce 78
 - peroxidázy 83
 - speciální eozinofilová peroxidáza 100
 - sudanofilní lipidy 76
 - tartarát resistantní kyselá fosfatáza 85
- cytoskelet 196

D

deficit Fe

- latentní 177
- prelatentní 176

diseminovaná intravaskulární koagulace 218

dřeňový útlum 160–163

Dutcherova tělíska 293

dyserythropoéza 173, 252

dysplazie 163, 253–254

E

Embden-Meyrghofův cyklus (viz glykolýza)

eozinofilie 225

eozinofily 73, 75, 86, 88, 100, 225

eozinopenie 225

erytrocyty 14, 29, 62, 67, 140, 165, 201–204, 172, 218

erythropoetin 165, 258–260

erythropoetinový receptor 258

esenciální (primární) trombocytémie 260–261

F

Faktor von Willebrandův 110, 113, 116, 125–127

flip-flop fenomén 107–108

Funkce

- bazofilů 101
- eozinofilů 100
- krevních destiček 131
- leukocytů 183
- lymfocytů 102
- monocytů 101
- neutrofilů 99–100
- NK buněk 102

G

gen bcr/abl 265
glutathion 65
glykolýza
– aerobní 63
– anaerobní 63
glykoprotein I a V 127–128
glykoproteinový komplex IIb/IIIa 116
GPI-kotva 198
granulocyty 72, 75, 85, 163, 225, 266
granulomatóza 93

H

Hairy cell leukaemia 85, 272–274
hemochromatoza 94–95
hemoglobin 169, 218
– Hb Barts 186
– HbH 186
– nestabilní 202
hemoglobinopatie 203–205
hemoglobinurie 209, 211
hemolytické anémie 194
– aloimunitní 212
– autoimunitní 208
– dědičná sférocytoza 71, 196
– imunitní povahy 206–208
– mikroangiopatická 34, 218
– neimunitní povahy 217
– poléková 211
– transfuzní reakce akutní 212–214
– získané 206
– z odchylek v molekule Hb 202
– z poruchy enzymů 200
hemolytické onemocnění novorozenců 214–216
hemolytická transfuzní reakce 212
hemolyticko-uremický syndrom 218
hemosideroza (viz hemochromatoza)

hereditární eliptocytoza 195
hereditární sférocytoza 195
HFE protein 95
histiocyty 91, 287
Hodgkinova nemoc 278–280
Hynkovo číslo 229
hypoplasie kostní dřene 160–161, 163
hypoxie 165

CH

chagasova nemoc 57
chemotaxe 89–90, 99
chromozom Philadelphia (Ph1) 265

I

idiopatická paroxysmální chladová
hemoglobinurie 211
imunita
– nespecifická 88
– specifická 96
infekční mononukleóza 44, 85, 227

K

klasifikace
– AIHA 209
– ALL 245–246
– amyloidóza 295
– anémií 170
– FAB 245, 249–250
– kielská 277
– lymfoproliferativních stavů podle WHO 285
– M. Hodgkin 279–280
– myeloproliferativních stavů 257
– podle Raie 269
– Rappaportova, Lukese a Collinse 277
– REAL 277–278
– „Working Formulation“ 277
kontraktilní proteiny 21
– aktin 22
– aktinmyozinový komplex 22
– ankyrin 196
– profilaktin 22
– profilin 22
– spektrin 196–197
kontraktilní systém krevní destičky 22
korigovaný počet retikulocytů 169
krevní destička (trombocyt) 14, 22, 26, 103, 104, 141

L

leukemie 232
– akutní lymfoblastická 236, 245
– akutní myeloblastická 157, 236, 239–240
– chronická lymfatická 264–266, 268, 286
– chronická myeloidní 42 80, 257, 264–268
– chronická myelomonocytární 264, 267
– erytroleukemie 76, 164
– prolymfocytární 264, 271–272
– vlasatobuněčná 286, 264, 272–274
leukocytoza 192, 222–223
leukoerytroblastová reakce 230
leukemoidní reakce 229–230
leukopenie 158, 162, 188, 190, 222–223
lymfoblasty 85
lymfocytoza 226, 269
lymfocyty 13, 42, 72–74, 76, 85–87, 99
lymfomy 158, 276
– nehodgkinské 85, 277, 278, 282–286
lymfopenie 226
lymfoproliferativní stavy 211, 276–277
lysozom 23, 88

M

makrofágy 86, 88–89, 90–92, 99, 102, 255
– normální 91–92
– zánětlivé 92
maligní histiocytoza 286, 288
maligní lymfogranulom 278
megalocyty 190
membrána
– erytrocytu 15
– krevní destičky 18
metabolizmus
– červené krvinky 63
– krevní destičky 130–131
mitochondrie 13, 17, 24, 107, 127
mnohočetný myelom 290–292
monocyto-makrofágový systém 90
monocytopenie 226
monocytoza 226
monocyty 13, 72–73, 75, 83, 85, 88, 98, 102
monoklonální gamapatie 38, 286, 288–289
morfolgie a ultrastruktura erytrocytu 15
Mycosis fungoides 286
myelodysplastický syndrom 76, 78, 80, 96, 157, 199, 248–251

myelofibroza 33, 257, 261–262
myeloskleroza 261–263

N

nepravá (laboratorní) trombocytopenie 50
neutrofily 72–73, 83, 86, 88, 98, 225
neutrofilie 224
neutropenie 163, 190, 224
normoblasty 186

P

pancytopenie 158, 161
parametry krevních buněk
– destičkový hematokrit 151
– diferenciální počet leukocytů 223, 145
– hematokrit 142, 168, 259
– histogram distribuce podle MCV 143
– histogram distribuce podle MPV 150
– mikrohematokrit 142
– počty krevních buněk 139
– Price-Jonesova křivka 144
– rozpočet leukocytů 145
– střední objem erytrocytu 142
– střední objem krevní destičky 150
– střední průměr erytrocytu 144
– střední tloušťka erytrocytu 144
– šíře distribuce destiček 150
– šíře distribuce erytrocytů 143
paraziti
– bartonelózy 59
– boreliózy 59
– červi 51
– filariózy 51
– kandidózy 60
– leishmanie 57
– plasmodia 52
– protozoa (prvoci) 52
– stafylokokové infekce 59
– toxoplazmózy 52
– treponémy 58
– trypanozómy 56
paroxysmální chladová hemoglobinurie 211
paroxysmální noční hemoglobinurie 157, 197–199
pentózofosfátový cyklus (viz glykolýza)
plazmocytů 86
pochodová hemoglobinurie 217
polycytémia vera (pravá polycytemie) 165

polycytemie (polyglobulie) 164–166
 posun k mladším vývojovým řadám 229
 posun ke zralým vývojovým formám 230–231
 procento hypochromních erytrocytů 152
 protein p210 265
 protilátky 96
 – IgG 212
 – IgM 212
 puryvátkináza 66, 200

R

reakce na stres 231
 relaps 239
 remise 239
 retikulocytóza 192, 197, 199, 204–205
 retikulocyty 162–163, 171, 186, 194, 209
 retikulotrombocyty 104
 RGD sekvence 116
 ribosomálně-lamelární komplexy 274
 Rousselova tělíska 292

S

Sézaryho syndrom 286
 Schiffovo činidlo 76
 Schillingův test 190
 Schüffnerovo tečkování 54, 56
 sideroblasty 78
 – prstenčité
 siderocyty 78
 siderofágy 78
 sodíková pumpa 16
 syndrom líných leukocytů 92

T

talasemie 27, 30, 33, 42, 182–184, 187
 – α -talasemie 186
 – β -talasemie 185

taxe 89–90
 testy ke stanovení enzymů glykolýzy 66
 testy na hemolýzu
 – Crosbyho test 69
 – Dacieho test 68
 – Hamův test 68, 199
 – Hartmanův test 69, 199
 – mechanická rezistence erytrocytů 68, 71
 – osmotická rezistence erytrocytů 69–70, 205
 – test autohemolýzy 69
 – volný hemoglobin 69
 teaurismózy 93
 trepanobiopsie 169, 262
 trombocytémie 257, 260–261
 trombocytopenie 158, 162, 189, 190, 199
 trombocyty 75, 103–104, 110, 131, 163
 trombocytoza 192, 204
 trombotická trombocytopenická purpura 34, 218
 tubulin 22–23

U

ultrastruktura trombocytu 17
 – denzní tubulární systém 17, 107
 – endoplazmatické retikulum 13, 81
 – glykokalyx 21
 – granula krevní destičky 23
 – otevřený kanálkový systém 17, 21
 – peroxizomy 23

V

vnitřní faktor 189

W

Waldenströмова makroglobulinemie 289, 293–294
 Weibel-Paladeho tělíska 125