

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zdravotně sociální fakulta

**Vliv snížené hladiny vitamínu B<sub>12</sub> a kyseliny listové  
na morfologii erytrocytů**

bakalářská práce

Autor práce:	Michaela Popelová
Studijní program:	Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor:	Zdravotní laborant
Vedoucí práce:	MUDr. Ivan Vonke
Datum odevzdání práce:	3. 5. 2012

## Abstrakt

Morfologie erytrocytu je důležitým diagnostickým prvkem. Změny v morfologii mohou ukázat na určité onemocnění. Z morfologických znaků erytrocytu automatické analyzátoři běžně vyšetřují velikost a barvitelnost.

Velikost erytrocytu se pohybuje v rozmezí 6,7 – 7,7  $\mu\text{m}$ . Menší erytrocyty jsou nazývány mikrocyty, větší pak makrocyty. Velikost erytrocytů posuzujeme podle hodnoty MCV (Mean Cell Volume), která udává průměrný objem erytrocytu.

Pro správný vývoj a metabolismu erytrocytu je důležitý přísun látek potřebných pro krvetvorbu, jako jsou bílkoviny, vitaminy a minerály. Látkami ovlivňujícími morfologii erytrocytů jsou především železo, vitamin B<sub>12</sub> a kyselina listová. Deficit těchto látek vede k morfologickým změnám krevního obrazu. Při nedostatku železa je v periferní krvi přítomna mikrocytóza (MCV < 80 fl). Opačná změna, makrocytóza, vzniká při deficitu vitaminu B<sub>12</sub> a kyseliny listové (MCV >97 fl). Tato změna je hlavním tématem projektu.

Kromě změn v periferní krvi vznikají v důsledku deficitu vitaminu B<sub>12</sub> a kyseliny listové změny i v kostní dřeni. Deficit vitaminu B<sub>12</sub> způsobí megaloblastovou přestavbu kostní dřeně. Megaloblastová přestavba kostní dřeně se od normoblastové kostní dřeně liší velikostí, tvarem a nepoměrem mezi vyzáváním jádra a cytoplazmy. Toto zaostávání zraní jádra za cytoplazmou, je způsobeno vážnutím tvorby DNA, kterou způsobí již zmiňovaný deficit vitaminu B<sub>12</sub>.

Hematologickými onemocněními způsobenými deficitem vitaminu B<sub>12</sub> jsou megaloblastová anemie a perniciozní anemie. Tato onemocnění jsou v práci také zmíněna.

Příčiny, které vedou k nedostatku obou vitaminů, jsou různé, např. nedostatečný příjem potravy, či porucha ve vstřebávání.

Automatické analyzátoři dnes nabízí celou škálu vyšetření parametrů krevních buněk. Vzorky byly zpracovány na automatickém analyzátoru Coulter LH 750, který

pracuje na impedančním principu. Hodnotu MCV analyzátor vypočte pomocí softwaru jako průměr všech naměřených impedančních pulzů.

Z celkového počtu vyšetřených hladin vitamínu B<sub>12</sub> byla makrocytóza přítomna u 4 % případů. Při deficitních hodnotách (< 150 ng/l) vitamínu B<sub>12</sub> to pak bylo 52 % případů.

Z celkového počtu vyšetřených hladin kyseliny listové byla makrocytóza přítomna u 7,5 % případů. Při deficitních hodnotách (< 3,1 µg/l) kyseliny listové to pak bylo 38 % případů.

Při zvýšených hodnotách MCV byl ve 27 % nalezen deficit vitamínu B<sub>12</sub> a ve 33 % v případě kyseliny listové.

Tato práce potvrdila souvislost mezi nedostatkem vitamínu B<sub>12</sub> a kyseliny listové a následným vznikem morfologických změn. Při nálezů vysokého MCV se vyskytoval jen deficit vitamínu B<sub>12</sub>, nebo jen deficit kyseliny listové, anebo se současně vyskytoval deficit obou vitamínů.

## Abstract

The morphology of erythrocyte is an important diagnostic element. Changes in morphology can point to certain diseases. Among various morphological features of erythrocytes the automatic analyzers commonly examine their size and stainability.

The size of erythrocyte is ranging between 6.7 and 7.7  $\mu\text{m}$ . The smaller erythrocytes are called microcytes while bigger ones are called macrocytes. The size of erythrocytes is assessed by MCV (Mean Cell Volume), which indicates the average corpuscular volume.

The supply of substances such as proteins, vitamins and minerals is important for proper development and metabolism of erythrocytes. Especially iron, vitamin B<sub>12</sub> and folic acid are substances that affect the morphology of the erythrocyte. Deficiency of these substances leads to morphological changes in the blood picture. The deficiency of iron is presented in the peripheral blood like microcytosis (MCV <80 fl). The macrocytosis is the opposite change, which means deficiency of vitamin B<sub>12</sub> and folic acid (MCV > 97 fl). This change is the main theme of project.

As a result of deficiency of vitamin B<sub>12</sub> and folic acid, changes in bone marrow are formed in addition to changes observed in the peripheral blood. Deficiency of vitamin B<sub>12</sub> causes the megaloblastic reconstruction of bone marrow. This reconstructed bone marrow differs from normoblastic bone marrow by size, shape and and the gap between the cytoplasm and nucleus maturation. The retardation of nuclear maturation is caused by a suppressed formation of DNA related to the above mentioned deficiency of vitamin B<sub>12</sub>.

Megaloblastic anemia and pernicious anemia are other hematological diseases caused by deficiency of vitamin B<sub>12</sub>. These diseases are at work also mentioned.

The causes, which lead to a lack of both vitamins, are variable, for instance their insufficient food intake, or a defect in their assimilation.

At present automatic analyzers offer a full range of tested parameters of blood cells. The samples were examined by an automatic analyzer Coulter LH 750, which

operates on the principle of impedance. The value of MCV analyzer calculates using the software as the average of all measured impedance pulses.

The macrocytosis was presented in 4% of the total number of samples examined for levels of vitamin B<sub>12</sub>. In 52% of samples deficient values of B<sub>12</sub> (< 150 ng/l) content were observed.

The macrocytosis was present in 7.5% of the total number of samples examined for level of folic acid. The deficit values of folic acid (< 3,1 µg/l) were observed in 38% of all cases. At increased values of MCV 27% deficiency of vitamin B<sub>12</sub> and 33% deficiency of folic acid was found.

This work confirmed the link between lack of vitamin B<sub>12</sub> and folic acid and the subsequent development of morphological changes. The deficiency in vitamin B<sub>12</sub>, in folic acid or in both vitamins occurred at high MCV.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2013

.....

Michaela Popelová

## **Poděkování**

Poděkovat bych chtěla především vedoucímu své bakalářské práce MUDr. Ivanu Vonkemu za odborné vedení a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat laborantkám za jejich ochotu a spolupráci v laboratoři.

# Obsah

Úvod.....	10
1. Literární přehled.....	11
1.1 Erytrocyt.....	11
1.1.1 Morfologie a funkce erytrocyt.....	11
1.1.2 Hodnoty erytrocytu.....	12
1.1.3 Patologická morfolgie erytrocytů.....	13
1.1.4 Metabolismus erytrocytu.....	15
1.2 Kostní dřeň ( <i>medulla ossium</i> ).....	16
1.2.1 Vznik a vývoj kostní dřene.....	17
1.2.2 Řízení krvetvorby.....	18
1.2.3 Vznik a vývoj krvinek.....	20
1.3 Vitamin B <sub>12</sub> .....	24
1.3.1 Zdroj vitamínu B <sub>12</sub> .....	24
1.3.2 Metabolismus vitamínu B <sub>12</sub> .....	25
1.3.3 Funkce vitamínu B <sub>12</sub> .....	25
1.3.4 Nedostatek vitamínu B <sub>12</sub> .....	25
1.4 Kyselina listová.....	27
1.4.1 Zdroj.....	27
1.4.2 Metabolismus.....	27
1.4.3 Funkce.....	28
1.4.4 Nedostatek.....	28
1.5 Megaloblastové anemie.....	28
1.5.1 Příčiny vzniku.....	29
2. Cíl práce a hypotézy.....	32
2.1 Cíl práce.....	32
2.2 Hypotézy.....	32
3. Metodika.....	33



3.1	Příjem materiálu do laboratoře .....	33
3.2	Zpracování vzorku v analyzátoru Coulter LH 750 .....	34
3.3	Krevní nátěr.....	35
3.3.1	Zhotovení krevního nátěru.....	35
3.3.2	Barvení krevního nátěru.....	36
3.3.3	Hodnocení krevního nátěru.....	36
3.4	Nátěr kostní dřeně .....	36
3.5	Stanovení vitamínu B12 .....	37
3.5.1	Princip metody .....	37
3.5.2	Analyzátor ADVIA Centaur .....	38
3.6	Stanovení kyseliny listové (Folát).....	38
3.6.1	Princip metody .....	38
3.6.2	Analyzátor ADVIA Centaur .....	39
4.	Výsledky.....	40
5.	Diskuze .....	47
6.	Závěr.....	49
7.	Seznam použité literatury .....	50
8.	Klíčová slova .....	54

# Úvod

V dnešní době je denně v hematologických laboratořích zpracováno na automatických analyzátořech mnoho krevních obrazů. Kromě početního zastoupení jednotlivých druhů krevních buněk analyzátoř poskytuji i základní morfologické parametry – velikost a barvitelnost.

Tyto dva základní parametry morfologie erytrocytu jsou důležitým faktorem při vyšetření krevního obrazu. Změny těchto dvou parametrů totiž mohou poukázat na přítomnost onemocnění.

Nejčastěji se vyskytující morfologickou změnou je mikrocytóza charakterizovaná výskytem malých erytrocytů (erytrocyty o velikosti  $< 6,7 \mu\text{m}$  a  $\text{MCV} < 80 \text{ fl}$ ), provázená hypochromií charakterizovanou výskytem světleji zbarvených erytrocytů s nízkým obsahem hemoglobinu. Tyto změny ukazují na sideropenickou anemii. Sideropenická anemie je způsobena nedostatkem železa a je také nejčastěji se vyskytující anemií.

Opačnou morfologickou změnou je výskyt velkých erytrocytů (velikost erytrocytu  $> 7,7 \mu\text{m}$  a  $\text{MCV} > 97 \text{ fl}$ ). Tuto morfologickou změnu nazýváme makrocytózou. Makrocytóza je způsobená nedostatkem látek pro správnou tvorbu bílkovin a následnou tvorbou nukleových kyselin. Těmito látkami jsou vitamin  $\text{B}_{12}$  a kyselina listová.

Vztahem mezi deficitem vitaminu  $\text{B}_{12}$  a kyseliny listové a následnou morfologickou změnou vyplývající z jejich nedostatku jsem se rozhodla blíže zabývat ve své bakalářské práci.

# 1. Literární přehled

## 1.1 Erytrocyt

### 1.1.1 Morfologie a funkce erytrocyt

Erytrocyt je vysoce specializovaná bezjaderná buňka. Kromě jádra postrádá i další organely (mitochondrie, ribozomy aj.). Tvar erytrocytu je popisován jako bikonkávní disk, tj. kulovitá buňka s oboustranným zúžením ve středu buňky. Na plošném obraze barveného krevního nátěru erytrocyt vidíme jako růžovočervený kruhovitý útvar s centrálním projasněním, v místě jeho zúžení. Tento tvar erytrocytu udržuje polopropustná membrána tvořená fosfolipidovou dvojvrstvou, která je pevná a zároveň pružná a umožňuje tak erytrocytu procházet těmi nejmenšími kapilárami (vlásečnicemi). Pevnost a pružnost udržuje na vnitřní straně fosfolipidové dvojvrstvy ukotvená síť proteinů a glykoproteinů, která tvoří cytoskelet (kostru) erytrocytu. (Sakalová a kol. 1995) Nedílnou součástí cytoskeletu jsou kontraktilní bílkoviny spektrin, aktin, ankyrin. (Pecka 2006) Na vnější straně membrány jsou rozmístěné glykoproteiny antigenů krevních skupin. (Sakalová a kol. 1995)

Hlavní úlohou erytrocytů je transport krevních plynů, kyslíku a oxidu uhličitého, mezi plicemi a tkáněmi. Samotnou vazbu krevních plynů zprostředkovává červené krevní barvivo, hemoglobin, které způsobuje jejich červené zbarvení. Molekula hemoglobinu se skládá z 96 % z globinu, a ze 4 % z hemu. Globin je nebílkovinná složka, která je tvořena ze čtyř peptidových řetězců: dvou alfa a dvou řetězců beta, delta, gama nebo epsilon. Podle druhu druhého řetězce rozlišujeme několik druhů hemoglobinů (např. fetální). Hem je barevnou nebílkovinnou složkou hemoglobinu skládající se z protoporfirinového prstence s centrálně vázaným atomem dvojmocného železa, které váže jednou vazbou kyslík (Sakalová a kol. 1995). Jeden gram hemoglobinu váže 1,39 ml kyslíku. (Mourek 2005) Hemoglobin s navázaným kyslíkem

nazýváme oxyhemoglobinem. Oxyhemoglobin putuje do tkání, kde snadno odevzdá navázaný kyslík a místo něj naváže vodík. Tomuto hemoglobinu říkáme redukovaný hemoglobin. (*Sakalová a kol. 1995*) Po vazbě oxidu uhličitého ve tkáních vzniká karbaminohemoglobin. (*Trojan a kol. 2003*)

### 1.1.2 Hodnoty erytrocytu

Základní měřené hodnoty erytrocytu jsou počet erytrocytů, hematokrit, hemoglobin, střední objem erytrocytu, střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech a střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytu.

RBC (Red Blood Cells) = udává počet erytrocytů v jednom litru krve. Počet erytrocytů novorozence se pohybuje kolem  $5 \cdot 10^{12}/l$  a do třetího měsíce postupně klesá. Následně stoupá až do dospělosti, kde jsou hodnoty pro muže  $4,3-5,7 \cdot 10^{12}/l$  a pro ženy  $3,8-4,9 \cdot 10^{12}/l$ .

Hct (Hematocrite) = hematokrit udává poměr objemu všech erytrocytů k celkovému objemu krve. Fyziologické hodnoty jsou pro muže 0,40-0,50; a pro ženy 0,35-0,47. Hodnoty hematokritu jsou důležité pro výpočet odvozených hodnot erytrocytu.

Hb = hemoglobin, udává koncentraci hemoglobinu v určitém množství krve. Fyziologické hodnoty pro muže jsou 135-175 g/l; a pro ženy 120-160 g/l.

MCV (Mean Cell Volume) = střední objem erytrocytů udává průměrný objem buňky v hodnocených erytrocytech jeho fyziologické rozmezí je 82-98 fl. Informuje, jestli jde o normocytovou, mikrocytovou, nebo makrocytovou anémii.

Histogram distribuce erytrocytu podle CV (Cell Volume) znázorňuje křivku závislosti četnosti erytrocytů na jejich objemu. Informuje o přítomnosti normocytózy, mikrocytózy, makrocytózy nebo i o přítomnosti blastů.

Šíře distribuce erytrocytů (Red Cell Distribution Width – RDW) statisticky popisuje nejčetnější populaci erytrocytů v histogramu erytrocytů podle jejich objemu. Je vyjádřena variačním koeficientem nebo směrodatnou odchylkou.

MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) = střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech udává množství hemoglobinu ve všech erytrocytech.

Fyziologické hodnoty jsou 0,32-0,36 kg Hb/l. U hereditární sférocytózy dochází ke zvýšení této hodnoty. Snížení nastává u hypochromií a makrocytové anemie.

MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin) = střední množství (koncentrace) hemoglobinu v erytrocytu udává množství hemoglobinu v jednom erytrocytu. Fyziologické hodnoty jsou v rozmezí 28-34 pg. Zvýšené hodnoty se vyskytují u makrocytových anemií. Nízké hodnoty naopak u anemií mikrocytových. (Pecka 2010)

Mezi méně obvyklé nebo dnes nepoužívané parametry patří střední průměr erytrocytu, Price-Jonesova křivka, střední tloušťka erytrocytu a povrch erytrocytu.

Střední průměr erytrocytu (Mean Cell Dimeter – MCD) je aritmetickým průměrem průměru všech erytrocytů.

Křivka závislosti četnosti erytrocytu na jejich průměru je Price-Jonesova křivka, která je dnes nahrazena histogramem podle CV.

Střední tloušťka erytrocytu ( Mean Cell Thickness - MCT) se vypočte z MVC a MCD dosazením do vzorce pro objem válce.

Průměrný povrch erytrocytů (Red Cell Surface Area) se odvozuje od střední tloušťky erytrocytu výpočtem podle vzorce pro válec. (Pecka 2010)

### 1.1.3 Patologická morfologie erytrocytů

Za různých patologických stavů dochází ke změnám ve velikosti, tvaru a barvitelnosti erytrocytu. (Sakalová a kol. 1995) Změny hodnotíme buď u jednotlivých buněk např. mikrocyt, nebo jako početní zastoupení změněných buněk v celku, např. mikrocytóza. (Pecka 2006)

#### 1.1.3.1 Velikost erytrocytu

Erytrocyty, které mají menší velikost, nazýváme mikrocyty. Kromě menší velikosti (< 6,7  $\mu\text{m}$ ) je charakterizuje také menší střední objem erytrocytu (MCV < 80 fl). Menší obsah hemoglobinu způsobuje i bledší zbarvení mikrocytů. Opačnou změnu, tedy velké (> 7,7  $\mu\text{m}$ ), sytě zbarvené erytrocyty, nazýváme makrocyty (MCV>97 fl),

obrovské erythrocyty pak gigantocyty. Když v mikroskopickém obraze vidíme velký počet erythrocytů o různé velikosti, nazýváme tento stav anizocytózou. (*Sakalová a kol. 1995; Pecka 2006*)

#### 1.1.3.2 Tvar erythrocytu

V krevních nátěrech můžeme vidět i erythrocyty oválného tvaru, ovalocyty. Dále se může vyskytnout malý kulovitý erythrocyt, kterému chybí pro erythrocyt charakteristický oboustranný prolis ve středu buňky, takovouto buňku nazýváme sférocyt. Z důvodu chybění tohoto zúžení chybí v krevním nátěru středové projasnění a je výrazně snížena doba přežívání sférocytu, který pro svůj tvar obtížněji prochází kapilárami. Výskyt sférocytů je spojen s některými typy hemolytických anemií. Drepanocyty jsou srpkovité erythrocyty vyskytující se u hemoglobinopatií a obsahující hemoglobin S. Dále můžeme v krevním nátěru najít úlomky erythrocytů, schistocyty. Stomatocyty jsou erythrocyty s projasněním ve tvaru štěrbin připomínající ústa. Erythrocyty s hemoglobinem uloženým ve středu a po obvodě buňky, takže připomínají svým vzhledem terč, jsou terčové erythrocyty. Akantocyty mají na svém povrchu nepravidelně výběžky a dakrocyty mají tvar slzy či kapky. (*Sakalová a kol. 1995*)

#### 1.1.3.3 Zbarvení erythrocytu

Pokud erythrocyt obsahuje menší množství hemoglobinu, než je normální, barví se slaběji a mluvíme o hypochromii. V případě velkého středového projasnění s jen úzkým proužkem růžového zbarvení na okraji jde o anulocyt. O hyperchromii nikdy nemluvíme, protože hemoglobinu se do erythrocytu vejde jen omezené množství, bez ohledu na jeho velikost. Další změnou od normálního barvení je polychromázie, kdy v krevním nátěru vidíme některé erythrocyty zbarvené modrofialově. Tyto erythrocyty se barví modře, protože jsou nezralé. (*Sakalová a kol. 1995*)

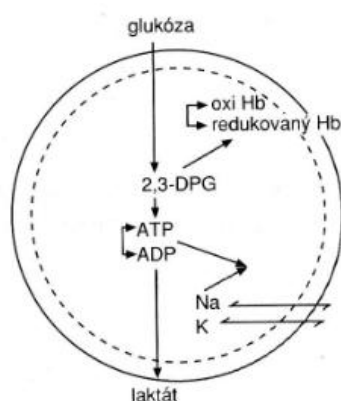
#### 1.1.3.4 Inkluze v erytrocytu

Bazofilní tečkování je označení pro nález sytě tmavomodrých zrn, která jsou pozůstatkem bazofilní cytoplazmy erytroblastů. (Pecka 2006) Bazofilní tečkování je častým nálezem u otrav olovem nebo jiným těžkým kovem. (Hrubíško a kol. 1983) Vlivem změn metabolismu erytrocytu dochází k oxidaci a denaturaci hemoglobinu. Denaturovaný hemoglobin precipituje s bílkovinami stromatu na membráně erytrocytu, vznikají pak oválná modrá Heinzova tělíska. Červenofialová až zářivě červená tělíska, Howell-Jollyho tělíska, jsou pravděpodobně zbytky jaderných chromozomů. Tenké fialově červené kroužky, kličky nebo smyčky jsou pozůstatkem membrány erytroblastů, jde o Cabotovy-Schleipovy prstence. (Pecka 2006)

#### 1.1.4 Metabolismus erytrocytu

Erytrocyt přežívá v krevním oběhu 100 – 120 dní. (Dylevský 2000) energii ve formě organických fosfátových látek, ATP (adenozintrifosfátu) a 2,3-difosfoglycerátu, potřebnou pro udržení svých fyziologických funkcí získává enzymatickým štěpením glukózy. Za fyziologických okolností štěpí erytrocyt glukózu anaerobní cestou (bez přítomnosti kyslíku) z 90 % a ze zbylých 10 % cestou aerobní glykolýzy (za přítomnosti kyslíku). Takto získanou energii uloženou v molekulách ATP využívá na aktivní transport sodných iontů ven z erytrocytu a draselných iontů dovnitř erytrocytu, proti tzv. koncentračnímu spádu. Tento transport zajišťuje elasticnost a stálý tvar erytrocytové membrány po průchodu kapilárami. Správně probíhající glykolýza (štěpení glukózy) dává vzniknout dostatečnému množství jak ATP tak i 2,3-difosfoglycerátu, který je potřebný pro udržování hemoglobinu v redukovaném stavu. Aerobní glykolýza je potřebná pro vznik enzymů tzv. reduktáz nezbytných k tvorbě dostatečného počtu vodíkových radikálů, které odštěpí vodík z molekuly hemoglobinu a tak uvolní vazebné místo pro kyslík.

Pro správné složení hemoglobinu a membrány erytrocytu je významný i u jeho vývojových stádií, zejména u pronormoblastu a normoblastu, i správně fungující metabolismus bílkovin. Množství enzymů potřebný pro bílkovinný metabolismus v průběhu vývoje erytrocytu postupně klesá a zároveň stoupá množství enzymů potřebných právě pro metabolismus glukózy. (Hrubiško a kol. 1983; Sakalová a kol. 1995)



## 1.2 Kostní dřeň (*medulla ossium*)

Kostní dřeň je jedním z největších orgánů v lidském těle tvořící 3,4-5,6 % tělesné hmotnosti člověka. Dospělý jedinec má tedy 1 600-3 700 g a z tohoto množství je asi 1 300 g aktivní kostní dřeň tvořící krvinky. (Pecka 2002) Kostní dřeň vyplňuje dřeňové dutiny uvnitř diafýz (středních úseků) a hlavic (epifýz) kostí. (Dylevský 2000) Skládá se z krvetvorné tkáně, podpurné tkáně (fibroblasty a vazivo), cév (sinusoidy), nervových vláken, lymfatické a tukové tkáně. Neurovaskulární síť a retikulární buňky vytváří kostní dřeň kostru. Krvetvorná kostní dřeň je vysoce organizovaná tkáň, která se nachází v lebce, obratlech, lopatkách, žebrech, klíčních kostech, kosti hrudní, ramenní, pánevní, a stehenní. Je tvořena kmenovými buňkami, mateřskými (progenitorovými) buňkami, prekurzory a zralými krvinkami jednotlivých řad, které plynule přechází do krve. Na jeden kilogram tělesné hmotnosti vyprodukuje kostní dřeň asi 200 miliard erytrocytů (červených krvinek), 70 miliard leukocytů (bílých krvinek) a 100 miliard trombocytů (krevních destiček). (Pecka 2002)



## 1.2.1 Vznik a vývoj kostní dřeně

Krvetvorbu lze rozdělit na dvě období, na krvetvorbu před narozením (v embryonálním stádiu) a krvetvorbu po narození. (*Hrubíško a kol. 1983*)

### 1.2.1.1 Embryonální krvetvorba

Embryonální krvetvorba začíná ve 3. týdnu nitroděložního života a dělíme jí na tři období, která na sebe plynule navazují, částečně se překrývají a prolínají. Jednotlivá období jsou pojmenována podle umístění krvetvorné tkáně. Prvním obdobím je mezoblastové období, kde dochází k tvorbě krvinek ve žloutkovém vaku, tedy mimo plod. Začínají se zde tvořit erytrocyty. Mezoblastová krvetvorba přetrvává do 10. týdne nitroděložního života. Druhé období nazýváme hepatolienálním, tvorba krvinek tedy probíhá v játrech a poději i ve slezině. Tvorba hemopoetických buněk v játrech začíná od 6. týdne nitroděložního života a přetrvává až do porodu. Do poloviny nitroděložního vývoje jsou játra hlavním místem hemopoézy (krvetvorby). V hepatolienálním období se začínají vytvářet i ostatní krvinky, bílé krvinky, neboli leukocyty a krevní destičky neboli trombocyty. Třetím obdobím je období myeloické, které začíná v 20. týdnu nitroděložního života. Veškeré krevní buňky jsou tvořeny v kostní dřeni, a proto tuto krvetvorbu nazýváme medulární. Se vzestupem medulární krvetvorby extramedulární krvetvorba, neboli mimodřeňová krvetvorba, postupně mizí a úplně zaniká ve 2. - 3. týdnu po narození. (*Hrubíško a kol. 1983*)

### 1.2.1.2 Krvetvorba po narození

Krvetvorba po narození se za normálních okolností nachází jen v kostní dřeni, která je zdrojem všech krvinek vyskytujících se v cirkulující krvi, tzn. erytrocytů, leukocytů a trombocytů. Krvinky se tvoří ve všech kostech do pátého roku života. Od čtvrtého roku života se začínají objevovat v kostní dřeni tukové buňky, které postupně přibývají, což vede k tomu, že krvetvorba se kolem osmnáctého roku omezuje už jen na kosti ploché a krátké (žebra, obratle, aj.), a na hlavice kostí dlouhých.

Za určitých okolností, jako jsou například rozsáhlé krvácení, nadměrný rozpad erytrocytů, nebo choroby postihující kostní dřeň, kde je potřeba akutně doplnit chybějící erytrocyty, se může i v dospělosti tuková tkáň kostní dřeně přeměnit zpět na krvetvornou kostní dřeň a na místech zárodečné krvetvorby se může také objevit krvetvorba tj. krvetvorba mimodřeňová. (*Hrubíško a kol. 1983*)

### 1.2.2 Řízení krvetvorby

Řízení krvetvorby je složitý a komplexní děj, který zabezpečuje tvorbu nových funkčních krvinek, a tím stálé početní zastoupení jednotlivých druhů krvinek a jejich stálý poměr. Na řízení krvetvorby se podílí souhra nervových, hormonálních a humorálních zprostředkovatelů. Pro správné a flexibilní řízení krvetvorby je nezbytný i dostatečný přísun bílkovin, vitamínů, minerálů a dalších látek potřebných pro krvetvorbu.

Bílkoviny a aminokyseliny jsou důležitými stavebními látkami.

Nejdůležitější z minerálů je železo, které je nezbytné pro tvorbu krevního barviva (hemoglobinu), na jeho vstřebávání má vliv měď. Důležitý je i kobalt, který je součástí vitamínu B<sub>12</sub>.

Z vitamínů se na krvetvorbě podílí především vitaminy skupiny B. Vitamin B<sub>12</sub> je nezbytný pro syntézu DNA (nukleových kyselin) a vitamin B<sub>6</sub> je důležitý pro zabudování železa do hemoglobinu. Využití železa a účinek vitamínu B<sub>12</sub> a kyseliny listové v organismu podporuje vitamin C. (*Hrubíško a kol. 1983; Sakalová kol. 1995*)

Hormony ovlivňují krvetvorbu prostřednictvím růstových faktorů. Mezi hormony podporující krvetvorbu řadíme růstový hormon, kortikosteroidy nadledvin, mužské pohlavní hormony a hormony štítné žlázy, opačně působí ženské pohlavní hormony.

Tvorbu růstových faktorů ovlivňuje také autonomní nervový systém, sympatikus a parasympatikus. (*Pecka 2002*)

### 1.2.2.1 Řízení tvorby červených krvinek

Tvorbu erytrocytů řídí erythropoetin. Jde o glykoprotein o molekulové hmotnosti 34 000, který je přítomný v plazmě ve frakci  $\alpha$ -globulinů a jeho hladina je stálá. Tvorba erythropoetinu probíhá hlavně v ledvinách. Pro buňky, které tvoří erythropoetin, je signálem pro jeho zvýšenou tvorbu hypoxie (snížené nasycení tkání kyslíkem). Zvýšení tvorby erythropoetinu má pak za následek urychlení tvorby a vyžívání erytrocytů od erytroidní progenitorové kmenové buňky až po zralý erytrocyt. Erythropoetin také pozitivně ovlivňuje tvorbu hemoglobinu a životnost erytrocytů. Dále ovlivňuje i vývoj krevních destiček, ale pro jejich vývoj není nutný. Nedostatek erythropoetinu například u těžkých degenerativních onemocnění ledvin, způsobuje anémii (chudokrevnost). Se zvýšením erythropoetinu se setkáváme po velkých ztrátách krve. (*Hrubíško a kol. 1983; Sakalová a kol. 1995*)

### 1.2.2.2 Řízení tvorby leukocytů

Regulace tvorby granulocytů a monocytů je řízena tzv. colony stimulující faktory (CSF-colony stimulating factors). CSF jsou glykoproteiny tvořené aktivovanými lymfocyty, monocyty, makrofágy a dalšími buňkami. Multi-CSF, nazývaný též interleukin 3 (IL-3), ovlivňuje progenitory všech vývojových řad. GM-CSF je růstovým faktorem, který ovlivňuje granulocytovou i monocytovou vývojovou řadu., ale částečně i vývojové řady erytrocytů a krevních destiček. Faktorem řídícím zralejší vývojové stupně u granulocytů je G-CSF a u monocytů je jím M-CSF. (*Hrubíško a kol. 1983; Sakalová a kol. 1995*)

### 1.2.2.3 Řízení tvorby trombocytů

Tvorbu krevních destiček řídí trombopoetin, bílkovina krevní plazmy, která vyvolává po snížení hladiny krevních destiček zvýšení jejich tvorby. (*Hrubíško a kol. 1983; Sakalová a kol. 1995*)

### 1.2.3 Vznik a vývoj krvinek

Buňka mezenchymu je výchozí buňkou všech krvinek. Diferencuje se v retikulární buňku, která se mění v hemocytoblast, jež se v zárodečném období stává kmenovou buňkou, pro kterou jsou charakteristické dvě vlastnosti, sebeobnova a možnost diferenciaci v kteroukoli buňku krvetvorby. Neustálá obnova opotřebovaných buněk a jejich náhrada novými je v kostní dřeni zajištěna stálou proliferační aktivitou nediferencované kmenové buňky tzn. že, při dělení kmenový buněk se dále diferencuje jen jedna dceřiná buňka a druhá zůstává kmenovou buňkou. (Pecka 2002; Sakalová a kol. 1995) Takovéto dělení se nazývá dělením asymetrickým. (Penka a kol. 2011) Diferenciací kmenové buňky vzniká pluripotentní kmenová buňka (z latiny plus = více, potens = schopný) (Pecka 2002). Pluripotentní kmenové buňky jsou buňkami krvetvorby, jejichž charakteristickým znakem je možnost vývoje jakýmkoli směrem. Kmenová pluripotentní buňka se tedy může proliferační (dělením) a následnou diferenciací (zráním) začít vyvíjet v určenou (progenitorovou) kmenovou buňku červené krevní řady, v určenou (progenitorovou) kmenovou buňku bílé krevní řady, nebo v určenou (progenitorovou) kmenovou buňku destičkové krevní řady. Tuto schopnost určená (progenitorová) kmenová buňka dané krevní řady už nemá, a proto může proliferační a diferencovat se pouze jedním již zvoleným směrem, například z určené (progenitorové) kmenové buňky červené krevní řady se může vyvinout jen mateřská buňka červené vývojové řady – proerytoblast. (Pecka 2002; Sakalová a kol. 1995)

#### 1.2.3.1 Vznik a vývoj červených krvinek (erytropoéza)

Erytropoéza je děj, při kterém se z nediferencovaných kmenových buněk nejprve tvoří prekursorů obsahující jádro. Po vypuzení jádra vznikají retikulocyty a z nich během 48 hodin dozrávají erytrocyty. (Pecka 2002)

#### 1.2.3.1.1 Normoblastová řada

První morfologicky rozpoznatelným vývojovým stádiem červené krvinky je proerytroblast, mateřská buňka erytrocytu. Proerytroblast je velká kulatá buňka s velkým kulatým jádrem převažujícím nad sytě modrofialovou cytoplazmou, která někdy mívá laločnaté výběžky. Ve středu buňky umístěné jádro obsahuje sytý, hustě síťovaný, tmavomodrý chromatin. V jádře proerytroblastu lze vidět dvě až čtyři jadérka zbarvená někdy ještě tmavěji než jaderný chromatin. (*Hrubíško a kol. 1983; Sakalová a kol. 1995*) Kolem jádra bývá proužek světlejší cytoplazmy tzv. perinukleární projasnění. (*Pecka 2002*) Od myeloblastu, mateřské buňky bílých krvinek, lze proerytroblast odlišit zbarvením jadérek, která jsou u myeloblastu zbarvena bledě modře.

Následujícími vývojovými stádii jsou bazofilní, polychromní a ortochromní normoblast, jejich názvy byly odvozeny podle barvy cytoplazmy v panoptickém barvení.

Bazofilní normoblast je asi o polovinu menší než proerytroblast. Jeho kulaté jádro obsahuje paprscitě uspořádaný sytě fialový chromatin. Mezi jednotlivými paprsky chromatinu prosvítá světlejší parachromatin. Cytoplazma bazofilního normoblastu je stále ještě tmavě modrofialová.

Polychromní normoblast je kulatá buňka s kulovitým jádrem, která obsahuje svraštělý, hutný chromatin. Jeho cytoplazma mění své zbarvení od nafialovělé až k šedohnědé díky postupnému přibývání hemoglobinu, který má afinitu ke kyselým barvivům, například k eozinu. Jádro se postupně zmenšuje a ztrácí svou funkci (tvorbu bílkovin), protože polychromní normoblast a další navazující vývojová stadia erytrocytu včetně erytrocytu získávají energii, jak jsem se již dříve napsala, pouze štěpením glukózy.

Ortochromní normoblast má již růžovou cytoplazmu, která se podobá cytoplazmě erytrocytu. Velikost normoblastu je již také srovnatelná s velikostí zralého erytrocytu. Ortochromní normoblast obsahuje ještě jádro, to je ale malé, svraštělé a hutné. V průběhu vyžívání se jádro posouvá na okraj buňky a následně je z ortochromního normoblastu vypuzeno. Po vypuzení jádra z cytoplazmy vzniká erytrocyt, který

prochází díky své pružnosti a schopnosti deformovat se mezi endotelovými buňkami drobných cév do krevního řečiště.

Zralý erytrocyt se tedy stal bezjadernou krvinkou, která dosahuje velikosti v průměru 7,2  $\mu\text{m}$ . Po vypuzení jádra mohou mít nejmladší erytrocyty v plazmě ještě zbytky původní struktury cytoplazmy, jako jsou například ribozomy, zbytky endoplazmatického retikula, aj., tyto mladé erytrocyty nazýváme retikulocyty. Běžným barvením je nelze odlišit, proto se pro jejich odlišení používá speciální tzv. vitální barvení. Pro vitální barvení nativních erytrocytů se používají vitální barviva, kterým je například brilantkresylová modř. Retikulocyty obarvené brilantkresylovou modří jsou zelené a na okrajích nebo uvnitř retikulocytů jsou viditelná tmavomodrá vlákna či zrna. (*Hrubiško a kol. 1983, Sakalová a kol. 1995*)

#### 1.2.3.1.2 Megaloblastová řada

Megaloblastová řada vzniká při nedostatku vitamínu B<sub>12</sub>. Jak již bylo dříve zmíněno při nedostatku vitamínu B<sub>12</sub> vážně trpí tvorba DNA. Vážnutí tvorby DNA má za následek vznik několika odlišností od řady normoblastové. Morfologickým odlišením od normoblastové řady je rozdíl ve velikosti, tvaru a nepoměru vyzrání jádra a cytoplazmy. Jednotlivá vývojová stádia megaloblastů jsou větší než srovnatelná vývojová stádia normoblastové řady a jejich tvar není kulatý, ale oválný. Nepoměr vyzrání jádra a cytoplazmy se projevuje tím, že jádro je méně vyzrálé než cytoplazma a to kvůli zmiňovanému nedostatku látek potřebných pro jeho zrání. Jádro megaloblastové řady má jemnější a řídkší strukturu chromatinu.

Mateřská buňka této vývojové řady se nazývá promegaloblast. Promegaloblast je velká oválná buňka obsahující jádro s jemným a řídkým chromatinem, díky kterému jsou lépe vidět jeho jadérka. Cytoplazma promegaloblastu je modrá, bazofilní s větším projasněním okolo jádra.

Další vývojové stádium megaloblastové řady nazýváme bazofilní megaloblast, který má bohatou bazofilní cytoplazmu a jádro s jemným chromatinem již bez jadérek.

Vývojová řada dále pokračuje polychromním megaloblastem. Projevuje se zde výrazné zaostávání vyzrání jádra za cytoplazmou. Jádro je zde nevyzrálé s hrudkovitým chromatinem, oproti němu je cytoplazma vyzrálější šedomodrá až šedorůžová díky přibývajícimu hemoglobinu.

Za polychromním megaloblastem následuje ortochromní megaloblast, jehož cytoplazma je sytě růžová. Excentrické (uložené mimo střed) jádro polychromního megaloblastu má síťovitou strukturu a jeho chromatin je hustší, ale stále ještě jemný.

Konečným vývojovým stádiem megaloblastové řady je megalocyt. Zbarvení megalocytu je sytě růžové, způsobené vyšším obsahem hemoglobinu. Megaloblastová krvetvorba se fyziologicky vyskytuje v zárodečné krvetvorbě a její výskyt v dospělosti je patologický. (*Hrubíško a kol. 1983, Sakalová a kol. 1995*)

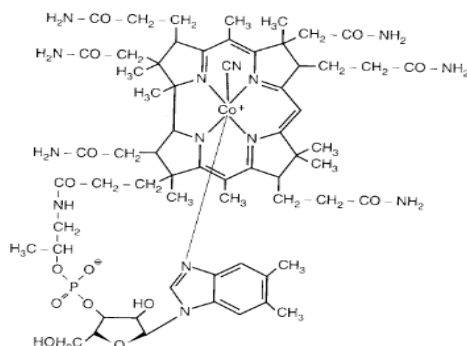
#### 1.2.3.2 Tvorba a vývoj bílých krvinek

V kostní dřeni z pluripotentní kmenové buňky vzniká určená kmenová buňka společná pro všechny bílé krvinky a z ní se diferencuje mateřská buňka společná pro granulocyty (všechny tři typy) a monocyty a mateřská buňka pro lymfocyty a plazmatické buňky. (*Hrubíško a kol. 1983*) Vývojová stádia granulocytopoézy jsou myeloblast, promyelocyt, myelocyt, metamyelocyt, tyč a segment. Jednotlivé druhy granulocytů, neutrofilů, eozinofilů, bazofilů, od sebe odlišujeme pomocí specifických granulí v cytoplasmě. Jak již bylo zmíněno, ze společné mateřské buňky se vyvíjí i promonocyt a následně monocyt. (*Sakalová a kol. 1995*)

#### 1.2.3.3 Tvorba a vývoj krevních destiček

Z pluripotentní kmenové buňky (v kostní dřeni) vzniká promegakaryoblast a z něj morfologicky rozpoznatelný megakaryoblast, z něhož se vyvíjí promegakaryocyt. Z promegakaryocytu následně vzniká megakaryocyt, ze kterého odštěpením kousků cytoplazmy vznikají krevní destičky (trombocyty). (*Hrubíško a kol. 1983; Sakalová a kol. 1995*)

## 1.3 Vitamin B<sub>12</sub>



Vitamin B<sub>12</sub> patří do skupiny látek zvaných kobalaminy. (Čermáková, M. a kol. 2005) Jeho struktura je složitá a do určité míry podobná hemu, skelet je příbuzný porfyrinu a obsahuje komplexně vázaný atom kobaltu (Co). Vitamin B<sub>12</sub> bývá označován též jako kyanokobalamin. V lidském organismu se vyskytuje i několik dalších funkčních forem vitaminu B<sub>12</sub>, patří mezi ně např. hydroxokobalamin, methylkobalamin, adenolyskobalamin, kobalamin R, kobalamin S. Kobalaminy představují koenzymy pro celé řady enzymatických reakcí. Podílí se např. na intracelulárním přeskupování methylových skupin při degradaci mastných kyselin a dalším přenosu těchto skupin. Dále se tyto koenzymy podílejí na syntéze nukleových kyselin, metabolismu aminokyselin a bílkovin. (Hlúbik 2004)

### 1.3.1 Zdroj vitaminu B<sub>12</sub>

Zdrojem vitaminu B<sub>12</sub> je maso, hlavně býložravců, mléko a vejce. Denní spotřeba je malá - 1,6-4 µg. Zásoba v organismu je poměrně velká – 2-4 mg. Při náhlé poruše resorpce (vstřebávání), proto vzniká deficit pomalu. Dlouhodobé využívání zásob pak má za následek postupnou adaptaci organismu na nastupující anemii (chudokrevnost). Hladina vitaminu B<sub>12</sub> je v krvi za fyziologických okolností 160-900 ng/l. (Penka a kol. 2001)



### 1.3.2 Metabolismus vitamínu B<sub>12</sub>

Pro správné vstřebávání (resorpci) vitamínu B<sub>12</sub> v tenkém střevě (ileum) je nezbytný tzv. **vnitřní faktor**, glykoprotein, který je tvořen parietálními buňkami sliznice žaludku. Vnitřní faktor tvoří s vitamínem B<sub>12</sub> (tzv. zevní faktor) komplex vázající se na specifické receptory sliznice tenkého střeva. Jen v této podobě se může vitamín B<sub>12</sub> dostat přes sliznici střeva do krve. V tlustém střevě je vitamín B<sub>12</sub> tvořen činností střevních bakterií, ale zde se již nevstřebává. (*Penka a kol. 2001; Starý et al. 2005*)

Po transportu komplexu vnitřní faktor – vitamín B<sub>12</sub> do enterocyту je komplex disociován (štěpen) a vitamín B<sub>12</sub> přechází přes bazální membránu enterocyту (střevní buňky) do krevního řečiště. (*Starý et al. 2005*) Po přestupu do krve je vitamín B<sub>12</sub> vázán na transportní bílkovinu transkobalamin. Transkobalamin jej následně transportuje do míst krvetvorby, nebo do zásob (př. do jater). (*Penka a kol. 2001*)

### 1.3.3 Funkce vitamínu B<sub>12</sub>

Vitamín B<sub>12</sub> je nezbytný pro krvetvorbu, nervovou soustavu a růst, podílí se i na metabolismu tuků a cukrů a zlepšuje obranyschopnost. (*Čermáková, M. a kol. 2005*) Společně s kyselinou listovou je nezbytným faktorem při syntéze DNA a s tím související syntézu nukleových kyselin, dělením buněk, růstem a vývojem buněk, např. erytrocytů. Dále se účastní přeměny homocysteinu na cystein. (*Dastych a kol. 2008*)

### 1.3.4 Nedostatek vitamínu B<sub>12</sub>

Snížení vitamínu B<sub>12</sub> nebo kyseliny lisové, či obou vitamínů najednou vede ke zvýšení RNA v hemopoetických buňkách což vede ke snížení podílu DNA v celkovém obsahu nukleových kyselin. Morfologicky se porucha syntézy nukleových

kyselin projeví zvýšením objemu (velikosti) prekurzorů červené krevní řady, která je provázená zřetelným nepoměrem mezi zralostí jádra a cytoplazmy. Bílá krevní řada je také větší a jádra zralých neutrofilů jsou hypersegmentována. Jako důsledek poruchy buněčného dělení se může u megakaryocytů vyskytnout zvýšená lobulizace jádra. Veškeré tyto změny jsou souhrnně označovány jako megaloblastická přestavba hemopoézy. V periferní krvi pak mluvíme o megaloblastové anémii, která může být spojena s neutropenií a trombocytopenií.

K snížení hladiny vitamínu B<sub>12</sub> může dojít z různých příčin. Z pohledu metabolismu vitamínu B<sub>12</sub> může dojít k několika poruchám.

Za prvé může dojít k poruše absorpce vitamínu B<sub>12</sub> střevní sliznicí. Vitamin B<sub>12</sub> nemůže být absorbován střevní sliznicí bez vazby na vnitřní faktor. Kvantitativní či kvalitativní defekt vnitřního faktoru následně vede k poruše jeho vstřebávání. Kromě vazby vitamínu B<sub>12</sub> na vnitřní faktor musí dojít i k vazbě na hydrofobní protein cubilin transportující komplex vnitřní faktor-vitamin B<sub>12</sub> do enterocytu, který může být také defektní.

Druhou porucha může být způsobena poruchou transportu vitamínu B<sub>12</sub>. Deficit transkobalaminu má za následek omezený přístup vitamínu B<sub>12</sub> k cílové buňce.

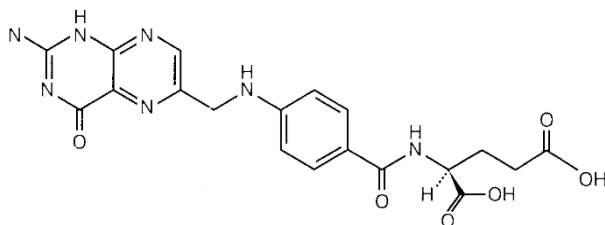
A třetí porucha může být v intracelulárním metabolismu vitamínu B<sub>12</sub>. (*Stary et al. 2005*)

K deficitu vitamínu B<sub>12</sub> v důsledku malabsorpce dochází např. u atrofické gastritidy. Sliznice žaludku je v důsledku zánětu ztenčená a vyhlazená. Rozvoj atrofické gastritidy může proto vést k snížení absorpce vitamínu B<sub>12</sub>. (*Santarelli et al. 2004*)

Chronická expozice oxidu dusného (N<sub>2</sub>O) může vést k významnému nedostatku vitamínu B<sub>12</sub>. Oxid dusný inaktivuje kobalamin, tím se zablokují další reakce, které jsou potřebné pro tvorbu myelinových pochev a syntézu DNA. (*Shulman et al. 2007*)

Deficit vitamínu B<sub>12</sub> se vyskytuje také u alkoholiků. Chronické působení alkoholu má nepříznivý vliv na metabolismus folátů, vitamínu B<sub>6</sub> a vitamínu B<sub>12</sub>. (*Fragasso et al. 2010*) Deficit vitamínu B<sub>12</sub> může mít také za následek vznik deprese. (*Etgen et al. 2011*)

## 1.4 Kyselina listová



Patří mezi vitaminy skupiny B. (Penka a kol. 2001) Chemickým názvem kyseliny listové je kyselina pteroylglutamoná, ale můžeme ji nalézt i pod jinými názvy např. folacin, vitamin Bc nebo vitamin B<sub>9</sub>. (Čermáková, M. a kol. 2005)

### 1.4.1 Zdroj kyseliny listové

Zdrojem kyseliny listové je listová zelenina, kvasnice, maso a vnitřnosti. Normální denní spotřeba kyseliny listové je méně než 1 mg, stoupá při dělení buněk, např. růst, těhotenství, hojení rozsáhlých ran, hemolytické anémie, aj. Zásoby kyseliny listové v organismu činí asi 6 - 10 mg a její hladina v krvi je 3 - 20 µg/l. (Penka a kol. 2001)

### 1.4.2 Metabolismus kyseliny listové

Na metabolismu kyseliny listové se podílí řada enzymových systémů. V enterocyty je kyselina listová přeměňována na N<sup>5</sup>-methyltetrahydrofolát. Ten je navázán na sérové proteiny transportován do krevního řečiště. Následně putuje do buněk, kde je rekonjugován, a zapojuje se jako kofaktor do reakcí zahrnujících biosyntézu purinů a pyrimidinů, serinu a methioninu, a degradaci histidinu. (Stary et al. 2005)

### 1.4.3 Funkce kyseliny listové

Kyselina listová je nezbytná pro správnou funkci nervového systému a kostní dřeně. Zapojuje se do syntézy nukleových kyselin a metabolismu aminokyselin. (homocysteinu => methionin) (Čermáková, M. a kol. 2005)

### 1.4.4 Nedostatek kyseliny listové

Deficit kyseliny listové se projevuje podobně jako deficit vitamínu B<sub>12</sub>. (Racek a kol. 2006) Důvodem podobnosti klinických a laboratorních nálezů u obou vitamínů je vzájemná propojenost metabolismu vitamínu B<sub>12</sub> a kyseliny listové, v němž se N<sup>5</sup>-methyltetrahydrofolát jako kofaktor podílí na metabolismu methylkobalaminu při remetylaci homocysteinu na methionin. (Starý et al. 2005)

Ke vzniku nedostatku kyseliny listové může vést těhotenství, infekce, nádorové onemocnění, coeliakie, alkoholismus, aj. (Čermáková, M. a kol. 2005)

## 1.5 Megaloblastové anemie

Pod pojmem megaloblastové anemie zahrnuje skupinu chorob různé patogeneze se společnými morfologickými a funkčními změnami v krvi i kostní dřeni. Příčinou těchto změn je už zmiňovaný deficit vitamínu B<sub>12</sub> nebo kyseliny listové. Nedostatek vitamínu B<sub>12</sub> způsobuje tvorbu jen krátkých fragmentů DNA (tzv. Okazakiho fragmenty) čímž dochází k porušení normálního metabolismu buněk a jejich setrvání v S-fázi mitózy. (Friedmann 1995; Penka a kol. 2001)

Megaloblastová anemie je tedy onemocnění způsobené poruchou syntézy DNA. Charakteristické jsou pro ni megaloblastické buňky typicky přítomné v erytroidní vývojové řadě. Jde o velké buňky s nezrale vyhlížejícím jádrem, ale s rostoucí hemoglobinizací cytoplazmy, která bývá označována jako jaderno-cytoplazmová asynchronie. Jsou přítomny i megaloblastické prekurzory granulocytů a megakaryocyty mohou být abnormálně velké s jadernými abnormalitami. (Beutler et al. 1996)

### 1.5.1 Příčiny vzniku

Příčiny vzniku megaloblastových anemií mohou být v žaludku, střevě nebo i jinde.

Gastrogenní (žaludeční) příčinou je např. perniciózní anemie. Perniciózní anemie je autoimunním onemocněním, při kterém se díky přítomnosti několika různých protilátek naruší vstřebávání vitamínu B<sub>12</sub> z gastrointestinálního (zažívacího) traktu. Protilátky jsou namířeny buď proti parietálním buňkám, které pak tvoří vnitřní faktor, nebo mohou být protilátky namířeny přímo proti vnitřnímu faktoru. (*Penka a kol. 2001*) Proto lidé trpící tímto onemocněním tvoří malé množství vnitřního faktoru. (*Friedmann 1994*) Dalšími protilátkami jsou tzv. blokuující protilátky, které brání vazbě komplexu vnitřní faktor-vitamin B<sub>12</sub> na receptor v tenkém střevě. (*Penka a kol. 2001*)

Postresekreční megaloblastické anemie vznikají po totální, rozsáhlé i částečné resekci žaludku v důsledku nedostatečné tvorby vnitřního faktoru. (*Friedmann 1994*)

Mezi enterogenní (střevní) příčiny patří celiakální sprue (primární malabsorpce), Crohnova choroba, selektivní malabsorpce vitamínu B<sub>12</sub> s proteinurií, syndrom stagnující (slepé) kličky, resekce ilea, vrozený defekt a nákaza škulovcem.

K primární (prvotní) malabsorpci (nedostatečnému vstřebávání) vitamínu B<sub>12</sub> dochází u celiakální sprue.

Selektivní malabsorpce s proteinurií (proteiny v moči) je geneticky podmíněná porucha resorpce vitamínu B<sub>12</sub> se zachovanou sekrecí vnitřního faktoru a kyseliny chlorovodíkové.

Bakteriální kolonizaci tenkého střeva umožňují anatomické poruchy tenkého střeva, kterými jsou např. slepé kličky vzniklé Crohnovou chorobou, podporující stagnaci jeho obsahu. Při stagnaci střevního obsahu dochází k pomnožení bakterií. Některé z nich dokážou vázat vitamin B<sub>12</sub>, nebo komplex vnitřní faktor-vitamin B<sub>12</sub>. Pokud „soutěží“ o vitamin B<sub>12</sub> „vyhrají“ bakterie dojde ke vzniku megaloblastové anemie.

Resekce 100 – 120 centimetrů ilea vede též k malabsorpci vitamínu B<sub>12</sub>. (*Friedmann 1994*)

Škulovec neboli *Diphyllobothrium latum* je střevní parazit z nedostatečně tepelně upravených mořských ryb. (Kubisz a kol. 2005) Parazit ochuzuje svého hostitele akumulací vitamínu B<sub>12</sub> a při jeho přemnožení v tenkém střevě pak může vzniknout megaloblastová anemie.

K jiným příčinám řadíme megaloblastové anemie způsobené nutričním nedostatkem, zvýšenou spotřebou vzniklou růstem či těhotenstvím, podáním léků, ztrátami při hemodialýze, vrozeným nedostatkem transkobalaminu II, jaterními chorobami aj.

Nutriční (výživové) megaloblastové anemie vznikají z důvodu nedostatku vitamínu B<sub>12</sub> a kyseliny listové ve stravě. Po vyčerpání zásob vzniká u jedinců s nedostatečným přísunem zeleniny, vajec a masa deficit (nedostatek). Častým případem jsou staří lidé, kteří nemají snahu nebo možnost se správně stravovat.

Těhotenská megaloblastová anemie vzniká důsledkem zvýšené spotřeby vitamínu B<sub>12</sub> i kyseliny listové, protože plod si bere potřebné množství bez ohledu na to, zda matka má či nemá dostatečné zásoby. Tento typ anemie by neměl existovat v žádné zemi s vyspělým zdravotnictvím.

Ke zvýšené spotřebě dochází také u hemolytických anemií, paroxysmální noční hemoglobinurie, talasemie a myeloproliferativních chorob.

Megaloblastová anemie se vyskytuje i u alkoholiků, u kterých bývají přítomny jaterní choroby a strava chudá na vitamíny. Alkohol působí tlumivě na erytropoézu, ale megaloblastovou anemii sám nevyvolá, pokud nedojde i k výživovému nedostatku vitamínů.)

Řada léků může vyvolat polékovou megaloblastovou anemii. Mezi ně se řadí např. kyselinu paraaminosalicylovou (PAS), kolchicin, neomycin, metotrexát, pyrimetamin, trimetoprim, které zhoršují vstřebávání vitamínu B<sub>12</sub>.

Do polékových megaloblastových anemií se řadí i akutní megaloblastovou anemii vzniklou účinkem oxidu dusného (N<sub>2</sub>O, „rajský plyn“), který je používán při anestezii. Oxid dusný působí ve tkáních rychlou destrukci metylkobalaminu, což vede během 12-24 hodin k megaloblastovým změnám kostní dřeně. K návratu do původního stavu dochází za několik dní.

Při dialýze dochází ke ztrátám kyseliny listové. Kyselina lisová není na rozdíl od vitamínu B<sub>12</sub> pevně vázaná na bílkovinný nosič, a proto se dá snadno oddialyzovat.

Vrozený nedostatek transkobalaminu II znemožní odevzdání vitamínu B<sub>12</sub> cílovým buňkám. (*Friedmann1994*)

## **2. Cíl práce a hypotézy**

### **2.1 Cíl práce**

- Zjistit četnost zvýšení MCV
- Na vzorku lidí se známým deficitem vitamínu B<sub>12</sub> a kyseliny listové provést vyšetření KO se zaměřením na charakteristické morfologické změny
- Pokusit se určit vztah mezi závažností deficitu a stupněm morfologických změn

### **2.2 Hypotézy**

- Při zvýšení hodnot MCV najdeme ve vysokém procentu deficit vitamínu B<sub>12</sub> a kyseliny listové.
- Při deficitu vitamínu B<sub>12</sub> a kyseliny listové najdeme ve vysokém procentu zvýšené hodnoty MCV.



## 3. Metodika

V této kapitole popíši postup zpracování vzorků, které byly zpracovány v laboratoři klinické hematologie Nemocnice České Budějovice a.s. a v laboratoři klinické chemie Nemocnice České Budějovice a.s., použítá data jsem získala během praxe k této bakalářské práci.

### 3.1 Příjem materiálu do laboratoře

Začátek zpracování vzorku v laboratoři začíná příjmem materiálu. Ten do laboratoře přichází spolu s žádankou o vyšetření. Na žádance musí být vyplněno jméno pacienta, jeho rodné číslo, druh materiálu, čas odběru, kód diagnózy a zdravotní pojišťovny. Dále musí obsahovat oddělení, kde je pacient ošetřován, jméno doktora, který žádanku vydal a jméno sestry, která odběr materiálu provedla.

Pokud je žádanka vyplněna neúplně, musí se chybějící údaje doplnit, kontaktováním sestry nebo doktora na příslušném oddělení.

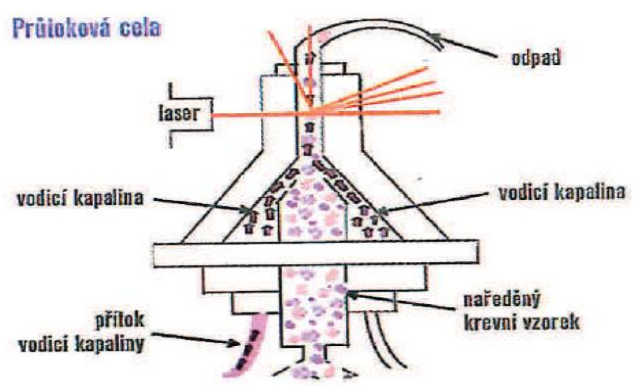
Materiál (zkumavka) je při odběru označen identifikačním štítkem a je nutné zkontrolovat shodu s žádankou. Po zkontrolování shody údajů žádanky a zkumavky dostane jak žádanka, tak zkumavka čárkový kód, pod kterým je pak pacient veden v laboratorním informačním systému (LIS).

Samotná zkumavka (materiál) se při příjmu také kontroluje, jestli obsahuje např. dostatek materiálu nebo jestli nedošlo ke sražení vzorku.

Na vyšetření krevního obrazu přichází krev do laboratoře ve zkumavkách (vakueta) s fialovým uzávěrem, které obsahují antikoagulační přípravek EDTA, tedy krev nesrážlivá.

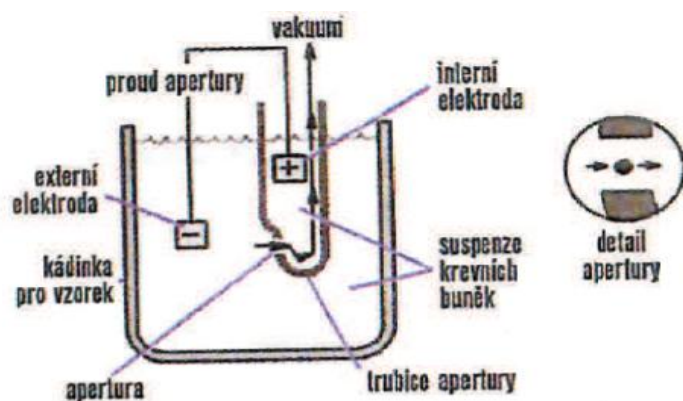
## 3.2 Zpracování vzorku v analyzátoru Coulter LH 750

Až po zadání údajů ze žádanky do laboratorního informačního systému se může zkumavka se vzorkem začít zpracovávat. Obsah zkumavky se před vložením do analyzátoru musí promíchat (homogenizovat), buď několikanásobným pomalým otočením o 180 °v ruce, nebo 10 minutovým promícháním zkumavky na speciálním valčím zařízení tzv. „třepačce“. Promíchané zkumavky se skládají do speciální kazety tak, aby byl kód na zkumavkách čitelný pro čtečku analyzátoru. V této kazetě se následně vkládají do zásobníku umístěného na pravé straně analyzátoru. Zkumavky jsou pak posouvány ke čtečce kódů a k jehle, která propíchně gumu ve víčku zkumavky a nasaje potřebné množství vzorku. Vzorek je rozdělen pro dvě různá zpracování. Jedna část vzorku je pouze ředěna a následně použita pro vyšetření erytrocytů (RBC) a trombocytů (Plt). Druhá část vzorku je smíchávána ještě s lyzačním činidlem a stabilizačním roztokem pro DIFF analýzu a použita pro vyšetření leukocytů (WBC). Takto připravené suspenze vzorku jsou do měřicí kyvety vháněny vakuem. Aby se zabránilo souběžnému vstupu buněk do měřicí kyvety, koincidenci, využívá se systému hydrodynamické fokusace. Hydrodynamická fokusace způsobí řazení buněk za sebe a tím jejich jednotlivý vstup do měřicí kyvety.



Počet a velikost buněk v kapalině je měřena metodou elektrické impedance. Ta vychází ze změny elektrického odporu při průchodu buněk, unášených kapalinou, malou aperturou. Průchod jednotlivé buňky aperturou zvýší v danou chvíli odpor mezi

dvěma elektrodami. Dojde ke vzniku elektrického impulsu a takto vyvolaný elektrický impuls je načítán a měřen. Tyto impulsy poskytují kvantitativní (počet impulsů) a kvalitativní (velikost impulsů) informace o měřených buňkách. Software z naměřené impulsy přepočte na požadované parametry, např. hodnotu MCV vypočte software aritmetickým průměrem všech naměřených impulsů.



### 3.3 Krevní nátěr

Během své praxe jsem z analyzátořem vyhodnocených krevních obrazů vybírala krevní obrazy s vysokými hodnotami MCV. U těchto vzorků jsem zhotovovala a barvila krevní nátěry. Tyto nátěry jsem pak prohlížela mikroskopem a zaměřovala jsem se především na morfologii erytrocytů.

#### 3.3.1 Zhotovení krevního nátěru

Na odmaštěné čisté podložní sklíčko se nanese kapka krve z předem promíchané zkumavky. Kapku umístíme k levému kratšímu okraji. Kratší hranu roztíracího sklíčka přiložíme ke sklíčku podložnímu a posouváme jím, dokud nenarazíme na kapku krve. Při kontaktu s kapkou počkáme, až se kapka roztáhne po celé hraně roztíracího sklíčka. Pak roztírací sklíčko naklopíme do úhlu 30 - 40° ke sklíčku podložnímu a rovnoměrným tlakem a pohybem roztíracího sklíčka směrem k druhému konci

podložního sklíčka kapku roztáhneme. Správně zhotovený nátěr by měl být rovnoměrný a postupně se ztenčující a neměl být delší než  $\frac{3}{4}$  podložního sklíčka.

### 3.3.2 Barvení krevního nátěru

Nátěr necháme na sklíčku zaschnout při pokojové teplotě a označíme ho číslem vzorku a jménem pacienta. Suchý nátěr necháme fixovat 5 minut v metanolu. Nátěr vyndáme z metanolu a ponoříme 5x na 1 sekundu do roztoku May-Grünwald. Po té ponoříme nátěr 11x na 1 sekundu do roztoku Giemsa-Romanovsky. Obarvený nátěr opatrně opláchneme pod tekoucí studenou vodou.

### 3.3.3 Hodnocení krevního nátěru

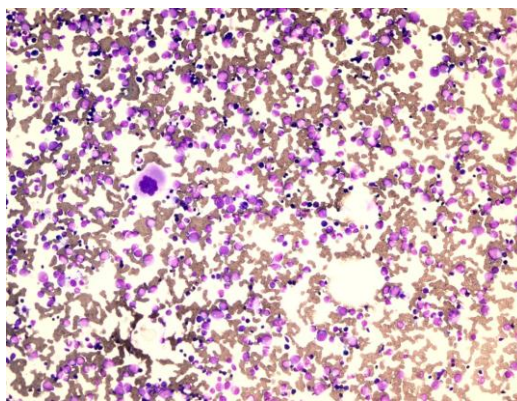
Obarvené nátěry se prohlíží imerzním objektivem mikroskopu. Na preparát je nutné nanést kapku imerzního oleje. Hodnotí se část preparátu, kde vrstva buněk není moc tenká ani moc tlustá. V tenkých částech nátěru je buněk málo a jsou zde nahrnutý poškozené a velké buňky. V tlustých částech nátěru se nachází záplava buněk a preparát je proto nepřehledný. Ve vybrané části se preparát čte tzv. meandrovitým pohybem. Diferenciální rozpočet leukocytů se počítá na 100 buněk.

## 3.4 Nátěr kostní dřeně

Dále jsem během své praxe pod dohledem atestované laborantky četla archivované nátěry kostní dřeně. Zaměřila jsem se především na nátěry pacientů, kteří měli kostní dřeň s megaloblastickými změnami. Megaloblastové změny kostní dřeně jsem již popsala v literárním přehledu.

Kostní dřeň získáváme punkcí z kostí, kde se krvetvorná kostní dřeň vykytuje, nejčastěji z lopaty kosti kyčelní nebo ze sternu (kosti hrudní). Zhotovení a barvení nátěru kostní dřeně je totožné s nátěrem periferní krve. Imerzním objektivem se v preparátu čte 600 buněk.

Rozdíly mezi nátěrem periferní krve kostní dřeně jsou v počtu buněk. V nátěru kostní dřeně je buněk mnohem více a jsou zde vidět jednotlivá vývojová stadia všech řad. Kdežto v nátěrech periferní krve jsou za fyziologických okolností vidět pouze konečná vývojová stadia krevních buněk.



nátěr kostní dřeně

### 3.5 Stanovení vitamínu B<sub>12</sub>

Materiálem pro stanovení vitamínu B<sub>12</sub> je sérum, heparinizovaná plazma nebo EDTA plazma. Pro stanovení v analyzátoru ADVIA Centaur je potřeba jen 100 µl vzorku.

#### 3.5.1 Princip metody

Stanovení ADVIA Centaur VB12 je kompetitivní imunoanalytická metoda založená na přímé chemiluminiscenci, ve které vitamin B<sub>12</sub> ze vzorku pacienta soutěží s vitamínem B<sub>12</sub> značeným akridium esterem v reagentii Lite o vazbu na omezeném množství vnitřního faktoru, který je kovalentně vázaný na paramagnetické částice v pevné fázi. Toto stanovení využívá reagentii Releasing agent (hydroxid sodný,

NaOH) a DTT pro uvolnění vitamínu B12 z vnitřních vazebných proteinů ve vzorku, a také aby se zabránilo zpětnému navázání na proteiny po tom, co je pevná fáze přidána do vzorku.

### 3.5.2 Analyzátor ADVIA Centaur

Analyzátor nejprve promyje jehlu 100 µl pomocných reagensů. Pak do kyvety napipetuje 100 µl vzorku, 115 µl reagensie DTT/Releasing Agent, 200 µl pevné fáze a inkubuje 5 minut při 37 °C. Následně přidá 200 µl reagensie Lite a inkubuje 2,5 minuty při 37 °C => oddělení, odsátí, promytí => 300 µl reagensie Acid a Base pro spuštění chemiluminiscenční reakce.

## 3.6 Stanovení kyseliny listové (Folát)

Materiálem pro stanovení kyseliny listové je sérum, kterého je pro stanovení v analyzátoru ADVIA Centaur potřeba 150 µl (materiál citlivý na světlo).

### 3.6.1 Princip metody

Stanovení ADVIA Centaur Folate je kompetitivní imunochemická analýza využívající přímou chemiluminiscenci. Foláty ze vzorku pacienta soutěží s akridium esterem značeným foláty obsaženými v reagensii Lite o omezený počet biotinem značených folát-vázajících proteinů. Biotinem značené folát-vázající proteiny se váží k avidinu, který je kovalentně vázán na paramagnetické částice obsažené v pevné fázi. Při stanovení ADVIA Centaur Folate dochází k uvolnění folátů z endogenních vazebných proteinů.

### 3.6.2 Analyzátor ADVIA Centaur

Analyzátor napipetuje do kyvety 150  $\mu$ l vzorku, 50  $\mu$ l DTT/Releasing Agent, 100  $\mu$ l reagentie Lite a inkubuje 2,5 minuty při 37 °C => oddělení, odsátí, promytí => 300  $\mu$ l reagentie Acid a Base pro zahájení chemiluminiscenční reakce.

## 4. Výsledky

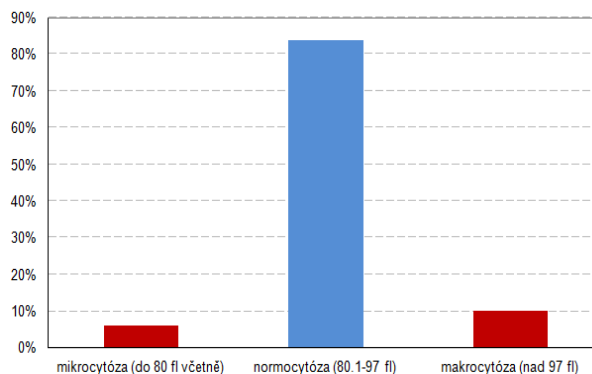
V období 1. 1. – 30. 4. 2012 bylo v laboratoři Klinické hematologie Nemocnice České Budějovice a. s. vyšetřeno 40 079 krevních obrazů. Vzorčky byly zpracovány na analyzátoru Coulter LH 750, který pracuje na principu elektrické impedance.

K 394 krevním obrazům byla ve stejném období vyšetřena v laboratoři Klinické chemie Nemocnice České Budějovice a.s. hladina vitamínu B<sub>12</sub> a kyseliny listové. Makrocytóza byla přítomna u 23 % těchto pacientů.

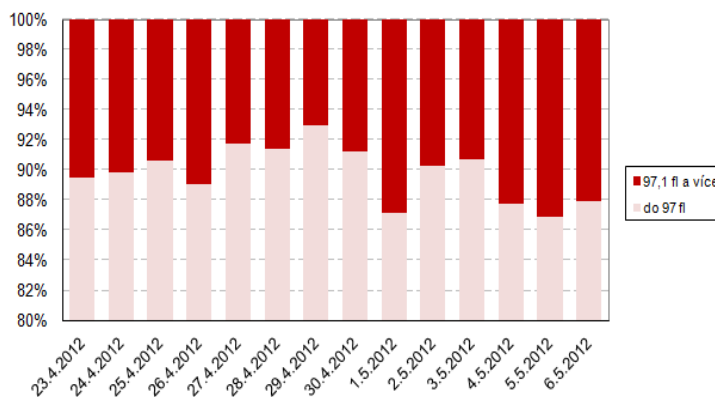
Z uvedeného počtu vyšetřených vzorků krevních obrazů v období 1. 1. – 30. 4. 2012 byla u 8,8 % vzorků nalezena vysoká hodnota MCV, tedy makrocytóza.

U 4 511 krevních obrazů v období 23. 4 – 6. 5. 2012 byla makrocytóza nalezena u 10,1 % vyšetřených vzorků. Fyziologické hodnoty MCV mělo 84 % krevních obrazů. Nízké hodnoty MCV, tedy mikrocytózu mělo 6 % krevních obrazů.

Procentuální zastoupení rozdělení erytrocytů podle MCV

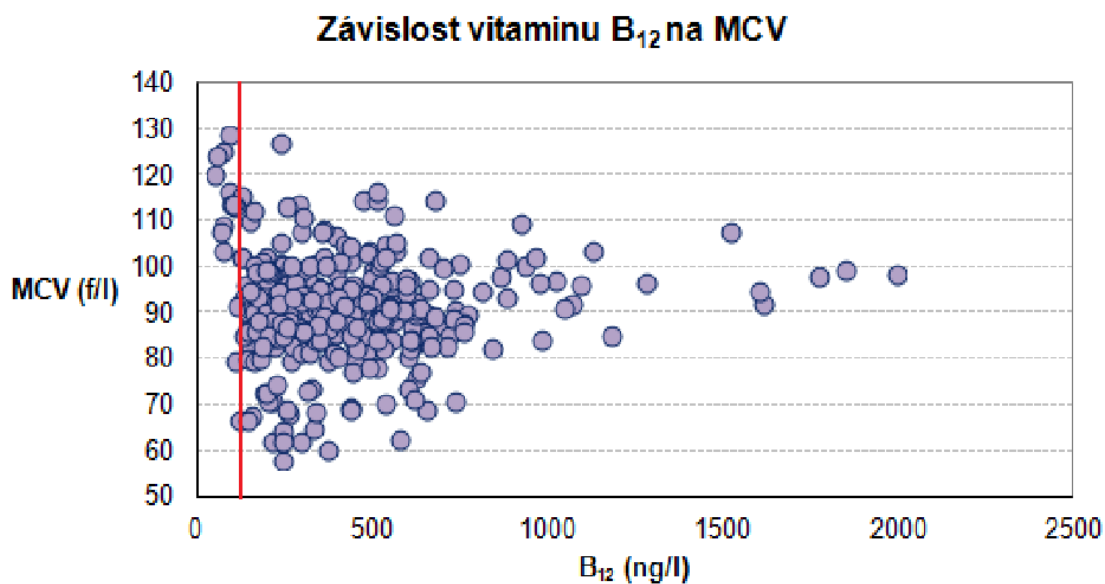


Četnost výskytu makrocytózy v jednotlivých dnech vybraného období

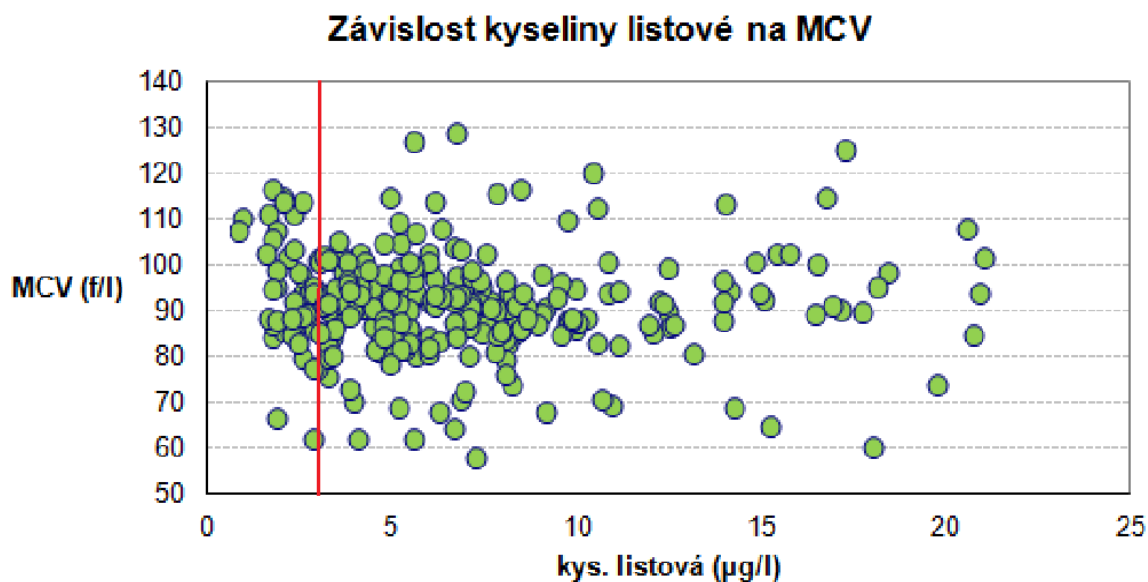




V období 1. 1. – 30. 4. 2012 byla u 362 krevních obrazů vyšetřena hladina vitamínu B<sub>12</sub>. Toto množství odpovídá zhruba 1 % vyšetřených krevních obrazů. Ve vyšetřované skupině vzorků bylo 60 % žen a 40% mužů. Věkový rozptyl pacientů byl od 1 roku až po 99 let, střední hodnota byla 63 let. Střední naměřená hodnota vitamínu B<sub>12</sub> byla 341 ng/l. Nejnižší naměřená hodnota byla 53 ng/l a nejvyšší naměřená hodnota byla 1992 ng/l. Makrocytóza byla přítomna v 4 % případů. Z uvedeného grafu vyplývá, že při deficitních hodnotách hladiny vitamínu B<sub>12</sub> dochází ke zvýšení hodnot MCV. Jako mezní hodnota deficit vitamínu B<sub>12</sub> byla zvolena hodnota 150 ng/l. Tato hodnota byla vyznačena na grafu.



V období 1. 1. – 30. 4. 2012 byla u 291 krevních obrazů vyšetřena hladina kyseliny listové. Toto množství odpovídá 0,7 % vyšetřených krevních obrazů. Ve vyšetřované skupině bylo 60 % žen a 40 % mužů. Věkový rozptyl pacientů byl od 1 roku až po 99 let, střední hodnota byla 63 let. Střední naměřená hodnota kyseliny listové byla 5,5  $\mu\text{g/l}$ . Nejnižší naměřená hodnota byla 0,8  $\mu\text{g/l}$  a nejvyšší naměřená hodnota byla 21  $\mu\text{g/l}$ . Makrocytóza byla přítomna v 6,5 % případů. Z uvedeného grafu vyplývá, že při deficitních hodnotách hladiny kyseliny listové dochází ke zvýšení hodnot MCV. Jako mezní hodnota deficitu kyseliny listové byla zvolena hodnota 3,1  $\mu\text{g/l}$ . Tato hodnota byla vyznačena na grafu.

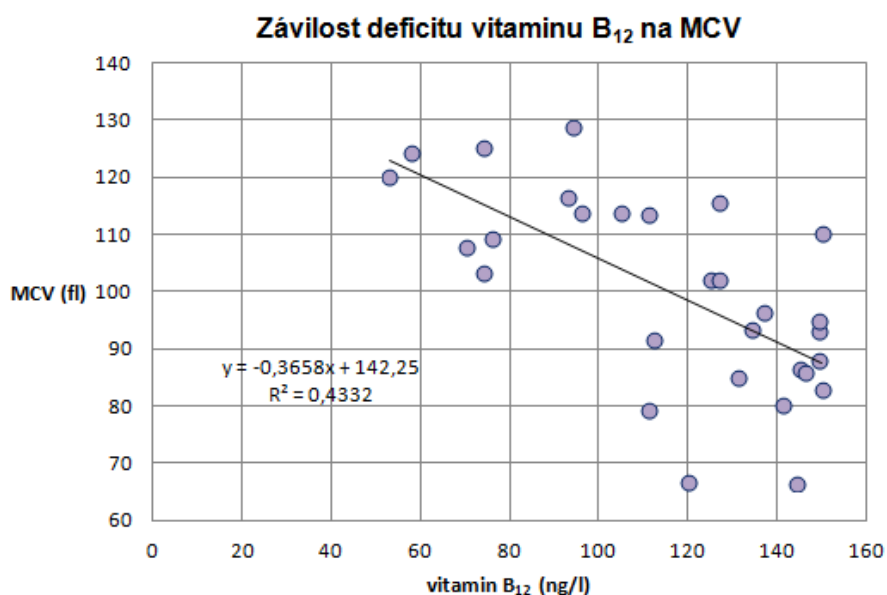


Vzorků s deficitem vitamínu B<sub>12</sub> bylo vyšetřeno 29. Představovaly tedy 8 % z celkového počtu stanovených hladin vitamínu B<sub>12</sub> patřících k vyšetřeným krevním obrazům. Z uvedeného počtu představovali ženy 66 % vzorků a muži 34 % vzorků. Věkový rozptyl byl od 21 do 92 let, střední hodnota byla 65 let.

Střední naměřená hodnota vitamínu B<sub>12</sub> byla 125 ng/l a střední hodnota MCV byla u těchto vzorků 102,2 fl. Makrocytóza byla přítomna u 52 % pacientů. Nejnižší hodnota vitamínu B<sub>12</sub> byla 53 ng/l a nejnižší hodnota MCV byla 66,6 fl. Hodnota hranice deficitu vitamínu B<sub>12</sub> byla 150 ng/l, v případě této skupiny pacientů byla zároveň hodnotou nejvyšší. Nejvyšší zaznamenaná hodnota MCV byla 128,8 fl.

Z přiloženého grafu vyplývá, že čím vyšší je deficit, respektive čím je hladina vitamínu B<sub>12</sub> nižší, tím je vyšší hodnota MCV.

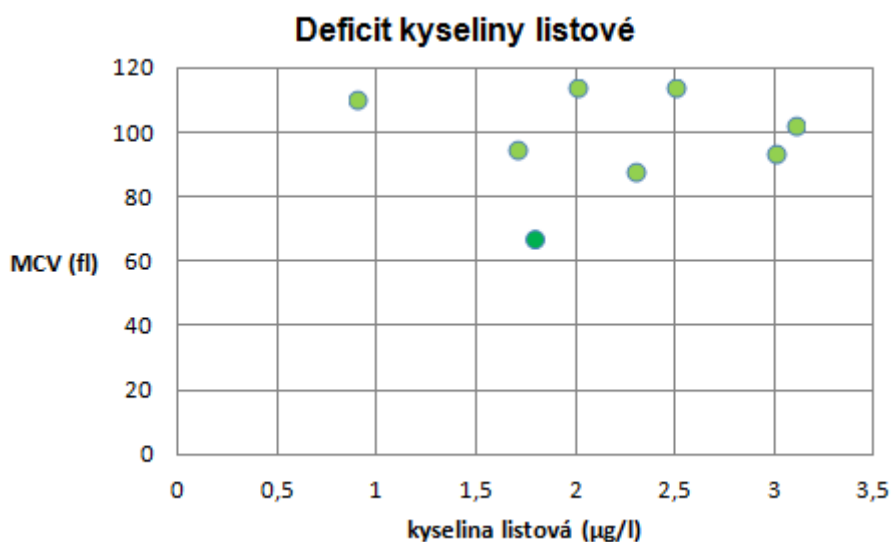
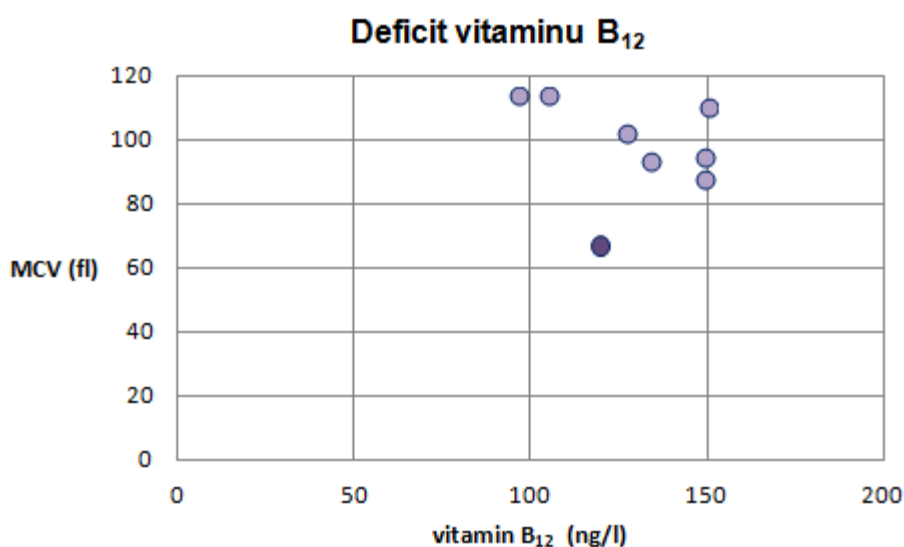
Pacienti, kteří měli deficitní hladinu vitamínu B<sub>12</sub> a přesto neměli vysoké MCV, byli ošetřováni na oddělení Klinické hematologie a na oddělení gastroenterologickém.



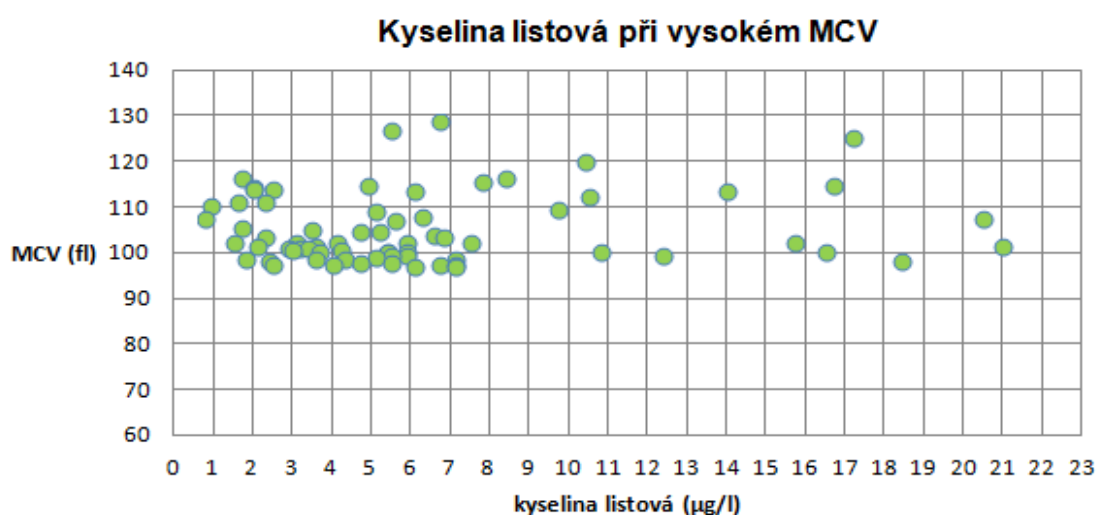
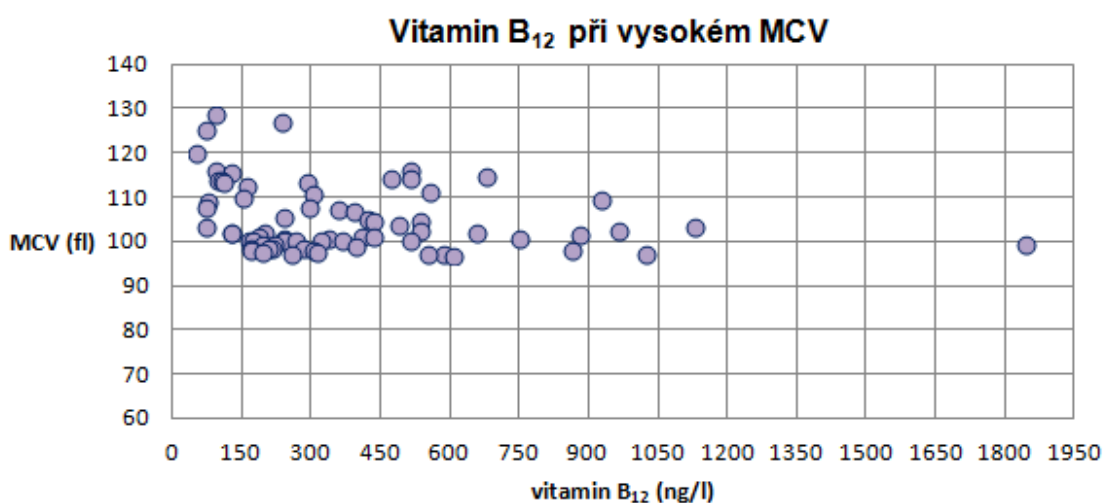


Vzorků se současným deficitem vitamínu B<sub>12</sub> i kyseliny listové bylo 8. Z tohoto počtu bylo 5 mužů a 3 ženy. Věk pacientů se pohyboval od 37 do 92 let. Střední hodnota MCV byla 98,6 fl. Makrocytóza byla přítomna u 50 % pacientů.

Jeden pacient měl MCV 66,8 fl, tedy mikrocytózu a byl ošetřován na gastroenterologickém oddělení. Tři pacienti se i při deficitní hladině vitamínu B<sub>12</sub> i kyseliny listové vešli do fyziologických hodnot MCV. Čtyři pacienti spadali výši naměřeného MCV do makrocytózy.



U vzorků se zjištěným vysokým MCV, tedy makrocytózou, ke kterým byla současně vyšetřena hladina vitamínu B<sub>12</sub> i hladina kyseliny listové bylo 69. Z celkového počtu vyšetřených hladin vitamínu B<sub>12</sub> ke krevním obrazům mělo vysoké MCV 27 % vzorků. V případě kyseliny listové to představovalo 33% vyšetřených hladin kyseliny listové ke krevním obrazům s vysokým MCV. Tato skupina vzorků obsahovala 61 % žen a 39 % mužů. Střední hodnota MCV byla 102,3 fl. Na přiloženém grafu je vidět nejčtenější výskyt opravdu vysokých hodnot MCV při deficitních hodnotách hladiny vitamínu B<sub>12</sub>. V případě kyseliny listové takováto závislost není zřetelně patrná.



## 5. Diskuze

Makrocytóza je obecně definována zvýšením středního korpuskulárního objemu erytrocytů. (Kaferle et al. 2009) Makrocytóza je považována za důležitou známkou onemocnění, i když se často zdá být ignorována. (Seppä et al. 1996) Faktorů ovlivňujících vznik makrocytózy je mnoho. Ve své práci se zabývám pouze deficitem vitamínu B<sub>12</sub> a kyseliny listové.

Mezi nejčastější etiologie patří alkoholismus, nedostatek vitamínu B<sub>12</sub> a kyseliny listové a užívání některých léků. (Kaferle et al. 2009) Ve studii, která byla provedená ve fakultní nemocnici New York City, byly nejčastější příčinou makrocytózy léky a alkohol. (Savage et al. 2000) Další možnou etiologií je hypotyreóza, onemocnění jater a primární dysplazie kostní dřeně (včetně myelodysplazie a Myeloproliferativních onemocnění). (Kaferle et al. 2009)

Makrocytózu lze identifikovat z nátěru periferní krve nebo z automatizovaných RBC indexů (MCV). Nátěr periferní krve je mnohem citlivější pro identifikaci brzké makrocytární změny než RBC indexy, protože MCV představuje průměr distribuční křivky a je necitlivý k přítomnosti malého počtu makrocytů. Oproti nátěru periferní krve, mohou MCV podhodnocovat makrocytózu ve více než 30 % případech. (Aslinia et al. 2006)

Pro hodnocení makrocytózy byla zvolena hodnota MCV, protože je objektivní, snadno kvantifikovatelná a vhodnější pro statistické zpracování. Hodnocení morfologických změn v krevním obraze je subjektivní a to je také důvodem, proč zde neuvádím výsledky mnou zhotovených krevních nátěrů. Těchto krevních nátěrů nebyl zhotoven dostatečný počet pro statistické zpracování a sloužily pouze k mému srovnání velikosti MCV a faktických morfologických změn v krevním obraze.

Makrocytóza byla přítomna u 8,8 % všech pacientů. Při deficitních hodnotách vitamínu B<sub>12</sub> byla makrocytóza přítomna u 52 % pacientů. Při deficitních hodnotách kyseliny listové se makrocytóza vyskytovala u 38 % pacientů.

Pro určení základních příčin makrocytózy je užitečné vyšetření hladiny vitamínu B<sub>12</sub>, počtu retikulocytů a periferního nátěru. Když v periferním nátěru nacházíme makroovalocyty a hypersegmentované neutrofilny je nejpravděpodobnější příčinou nedostatek vitamínu B<sub>12</sub> a kyseliny listové. (Kaferle et al. 2009)

V této práci jsem sledovala vliv snížení vitamínu B<sub>12</sub> a kyseliny listové na morfologii erytrocytů, ale neměla jsem přístup k příčinám jejich deficitů, kromě jediné, věku. Z tohoto důvodu zde uvedu i několik dalších případů nejčastěji sledovaných příčin nedostatku vitamínu B<sub>12</sub>.

Věk byl ve vyšetřované skupině pacientů vyšší, nejčastější věk byl 78 let. Dharmarajan píše, že nedostatek vitamínu B<sub>12</sub> je běžný u starších dospělých, kteří jsou náchylní k několika faktorům, včetně nedostatečné stravy a potravin obsahujících kobalamin, malabsorpci, řadě žaludečních a střevní poruch a léků. Nedostatek vitamínu B<sub>12</sub> může být asymptomatický, nebo se objeví hematologické, neuropsychiatrické a jiné projevy. Zatímco hematologické projevy jsou reverzibilní, neurologické komplikace mají krátké okno příležitosti pro korekci, zdůrazňující význam včasné diagnózy. Deficit kyseliny listové je také běžný u starších dospělých. Deficit kyseliny listové způsobuje reverzibilní hematologické rysy podobné deficitu vitamínu B<sub>12</sub>, bez neurologických projevů. Deficit kyseliny listové je spojován s kognitivní poruchou a depresí. (Dharmarajan )

Byla provedena studie sledující účinky antiepileptik na sérové koncentrace vitamínu B<sub>12</sub> a kyseliny listové. Padesát procent testovaných pacientů mělo po monoterapii karbamazepinem hyperhomocysteinémii, 75 % mělo nízkou hladinu vitamínu B<sub>12</sub>. (Aslan et al. 2008)

V současné době se zdá, že má *Helicobacter pylori* vztah k různým onemocněním zažívacího traktu, či může způsobit makrocytózu bez anemie. (Ruiz de León et al 2011) Studie potvrzující souvislost mezi infekcí *Helicobacterem pylori* a deficitem vitamínu B<sub>12</sub> doporučuje, aby byla u pacientů s makrocytózou neznámé etiologie byla zjištěna přítomnost infekce *Helicobacter pylori*. (Khubchandani et al. 2011)



## 6. Závěr

Cílem práce bylo blíže prozkoumat vztah mezi přítomností deficitu vitamínu B<sub>12</sub> a kyseliny listové a vzniklými morfologickými změnami. Byla zjištěna četnost výskytu zvýšení MCV. V období od 23. 4. – 6. 5. 2012 byla u 4 511 pacientů, kterým byl vyšetřen krevní obraz na oddělení Klinické hematologie Nemocnice České Budějovice a.s., zjištěna četnost výskytu zvýšení MCV 10,1 %. V období od 1. 1. – 30. 4. 2012 byla četnost zvýšení MCV 8,8 %.

Na vzorku 394 pacientů se známým deficitem vitamínu B<sub>12</sub> a kyseliny listové bylo v období od 1. 1. – 30. 4. 2012 provedeno vyšetření krevního obrazu se zaměřením na charakteristické morfologické změny. Z tohoto počtu pacientů byla u 362 pacientů vyšetřena hladina vitamínu B<sub>12</sub> a u 291 byla vyšetřena hladina kyseliny listové. U obou zmíněných vitaminů bylo prokázáno, že při jejich deficitu dochází ke zvýšení hodnot MCV. Čím vyšší byl deficit, tím bylo více změněno MCV.

Obě hypotézy byly potvrzeny. Při zvýšených hodnotách MCV byl ve 27 % nalezen deficit vitamínu B<sub>12</sub> a ve 33 % v případě kyseliny listové. Při deficitu vitamínu B<sub>12</sub> se makrocytóza vyskytovala v 52 % případů. V případě deficitu kyseliny listové byl výskyt makrocytózy 38 %.

V této práci se potvrdila souvislost mezi nedostatkem vitamínu B<sub>12</sub> a kyseliny listové a následným vznikem morfologických změn. Z toho vyplývá, že by při nálezů zvýšeného MCV měla být vyšetřována i hladina těchto vitaminů, aby tato příčina vzniku makrocytózy mohla být odstraněna, nebo vyloučena z jiných možností vzniku makrocytózy.

## 7. Seznam použité literatury

ASLAN, K., BOZDEMIR, H., UNSAL, C., GÜVENC, B. The effect of antiepileptic drugs on vitamin B12 metabolism. *International journal of laboratory hematology*. 2008, roč. 30, č. 1, s. 26-35.

ASLINIA, F., MAZZA, JJ., YALE, S. Megaloblastic anemia and other causes of macrocytosis. *Clinical medicine & research*. 2006, roč. 4, č. 3, s. 236-241.

BEUTER, E. et al. *Williams Hematology*. 5. vydání. New York: Mc Graw-Hill, 2001, s. 83. ISBN 0-07-070386-8.

ČERMÁKOVÁ, M. a kol. *Klinická biochemie - 2. Díl*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2005, s. 95-98. ISBN 80-7013-424-0.

DASTYCH, M., BREINEK, P. a kol. *Klinická biochemie*. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2008, s. 228. ISBN 978-80-210-4572-9.

DHARMARAJAN, TS. ADIGA, GU., NORKUS, EP. Vitamin B12 deficiency. Recognizing subtle symptoms in older adults. *Geriatrics*. 2003, roč. 58, č. 3, s. 30-34, 37-38.

DYLEVSKÝ, I. *Somatologie*. Olomouc: EPAVA, 2000, s. 69, 148. ISBN 80-86297-05-5.

ETGEN, T., SANDER, D., BICKEL, H., FÖRSTL, H. Mild Cognitive Impairment and Dementia. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2011, roč. 108, č. 44, s. 745.

FRAGASSO, A., MANNARELLA, C., CIANCIO, A., SACCO, A. Functional vitamin B12 deficiency in alcoholics: An intriguing finding in a retrospective study of megaloblastic anemic patients. *European journal of internal medicine*. 2010, roč. 21, č. 2, s. 97–100.

FRIEDMANN, B. *Hematologie v praxi*. Praha: Galen, 1994, s. 37-39, 43-47. ISBN 80-85824-05-1.

HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L. *Vitaminy*. Praha: Galén Publishin, 2004, s. 101-102, 111. ISBN 80-247-0373-4.

HRUBIŠKO, M. a kol. *Hematologie a krevní transfuze I*. Praha: Avicenum, 1981, s. 18-21, 27-31, 33-34, 48-49, 64, 97.

KAFERLE, J., STRZODA, CE. Evaluation of macrocytosis. *Journal of the american academy of family physicians*. 2009, roč. 79, č. 3, s. 203-308.

KHUBCHANDANI, SR., KULHARNI, S., TECKCHANDANI, S., CHITALE, A. Ultrastructure of the *H. pylori* mikrobe in individuals Having macrocytosis and B12 deficiency. *Ultrastructural patology*. 2011, roč. 35, č. 5, s. 204-288.

KUBISZ, P. a kol. *Hematológia a transfuziológia*. Bratislava: Grada Slovakia, 2006, s. 60. ISBN 80-8090-000-0.

MOUREK, J. *Fyziologie*. Praha: Grada Publishing, 2005, s. 53. ISBN 80-247-1190-7.

PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu I. Buňka a krvetvorba*. Český Těšín: Finidr, 2002, s. 75, 77-78, 80-83, 94, 96, 98. ISBN 80-85824-43-4.

PECKA, M. (2006): *Laboratorní hematologie v přehledu II. Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. Český Těšín: Finidr, s. 15, 26-28, 35-37. ISBN 80-86682-02-1.

PECKA, M., BLÁHA, M. *Praktická hematologie: laboratorní metody*. 1. vydání. Český Těšín: Infinitiv art, 2010, s. 79, 81-87. ISBN 978-80-903871-9-5.

PENKA, M., BULIKOVÁ, A.; MATÝŠKOVÁ, M.; ZAVŘELOVÁ, J. *Hematologie I. Neonkologická hematologie*. Praha: Grada Publishing, 2001, s. 26–29.

PENKA, M. a kol. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. 1. vydání. Praha: Grada, 2011, s. 15; 208. ISBN 978-80-247-3459-0.

RACEK, J. a kol. *Klinická biochemie*. 2. vydání. Praha: Galén, 2006, s. 136. ISBN 80-7262-324-9.

RUIZ de LEÓN, DP., CEBOLLA, MV., PARRES, GB., PITA, CFJ., DÍAZ de TUESTA DÍAZ de LEZAMA, E., BORITO, ME. Estudio de macrocitosi sin anemia en una población urbana. *Attention Primaria*. 2011, roč. 43, č. 4, s. 183-9.

SAKALOVÁ, A., LIPŠIC, T. *Hematológia a transfuziológia: teória a cvičenia*. 1. vydání. Martin: Osveta, 1995, s. 16-17, 21- 24, 28, 32, 34, 36-37, 39-40, 44-48, 50. ISBN 8021704446.

SANTARELLI, L., GABRIELLI, F., CREMONINI, F., SANTOLIVUO, A., CANDELLI, M., NISTA, EC., POLA, P., GASBERRINI, G., GASBARRINI, A. Atrophic gastritis as a cause of hyperhomocysteinaemia. *Alimentary pharmacology therapeutics*. 2004, roč. 19, č. 1, s. 107-111.

SHULMAN, MR., GERAGHTY, TJ., TADROS, M. A case of unusual substance abuse causing myeloneuropathy. *International Spinal Cord Society*. 2007, roč. 45, č. 4, s. 314–317.

SAGAVE, DG., OGUNDIPE, A., ALLEN, RH., STRABER, SP., LINDENBAUM, J. Etiology and diagnostic evaluation of macrocytosis. *The american journal of the medical science*. 2000, roč. 319, č. 6, s. 343-52.

SEPPÄ, K., HEINILÄ, K., SILLANAUKKEE, P., SAARNI, M. Evaluation of macrocytosis by general practitioners. *Journal of studies on alcohol*. 1996, roč. 51, č. 1, s. 97-100.

STARÝ, J. et al. *Dětská hematologie*. 1. vydání. Praha: Galén, 2005, s. 44, 46-49, 54. ISBN 80-7262-327-3.

TROJAN, S. a kol. *Lékařská fyziologie*. 4. vydání. Praha: Grada Publishing, 2003, s. 127. ISBN 80-247-0512-5.

Obrázky převzaté z internetu:

Obrázek kostní dřeně:

<http://www.sekk.cz/eqa/2013/zadani/NKDF113/A20.jpg>

## **8. Klíčová slova**

Erytrocyt

Makrocytóza

Kostní dřev

Vitamin B<sub>12</sub>

Kyselina listová

Megaloblastová anemie

## **Key words**

Erythrocyte

Macrocytosis

Bone marrow

Vitamin B<sub>12</sub>

Folic Acid

Megaloblastic anemia