



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra klinických a preklinických oborů

Bakalářská práce

Buněčné elementy zúčastňující se zánětových reakcí

Vypracoval: Veronika Chmelová
Vedoucí práce: prof. MUDr. Miloš Velemínský, CSc., dr. h. c.

České Budějovice 2015

Abstrakt

Problematika zánětu je velice složité a rozsáhlé téma, které zdaleka nezahrnuje jen buňky, které jsou úkolem této bakalářské práce. Je to proces, napomáhající k udržení vnitřního prostředí organismu a jeho úkolem je především vyrovnávat se s vnějšími vlivy okolí, které se mohou pro organismus znamenat nebezpečí. Zánětlivá buněčná odpověď je mechanismem, kterým se organismus brání proti infekcím a napravuje poškozenou tkáň. Ale tento proces nelze chápat jen jako reakci obrannou. Zvláště u přetrvávajícího zánětu se může rozvinout chorobný stav, kdy dochází k nevratné destrukci tkáně. V tomto případě se jedná o reakci patologickou.

V teoretické části popisují průběh zánětlivé reakce a zaměřují se na jednotlivé krevní elementy, které jsou její součástí. Popisují jejich morfologickou strukturu, interakce a úlohu v tomto patofyziologickém procesu.

Praktická část je věnována jednotlivým metodám, kterými lze buňky zánětu vyšetřovat. Zhodnocuji zde jejich výhody i nevýhody a popisují principy a postupy těchto metod. Nejzákladnější metodou je zhotovení a nabarvení krevního nátěru a mikroskopické odečtení diferenciálního rozpočtu leukocytů. Za vyšší úroveň lze považovat hematologický analyzátor, který kromě bílé krevní řady poskytuje řadu informací i o červené řadě a trombocytech. Poslední metodou, kterou se v práci zabývám je průtoková cytometrie. Její obrovský rozvoj v posledních letech přináší možnost vyšetřovat velké množství parametrů. To ale klade vysoké nároky na správnou interpretaci získaných dat.

Poslední část této práce se zabývá žírnou buňkou a problematikou jejího vyšetřování jak z hlediska hematologického, tak metodami histologickými.

Abstract

The issue of inflammation is a very complicated and extensive topic, which by far does not just cells that the task of this thesis. It's a proces to helping maintain the internal environment of the organism and its task is cope with external environmental influences, which may mean risk for the organism. Inflammatory cell response is the mechanism which the body defends itself against infections and corrects damaged tissue. But this process can not be understood only as a defensive reaction. Especially with persistent inflammation may evolve a disease state which leads to irreversible tissue damage. In this case, the pathologic response.

The theoretical part describes the course of inflammatory reactions and focus on individual blood cells. In this part of thesis, describe their morphological structure, interaction and role in the pathophysiological process.

The practical part is devoted to specifics methods which can be used to investigate inflammatory cells. I appreciate their advantages and disadvantages, and describe the principles and practices of these methods. The most basic method is the fabrication and painting the blood smear and microscopic minus differential leukocyte budget. For higher level can be considered Hematology Analyzer, in addition to white blood cells provides a range of information, including platelets and red series. The last method, which the work is concerned with flow cytometry. The huge growth in recent years, the opportunity to investigate a large number of parameters. But this places high demands on the correct interpretation of the data.

The last part is concerned with mast cell and problems of its investigations both in terms of hematological and histological methods.

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 (datum)

.....

Veronika Chmelová

Poděkování

Mé poděkování patří MUDr. Lence Sedláčkové a celému týmu z OKBHI Nemocnice Na Homolce v Praze za umožnění provedení výzkumné části této práce, dále děkuji MUDr. Lukáčové z oddělení patologie Nemocnice České Budějovice a.s. a Hematologicko – Transfúznímu oddělení Nemocnice Písek a.s. Děkuji také prof. MUDr. Miloši Velemínskému, CSc., dr. h. c. za vedení práce a cenné rady. V neposlední řadě děkuji svým rodičům za podporu během celého studia.

Obsah

Úvod.....	10
1 Současný stav	11
1.1 Průběh zánětlivé reakce.....	11
1.2 Buňky zánětu.....	13
1.2.1 Neutrofilní granulocyty.....	13
1.2.2 Bazofilní granulocyty	15
1.2.3 Eozinofilní granulocyty	15
1.2.4 Žírné buňky.....	16
1.2.5 Makrofágy.....	17
1.2.6 Lymfocyty.....	19
1.2.7 Plazmatické buňky	20
1.2.8 Trombocyty.....	20
1.2.9 Endotelové buňky	21
1.3 Referenční hodnoty	23
2 Cíl práce.....	24
3 Metodika vyšetření zánětlivých buněk (kromě žírné buňky).....	25
3.1 Charakteristika souboru	25
3.2 Materiál	25
3.3 Metody	26
3.3.1 Diferenciální rozpočet leukocytů mikroskopicky.....	26
3.3.1.1 Zhotovení krevního nátěru	26
3.3.1.2 Barvení krevního nátěru.....	27
3.3.1.3 Mikroskopie	28
3.3.2 Hematologický analyzátor	29
3.3.2.1 Princip metody	29
3.3.3 Průtoková cytometrie.....	30
4 Metodika vyšetření žírné buňky	34

5	Výsledky.....	35
6	Diskuse	66
7	Závěr.....	69
8	Seznam použitých zdrojů	70
9	Klíčová slova	75
10	Přílohy	76

Seznam použitých zkratek

G – CSF	Granulocyte – Colony Stimulating Factor
GM – CSF	Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor
IL	Interleukin
Ig	Imunoglobulin
Fc γ R	Fc-gamma receptor
MBP	Major Basic Protein
EDN	Eosinophil - Derived Neurotoxin
ECP	Eosinophil Cationic Protein
EPO	Eosinophil Peroxidase
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
bFGF	Basic fibroblast growth factor
TGF β	Transforming Growth Factor β
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
MMP9	Matrix Metalloproteinase 9
CSF	Colony Stimulating Factor
LPS	Lipopolysacharid
RFL	Reaktivní forma lymfocytu
PLB	Plazmatická buňka
NK buňky	Natural killer cells („přirozený zabíječ“)
NKT buňky	NK T-lymfocyty
Th lymfocyty	Helper, pomocné, CD4+
Tc lymfocyty	Cytotoxické T – lymfocyty, CD8+
HLA	Human leukocyte antigen
TCR	T - cell receptor (T – buněčný receptor)
FSC	Forward scatter (přímý rozptyl)
SSC	Side scatter (boční rozptyl)
SFL	Side fluorescence light (fluorescence)
DNA	Deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)

RNA	Ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
ATB	Antibiotikum
EBV	Epstein-Barr Virus
FITC	Fluorescein isothiocyanate
APC	Allophycocyanin
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-chlorophyll proteins
UL	Upper left (horní levý kvadrant)
UR	Upper right (horní pravý kvadrant)
LL	Lower left (dolní levý kvadrant)
LR	Lower right (dolní pravý kvadrant)
CD45	leukocyty
CD3	T - lymfocyty
CD4	pomocné T – lymfocyty
CD8	cytotoxické T - lymfocyty
CD19	B - lymfocyty
CD16+56	NK buňky
HLA-DR z CD3+	aktivované T - lymfocyty

Úvod

Každý člověk se ve svém životě dostal do situace, která v jeho organismu vyvolala zánětlivou odpověď. Ať už se jedná o zdánlivě banální říznutí do prstu nebo o poranění vážnějšího charakteru. Spouštěčem zánětlivé reakce může být taktéž podnět imunologický, tedy například patogenní mikroorganismy. V místě zánětu většinou nastává zarudnutí, zduření, zvýšená teplota, bolest. Co ale tyto pouhým okem viditelné symptomy způsobuje a co se tedy děje na buněčné úrovni?

Slovo zánět pochází z latinského *inflammare*, což v překladu znamená „položít na oheň“. Již v 1. století n. l. římský lékařský spisovatel Aulus Cornelius Celsus definoval zánět pomocí čtyř základních příznaků: zarudnutí, otok, teplo a bolest. Tato definice vystihuje to, co dnes považujeme za „klasický“ akutní zánět. V té době byl tedy zánět definován kombinací klinických příznaků a symptomů, nikoliv konkrétní patofyziologií. Dnes víme, že tato definice je značně omezena, neboť ve většině případů buněčné procesy a signály, které jsou hlavními známkami existence zánětu na subklinické úrovni, nevedou ke vzniku výše uvedených příznaků.

Dvě stě let poté se objevil Galén, který začal prosazovat humorální hledisko zánětu. Podle něj byl zánět (a s ním spojený specifický hnis) součástí prospěšné reakce na poranění, která převládá nad patologickou. Tento názor přetrval až do 19. století, kdy v roce 1871 německý lékař Virchow doplnil k výše uvedeným čtyřem příznakům ještě pátý, a to ztrátu funkce. Nicméně tím vyvrátil Galénovo tvrzení, a poukázal na zánět jako na proces neodmyslitelně patologický.

Pokroky v mikroskopii a buněčné biologii v 19. století umožnily definovat zánět na základě poznání buněk. To představuje zcela nový způsob jeho chápání. Významný německý biolog definoval zánět ve volnějším slova smyslu, jako „sled místních jevů rozvíjejících se v důsledku primárního poškození tkáně a mající tendenci obnovy“.

V průběhu druhé poloviny 20. století došlo k obrovské explozi znalostí, nicméně naše klinické představy o zánětu zůstaly relativně odolné vůči změnám. (24)

1 Současný stav

1.1 Průběh zánětlivé reakce

Díky epitelům jsme chráněni před mnoha škodlivými mikroorganismy, které jsou v našem prostředí stále přítomny. Epitely tvoří kožní a slizniční membrány, které slouží jako účinná mechanická bariéra. Porušení této ochrany obvykle vyvolá trauma nebo jiný destruktivní účinek, kdy je účinnou a předvídatelnou reakcí zánět.(10)

Zánětlivé reakce se neúčastní jen buňky, které jsou úkolem této bakalářské práce, ale je nutné také zmínit cirkulující proteiny, za které jsou považovány složky komplementu a faktory koagulačního, fibrinolytického a kininového systému.

Důležitým krokem je rychlá aktivace zánětlivé odpovědi a zároveň snaha organismus ochránit před účinky mediátorů zánětu, které se nalézají v cytoplazmatických granulích nebo jsou syntetizovány z fosfolipidů buněčných membrán až v průběhu zánětlivé reakce.

Reakce se účastní cirkulující buňky, mezi které patří tři typy granulocytů. Žijí poměrně krátce. Naproti tomu makrofágy a žírné buňky jsou považovány za dlouhožijící a nalezneme je ve tkáni, kde drží pohotovost. Primárním úkolem neutrofilních granulocytů a makrofágů je fagocytóza, čímž se podílejí na vytváření obranné bariéry mezi organismem a vnějším prostředím. Žírné buňky a bazofily uvolňují sekreční mediátory zánětu, které zvyšují propustnost cév a chemotaktické faktory, které přivolávají ostatní buňky zánětu na dané místo. (1)

Za první známku zánětlivého poškození buněk můžeme považovat přechodnou vazokonstrikci, kdy dochází k zúžení cév, vyvolané kontrakcí hladkých svalů v cévní stěně. Další změnou, která nastává již během několika sekund a přetrvává až několik dní po vzniku poranění, je cévní odpověď, která se projevuje vazodilatací a zvýšenou kapilární propustností. To vede ke zvýšenému přítoku krve, což má za následek zčervenání, únik tekutiny z kapilár a její vstup do tkáně (otok).

V případě přetrvávajícího poškození tkáně, po několika hodinách nastává buněčná odpověď, kdy se jako první v poškozené tkáni objeví neutrofilní granulocyty. Adherují na endotelové buňky krevních cév a skrze ně se následně dostávají dovnitř do tkáně.

V místě poranění současně dochází k ukládání fibrinu, shlukování trombocytů, které se aktivují. Také se zde shlukují erytrocyty. Díky tomu je ulehčen proces tvoření krevní sraženiny. Odumřelé a hynoucí buňky, spolu s leukocyty a případnými bakteriemi přispívají k tvorbě hnisu. Tyto změny jsou považovány za akutní zánět. V případě, že poškození tkáně je většího rozsahu, přechází tento proces v chronickou buněčnou odpověď, která nastává během několika dní. (3) Do reakce vstupují monocyty/makrofágy, lymfocyty a plasmatické buňky, které tvoří v potřebném množství a čase mediátory, enzymy a cytotoxiny, jejichž úkolem je usmrcení a degradace poškozené tkáně. (2)

V následujících několika týdnech nastupuje fáze hojení, kdy se v ideálním případě bez následků obnoví struktura a funkce tkáně. (3) Tento proces je nazýván resorpcí (vstřebání, resoluce) zánětu. To zahrnuje úplně odstranění zánětlivého exsudátu, fibrinu, mrtvých tkáňových buněk a jejich rozpadových produktů, zrušení vasodilatace a zvýšené zánětlivé permeability cév. Tekutina a degradační produkty exsudátu z místa zánětu odvádí převážně lymfatické cesty, fibrin je odsraněn z menší části pomocí makrofágů, které mají v tomto této fázi hojení dominantní roli, a z větší části je solubilizován extracelulárně plasmatickým fibrinolysinem (plazminem), popřípadě stejným enzymem, který je však uvolněn z lysosomů neutrofilů. (14)

Pokud tkáň byla poškozena ve výraznějším měřítku, fibrin nebyl dostatečně rychle odstraněn a přetrvává nebo parenchymatosní buňky nejsou schopny regenerace, nastává proces reparace, kdy již nevratně mrtvá tkáň a fibrin, jsou nahrazeny kolagenním vazivem a vznikne jizva, která je tvořena fibroblasty, nově vzniklým kolagenem a endotelovými buňkami. (3,14) Rozsah reparace závisí především na schopnosti tkáňových buněk regenerovat, tj. proliferovat a diferencovat. (14) Tato schopnost je však u různých tkání různá. Například buňky s velmi malou regenerační schopností a tedy vysokou citlivostí k zánětlivému procesu jsou neurony, buňky srdečního a kosterního svalstva. Naproti tomu kožní buňky jsou velmi dobře obnovitelné, jejich proliferace probíhá během celého života, a proto léčba poranění v těchto oblastech bývá poměrně snadná. (18)

1.2 Buňky zánětu

1.2.1 Neutrofilní granulocyty

Neutrofilní granulocyty jsou nejčastějšími leukocyty a z bílé krevní řady tvoří přibližně dvě třetiny. Délka jejich života je krátká. Po dozrání zůstává neutrofilní granulocyt v kostní dřeni 5 dní, následně vstupuje do krevního oběhu, kde cirkuluje asi 10 hodin, než v místě zánětu vstoupí do tkání. (1,10) Jejich hlavní funkcí je fagocytóza a jejich hlavní fyziologická úloha spočívá v ochraně hostitelského organismu před invazí mikrobů. (10)

Neutrofil vzniká v kostní dřeni z pluripotentní kmenové buňky. Ve dřeni jsou produkovány specifické stimulační faktory, konkrétně G-CSF, GM-CSF a IL-3, díky nimž je buňka stimulována k diferenciaci ve zralé neutrofil. (1)

Jádro bývá obvykle členěno na 2-5 segmentů. V cytoplazmě se nacházejí drobná granula, která se barví do růžova. V poměru s ostatními typy granulocytů jsou menší. Cytoplazmatická granula neutrofilů obsahují enzymy, které se rozlišují podle morfologických charakteristik, výsledku barvení, obsahu enzymů a myelocytárního vývojového stádia na dva typy. (2)

Primární neboli azurofilní granula se objevují poprvé ve stádiu promyelocytu. Vznikají oddělením od konkávní strany Golgiho aparátu. Obsahují myeloperoxidázu, lyzozomální hydrolázy a další enzymy, které jsou důležité pro zajištění normální obranyschopnosti organismu a při zánětech. Sekundární granula, nazývaná též jako specifická se vytváří během stádia myelocytu oddělením od konvexní strany Golgiho aparátu. Na rozdíl od primárních granul neobsahují peroxidázu, jsou menší, ale jejich množství bývá v porovnání s primárními granuly trojnásobné. Jejich obsahem je převážně lysozym a laktoferin. (1)

Na neutrofilních granulocytech se nachází 2 typy receptorů. Jednak jsou to receptory pro části Fc imunoglobulinů, hlavně třídy IgG. Receptor pro Fc část imunoglobulinu IgG (FcγR) nese 75-90% neutrofilů v periferní krvi. Jsou známé tři druhy (FcγR), z nichž dva nalezneme na neutrofilech. Odlišnost spočívá v jejich rozdílné molekulové hmotnosti, kdy FcγR s vyšší molekulovou hmotností váže

přednostně imunitní komplexy, tedy jeho afinita k imunitním komplexům je vyšší než jeho afinita k monomernímu IgG. Kromě toho mohou nést receptor pro Fc část IgA.

Druhým typem jsou receptory pro komplement, kdy nastává aktivace komplementu klasickou nebo alternativní cestou, což má za následek tvorbu komplementových štěpů, které zesilují zánětlivou odpověď přilákáním a aktivací neutrofilů. Zprostředkovateli jsou receptory pro štěp C3b komplementu, které se nacházejí na povrchu těchto buněk.

(1)

Hlavním úkolem neutrofilů v procesu zánětlivé odpovědi je především fagocytóza a destrukce infekčního agens, popřípadě alespoň snaha omezit rychlost jejich rozmnožování tak, aby organismus získal čas pro spuštění specifické imunitní odpovědi. Nutná je však přítomnost především opsoninů a dalších látek, které posilují cytotoxickou odpověď fagocytů.

Celý proces začíná opsonizací, kdy dochází k adsorpci opsoninů na povrch patogenních struktur a následnému navázání na opsoninové receptory, které se nacházejí na fagocytujících buňkách. Jak již bylo zmíněno výše, tyto receptory u neutrofilů mohou být dvou různých typů, a to receptory pro Fc části imunoglobulinů, kdy opsoninem je tedy protilátka, v případě receptorů pro komplement je opsoninem inaktivovaný komplementový fragment C3b. V případě, že povrchová vrstva (glykokalyx) fagocytované buňky obsahuje mono-, di- nebo trisacharidovou jednotku, může se jejím prostřednictvím navázat na lektinový receptor na fagocytu. (3)

Dalším krokem je přesun fagocytů do místa zánětu. Tento proces se nazývá chemotaxe a je regulovaný chemotaktickými faktory, které jsou buď produkovány přímo samotnými bakteriemi, nebo vznikají v organismu při aktivaci imunitního systému a dalších přidružených mechanismů.

Samotná fagocytóza, která následuje je velice složitý, evolučně velmi starý děj. Fagocyt nejprve kontaktuje malou část svého povrchu prostřednictvím svých rozmanitých povrchových receptorů cizorodou částici a postupně ji obchvacuje pseudopodiemi. Ta je postupně zcela obklopena povrchovou membránou fagocytu a nakonec uzavřena do nově vzniklé molekuly zvané fagozóm. (4) Ten fúzuje s lyzozomy

za vzniku fagolysosomu a konečným stádiem je usmrcení a degradace pohlceného materiálu. (3)

Neutrofilů při svém zániku uvolňují elastázu a kolagenázu a tím vytvářejí chemotaktické faktory pro monocyty. Přichází k cizímu materiálu poprvé, okamžitě ho atakují a při procesu likvidace hynou. Tím vlastně přitahují na místo makrofágy. (12)

1.2.2 Bazofilní granulocyty

Bazofilní granulocyty jsou nejmenší cirkulující granulocyty s relativně nejméně známou funkcí v zánětlivém procesu. (8) Společně s eozinofilními granulocyty pocházejí ze stejné kmenové buňky. Díky tomu také mají nejvíce společných vývojových, fenotypových a funkčních rysů. Vývoj bazofilů je řízen stimulačními faktory IL-3 a GM-CSF. Po vyplavení z kostní dřeně cirkulují v krevním oběhu, v tkáních se běžně nevyskytují, můžou se tam však usadit po příslušné stimulaci. (2, 8)

Nejen funkčními, ale i morfologickými vlastnostmi se odlišují od žírných buněk. Na rozdíl od nich mají jádro složené ze dvou nebo více laloků, na jehož periferii je kondenzovaný chromatin. Elektronopakní agregáty cytoplazmatického glykogenu, které u žírných buněk chybí, jsou zde přítomny. Další odlišností jsou dva proteiny, vyskytující se v plazmatické membráně bazofilů. Jedním je protein, z něhož se tvoří Charcotovy-Leydenovy krystaly, druhým je hlavní bazický protein. Cytoplazmatická membrána bývá hladká s občasnými krátkými a tupými, nepravidelně rozloženými výběžky. Obsahují méně cytoplazmatických granul než žírné buňky.

Nízké až mírně zvýšené množství bazofilních granulocytů může upozorňovat na různé kožní záněty, záněty tenkého střeva při Crohnově chorobě, záněty ledvin, záněty nosní sliznice a očí. (1)

1.2.3 Eozinofilní granulocyty

Stejně tak jako předchozí typy granulocytů, pochází i eozinofilní granulocyt z myeloidní linie. Vzniká též v kostní dřeni, kde žije 2-6 dní, poté ji v poměrně nezralém stavu opouští a putuje do sleziny, kde dozrává. Následně se mobilizuje do

krevního oběhu, kde velmi krátce cirkuluje (pouze 6-12 hodin). Když krevní oběh opustí, přesouvá se do tkáně, kde je schopen přetrvávat 4-10 dní. (12, 8) Nachází se především v submukózní tkáni a v případě potřeby se uvolňuje do místa potřeby.

Podobně jako neutrofily, mají i eozinofily dva hlavní zásobní kompartmenty. Jedním z nich je kostní dřev, dalším pak marginační pohotovost v cévních kapilárách. Kromě toho jsou ve velkém množství obsaženy ve tkáních, které můžeme považovat za třetí kompartment. Jejich polymorfní jádro je složeno ze dvou laloků, není zde obsaženo jádro. (8)

V cytoplasmě se nacházejí velká elipsoidní granula, specifická pro eozinofilní granulocyty, ve kterých byly prokázány 4 převažující typy kationových bílkovin. Jde o MBP, EDN, ECP a EPO. Tyto molekuly jsou toxické pro některé cílové struktury, například pro parazity a savčí buňky, které mají četnou biologickou aktivitu. Význam bazofilních granulocytů tedy spočívá především v imunitní odpovědi na parazitární infekce a význam má také u alergií. (1, 11)

1.2.4 Žírné buňky

Tyto buňky, jinak nazývané též mastocyty (heparinocyty) jsou buňky podobné basofilním granulocytům. Jedná se vlastně o jejich tkáňovou formu. V průměru dosahují velikosti 8 – 15 μm . Jejich tvar může být kulatý, oválný nebo vřetenovitý. Uvnitř se nachází jádro a v cytoplasmě se nacházejí světlá bazofilní granula, která mohou být barvena toluidinovou modří nebo Giemsa metodami. (29)

Nacházejí se na rozhraní organismu a vnějšího prostředí, tedy v kůži, plicích, gastrointestinálním traktu a na nosní sliznici. Tato strategická poloha jim umožňuje rychle reagovat s vdechnutým či pozřeným antigenem a secernovat účinné zásobní i nově syntetizované mediátory zánětu. Jejich účinkem dojde ke zvýšení propustnosti cév, kontrakci hladkých svalů a sekreci hlenu. Taktéž mají mediátory, uvolněné z žírných buněk chemotaktické účinky na jiné zánětové buňky, včetně eozinofilů, neutrofilů a mononukleárních buněk.

Jejich významná role spočívá v zánětu zprostředkovaném IgE. Jsou vybaveny vysokoafinním receptorem pro IgE. Druhým charakteristickým znakem je přítomnost

50-200 cytoplazmatických granul ohraničených membránou a obsahujících histamin (v daleko větším množství než u bazofilů). Ačkoli jsou si svojí výbavou velice podobné s bazofily, jejich rozdíl spočívá v morfologických vlastnostech, obsahu mediátorů a citlivosti na farmakologickou modulaci. Jsou schopny vylučovat širokou škálu opravných mediátorů a enzymů, zahrnujících například TNF α , IL4, IL6, bFGF, TGF β , PDGF, tripsiny a MMP9, díky nimž je jejich role v zánětu a reparačních mechanismech stále více uznávána. (1, 25)

Granula obsahují nitkovité struktury, amorfní elektronpакní zóny či organizovaně uspořádané skupiny krystalů. V témže cytoplazmatickém granulu lze často nalézt různé druhy těchto struktur v těsném sousedství. Při aktivaci lidských kožních a plicních žírných buněk protilátkami třídy IgE krystalická struktura cytoplazmatických granul mizí. Plazmatická membrána žírné buňky mívá četné povrchové výběžky.

Degranulace vyvolaná IgE je charakterizovaná sérií událostí od zvětšení velikosti cytoplazmatických granul, přes jejich solubilizaci (tj. rozpad jejich vnitřních struktur a snížení jejich elektronpacity) až po fúzi plazmatické membrány buňky se sousedícími cytoplazmatickými granuly. Kanály vytvořené mezi cytoplazmatickými granuly a plazmatickou membránou umožňují vylití solubilizovaného obsahu cytoplazmatických granul do extracelulárního prostoru. (1)

1.2.5 Makrofágy

Makrofágy jsou tkáňovou formou monocytů. Vyskytují v celém organismu, v různých tkáních a orgánech. Vyznačují se tvarovou pestrostí, která je dána prostředím, ve kterém se nacházejí. Charakteristická je také velikost, pohybující se v průměru přibližně 5-50 μm . Obvykle mají velké jádro ledvinovitého tvaru. V cytoplazmě nalezneme velká i malá granula, jejichž obsah je potřebný k usmrcení a zpracování patogenů. Jsou to dlouho žijící buňky a za fyziologického stavu se obnoví asi 1% za den. Makrofágy pochází z hematopoetických buněk kostní dřeně, kde se diferencují z myoblastů pod vlivem růstových faktorů CSF na promonocyty a po 6 dnech se dále diferencují v monocyty, které se vyplavují do krevního oběhu a tam cirkulují. Po 3

dnech krevní oběh opouštějí a dostávají se do tkání, kde již probíhá diferenciace ve zralé makrofágy. Na rozdíl od neutrofilních granulocytů mají schopnost se dělit, jsou tedy schopny lokální proliferace. (12, 15)

Pokud pohltí inertní částice, mohou navzájem splynout a tvořit tak obrovské buňky. Některé pohlcené částice však mohou být pro makrofágy toxické a dochází k jejich zabíjení. Jsou schopny opakované fagocytózy. Pokud jsou ale předtím poškozeny a dojde k opakované fagocytóze, jejich obsah se dostane do daného mikroprostředí a proteolytické enzymy se tak podílejí na poškozování vlastní tkáně. (12)

Primární funkcí makrofágů v místě zánětu je odstranění zánětlivých podnětů a poškozené tkáně a následná podpora hojení rány a obnova tkáně. Makrofágy rozpoznávají podněty ve svém prostředí prostřednictvím mnoha receptorů různé specifity. Aktivační podněty se často nacházejí v zánětlivém prostředí a jsou běžně produkovány makrofágy samotnými, jinými zánětlivými buňkami nebo invadujícími organismy. Poté, co receptory nebo jiné nespecifické mechanismy rozpoznají podnět, může dojít k jeho odstranění několika způsoby. Nejznámějším je fagocytóza. (9, 15)

Průběh fagocytózy u makrofágů je podobný jako u neutrofilů. (12) Prvním krokem je rozpoznání částic, přeskupení cytoskeletu makrofágu, aby mohl rozšířit ramena (pseudopodia) a obklopit částici, kterou následně stráví. Fagocytóza je velmi dynamický proces, který umožňuje rozmanitý reakční repertoár. Například požití částic G^- mikroorganismů vyžaduje receptory pro LPS, které vedou jedinečnou signální intracelulární cestou k vyvolání fagocytózy, ale také modulují transkripční aktivitu makrofágů. Je zvýšena exprese $TNF\ \alpha$ a tento zánětlivý mediátor je uvolňován do místa zánětu, kde může náborovat a aktivovat další zánětlivé buňky, což vede k intenzivní odpovědi a následnému odstranění infekce.

Naproti tomu, k požití zestárlých buněk, jako jsou například apoptoické neutrofilie, dochází nezánětlivým způsobem za použití odlišných mechanismů, které využívají povrchové molekuly na povrchu apoptoických buněk a pro fagocytózu specifické receptory na površích fagocytujících makrofágů. V případě, že makrofág fagocytuje apoptoické buňky, změní se jeho genotypické znaky, snížena je hlavně produkce prozánětlivých mediátorů. Odstranění apoptoických buněk makrofágy může být

modulováno například složkami komplementu, CD44, některými prostaglandiny, lipoxiny a glukokortikoidy. (15)

1.2.6 Lymfocyty

Lymfocyty tvoří 4 fenotypově a tím i funkčně odlišné populace. Jsou to B-lymfocyty, T-lymfocyty, NK-buňky a NKT-buňky. Ale pouze jedna z nich se bezprostředně podílí na zánětlivých reakcích. Jsou jimi T-lymfocyty, které zde mají několik různých funkcí. Tou nejvýznamnější je pravděpodobně jejich schopnost aktivovat makrofágy. Kromě toho mají ještě další, neméně důležité poslání, kterým je přímé usmrcování intracelulárně parazitujících patogenů. Tohoto procesu se účastní zejména cytotoxické T-lymfocyty, ale i pomocné Th1 buňky, které kromě toho prostřednictvím sekretovaných cytokinů aktivují i makrofágy.

T-lymfocyty vznikají v kostní dřeni, odkud putují do thymu, kde dozrávají a diferencují se do několika subpopulací. Tedy pomocné, nesoucí znak CD4+, a cytotoxické se znakem CD8+. Fyziologicky je jejich poměr v cirkulující krvi přibližně 2:1, při patologii se však může výrazně měnit. Stanovuje se například při infekci virem HIV, kdy CD4+ jsou hlavním cílem viru a jejich počet může klesat, v porovnání s ostatními typy lymfocytů, mnohem rychleji. (8, 30)

Cytotoxické T-lymfocyty rozpoznávají komplexy imunogenních peptidů s HLA molekulami 1. třídy prostřednictvím antigenních receptorů. Tím dochází k jejich aktivaci. Podobně rozpoznávají imunogenní peptidy i Th buňky, jen s tím rozdílem, že v komplexech, které jim předkládají antigen prezentující buňky, se nacházejí HLA molekuly 2. třídy. Touto interakcí se aktivují a dále diferencují v efektorové buňky Th1, Th2 a Th3. Toto rozpoznávání je umožněno prostřednictvím antigenních receptorů T-buněk, TCR. (8) Na povrchu každého T-lymfocytu se nachází několik desítek tisíc identických, klonálně unikátních TCR. (4)

Stimulované T-lymfocyty mohou uvolňovat několik typů efektorových molekul. Například cytotoxiny, které jsou specifické a mohou působit na jakoukoli buňku. Patří mezi ně především perforiny a granzymy. Jejich uvolňování ze sekrečních granul Tc a NK buněk probíhá po antigenní stimulaci, tj. kontaktu Tc a terčové buňky. Dalším

typem jsou cytokiny. Díky jejich specifickým receptorům mohou působit jen na buňky, které tyto receptory mají na svém povrchu. Účastní se regulace zánětlivého procesu a cytokiny, které jsou produkovány Th1 buňkami, hrají důležitou roli v aktivaci makrofágů. (8)

1.2.7 Plazmatické buňky

Plazmatické buňky neboli plasmocyty jsou charakteristické svým excentricky uloženým jádrem, početnými mitochondriemi, množstvím drsného endoplazmatického retikula a nápadným Golgiho aparátem. Tímto je buňka adaptována na účinnou produkci protilátek (imunoglobulinů), což se projeví i tmavomodrým zbarvením cytoplasmy. (31)

Jejímu vzniku předchází složitý mechanismus v buněčné populaci B – lymfocytů. V případě navázání B-lymfocytu na svůj „substrát“ (v typizovaném případě např. na povrch bakterie), začne se klonálně dělit (často asistují i tzv. pomocné T-lymfocyty). Z části potomků tohoto tzv. aktivovaného B-lymfocytu vzniknou paměťové B-lymfocyty, ze zbytku pak plazmatické buňky. Zrání B-lymfocytů na plazmatické buňky podporují různé interleukiny, zejména IL-4 a dále IL-6 a IL-14. (13)

V periferní krvi se za normálních okolností nenacházejí. Žijí jen několik málo dní, na rozdíl od cirkulujících malých lymfocytů, jejichž životnost může být až několik let. (31)

1.2.8 Trombocyty

Trombocyty jsou bezjaderné buňky, vznikající z megakaryocytů. Pokud se nacházejí v krvi, mají tvar bikonkávního disku o průměru cca 2,5 mikrometrů. Tento jejich diskovitý tvar je udržován svazkem mikrotubulů, které jsou jako prsten napnutý v periferní cytoplasmě. V periferní cytoplasmě, která se též nazývá hyalomera, se nenachází žádná granula. Naopak centrálně uložená cytoplasmata neboli granulomera obsahuje jednotlivé mitochondrie, lysozomy, zrnka glykogenu a různé typy strádacích granul, uplatňujících se při srážení krve, kdy je uvolňován jejich obsah. V jejich plazmatické membráně se nacházejí receptory, konkrétně integriny a glykoproteiny,

zodpovědné za přichycení a vytvoření sítě trombocytů při zástavě krvácení. Plasmatická membrána tvoří na mnoha místech trubicovité vklesliny, které vytváří tzv. trubicovitý systém kanálků. Trombocyty obsahují trojrozměrnou síť aktinu, která spolu s myosinem umožňuje aktivovanému trombocytu kontrakci.

Kromě toho, že krevní destičky jsou hlavní efektorové buňky v hemostáze, jejich specializace rovněž zahrnuje činnosti a mezibuněčné interakce, díky kterým se stávají klíčovými efekty v zánětu a v nepřetržitě sledu přirozené a adaptivní imunity. (16)

Důležitým projevem této patofyziologické reakce je mikrovaskulární dysfunkce, která zahrnuje aktivaci vaskulárních endoteliálních buněk, cirkulující leukocyty a krevní destičky. Ty se hromadí v místech poškozené tkáně a uvolňují složky, které zvyšují vaskulární permeabilitu. (14, 19)

Destičky vykazují celou řadu receptorů pro mediátory zapojené do zánětlivé cesty a imunitní reakce. Patří mezi ně purinergní receptory, selektiny, integriny, toll-like receptory, imunoglobuliny a chemokinové receptory. Avšak přesná role krevních destiček v zánětu je stále ve stádiu výzkumu. Nicméně, vzhledem k tomu, že mnohé z těchto receptorů jsou odlišné od těch, které se podílejí na trombóze a hemostáze, jsou reálné určité možnosti cílení těchto receptorů v regulaci zánětlivých onemocnění, aniž by byla ohrožena hemostáza. (10)

1.2.9 Endotelové buňky

Lidské endotelové buňky jsou multifunkční buňky, vystylající krevní cévy. Mají schopnost vylučovat různé biologicky aktivní mediátory. Obvykle udržují cévní homeostázu a slouží k prevenci trombotických komplikací. Pokud jsou napadeny infekcí, stresem, hypertenzí, dyslipidemií nebo vysokou hladinou homocysteinu, prodělávají změny, vedoucí k jejich dysfunkci. Ta je charakterizována typicky sníženou endoteliální expresí oxidu dusnatého a naopak zvýšenou expresí adhezivních molekul a s tím související zvýšené navazování cirkulujících leukocytů na tyto buňky. To je doprovázeno cytokiny a chemokiny, což vede k buněčnému náboru a přípravě k akutní

zánětlivé odpovědi, která může v případě, že nejsou funkční reparační mechanismy, vyvrcholit v chronický zánět. (5)

Endotelové buňky jsou klíčovými regulátory v zánětlivém procesu. Výstelka krevních cév ve stabilním stavu poskytuje protizánětlivý a antikoagulační povrch. Nicméně v případě zranění nebo infekce endotelové buňky kontrolují adhezi a migraci zánětlivých buněk, stejně tak jako přesun tekutiny z krevního řečiště do poškozené tkáně. Tudíž exprese endoteliálních adhezivních molekul, cytosinů a změny v permeabilitě podléhají přísné regulaci, díky níž probíhá kontrolovatelná zánětlivá reakce. (6)

Vlastnosti endoteliálních buněk se mění během přechodu z akutního do chronického zánětu a rovněž během přechodu z vrozené na adaptivní imunitu. Mediátory, které působí na endoteliální buňky také působí na leukocyty a naopak. V důsledku toho dochází v mnoha případech protizánětlivé terapie k ovlivnění chování endoteliálních buněk. (28)

1.3 Referenční hodnoty

Tab 1 Referenční hodnoty pro jednotlivé typy leukocytů - dospělý jedinec (39)

neutrofilly	44 – 67 %
eosinofily	0 – 7 %
bazofily	0 – 2 %
monocyty	0 – 9 %
lymfocyty	25 – 48 %

Tab 2 Referenční hodnoty pro základní parametry buněčné imunity - dospělý jedinec (39)

CD3+	58 – 84 %
CD4+	27 – 52 %
CD8+	19 – 48 %
CD19+	6 – 23 %
CD16+56	5 – 27 %
HLA - DR+ z CD3+	8 – 15 %

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je získat zkušenosti s metodikou vyšetřování krevních elementů, které se účastní zánětové reakce organismu a interpretace získaných výsledků.

Vyšetřit zánětlivé buňky pomocí třech metod a to mikroskopickým odečtením diferenciálního rozpočtu leukocytů, změřením diferenciálu hematologickým analyzátozem a metodou průtokové cytometrie.

Třetím cílem je osvojit si problematiku vyšetřování žírné buňky rámci zánětu a naučit se ji vyhledat a popsat v histologickém preparátu.

3 Metodika vyšetření zánětlivých buněk (kromě žírné buňky)

3.1 Charakteristika souboru

Praktická část mé bakalářské práce se odehrála na Hematologicko-transfúzním oddělení Nemocnice Písek a Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie Nemocnice Na Homolce v Praze. Za asistence lékařů a laborantek jsem se podílela na celém procesu vyšetřování krevních buněk, zahrnující přípravu a zpracování vzorku, analýzu zánětlivých buněk pomocí třech metod a následném vyhodnocení získaných dat.

Vyšetřila jsem náhodné vzorky krve a to 25 vzorků mikroskopicky, 25 vzorků přístrojově (pomocí hematologického analyzátoru) a 12 vzorků metodou průtokové cytometrie.

Biologický materiál: Žilní krev

Metody: Mikroskopie
 Hematologický analyzátor
 Průtoková cytometrie

3.2 Materiál

Výsledky analýzy morfologie krve může ovlivnit celá řada faktorů fyziologického i nefyziologického původu. Proto je velice důležitá správná příprava pacienta na odběr, samotný odběr a manipulace s odebraným vzorkem.

K vyšetření je zapotřebí 1x2 ml nesrážlivé krve. Krev je odebrána ze žíly do plastové zkumavky s K₂EDTA nebo K₃EDTA od firmy Vacutainer, označených filovým víčkem. Transport materiálu do laboratoře by měl být v co možná nejkratším čase od odběru. Analýza vzorku je možné provést však maximálně do 5 hodin.

Podmínkou pro provedení vyšetření je dodání materiálu v dostatečném množství, řádně označeného a nepoškozeného. Spolu se zkumavkou musí být doručena řádně

vyplněná žádanka (elektronická a/nebo papírová). Údaje na zkumavce a žádance se musí shodovat.

Na vzorku musí být uvedeno jméno a příjmení pacienta a jeho rodné číslo. Na žádance musí být uvedeno kromě výše zmíněných údajů také kód pojišťovny pacienta požadovaná vyšetření, požadavek na typ vyšetření, pokud je jiný než rutina (např. STATIM), základní příp. další diagnózy pacienta, identifikace žadatele a v neposlední řadě čas odběru a jméno osoby, která odběr provedla. (23)

3.3 Metody

V současné době je na klinické laboratoře vyvíjen stále větší tlak, a to jak na kvalitní provedení analýzy, tak i na její rychlost. Základním vyšetřením bílé krevní řady v hematologické laboratoři je mikroskopické stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů. Vzhledem k časové náročnosti a jisté míře subjektivity je tento postup do značné míry omezen. S rozvojem digitálních technologií jsou do klinických laboratoří zaváděny nové metody, díky nimž je analýza nejen přesnější, spolehlivější a rychlejší, ale také umožňuje získat větší množství dat z poměrně malého vzorku krve.

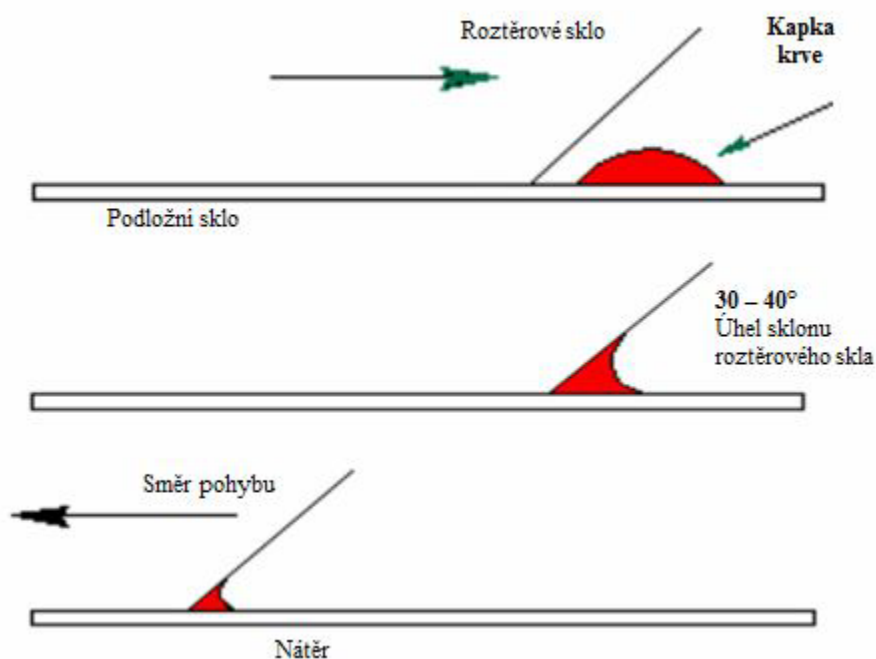
3.3.1 Diferenciální rozpočet leukocytů mikroskopicky

V každé hematologické laboratoři je základním vyšetřením stanovení počtu krvinek v objemové jednotce krve a také hodnocení buněk krevního nátěru ve světelném mikroskopu. Krevní nátěr slouží především k morfologickému a kvantitativnímu stanovení jednotlivých typů leukocytů tzn. diferenciální krevní obraz, ale často také pro hodnocení tvaru, velikosti a barvitelnosti erytrocytů a trombocytů. (20)

3.3.1.1 Zhotovení krevního nátěru

Velmi důležitým krokem pro morfologické hodnocení preparátu je správná technika zhotovení a barvení preparátu. Na střední čáru podložního skla asi 1 a půl centimetru od jeho užší hrany byla umístěna kapka krve. Přiložíme roztírací sklo pod úhlem cca 45 stupňů a posunujeme od středu podložního skla ke kapce krve, která se po dotyku s ním rozprostře po celé délce jeho hrany. Rovnoměrným pohybem roztíracího

skla po podložním skle směrem od kapky je rozetřena veškerá krev. Okraje nátěru nedosahují na žádném místě k hranám podložního skla. (7, 35)



Obr 1 Schéma zhotovení krevního nátěru (16)

3.3.1.2 Barvení krevního nátěru

Po zaschnutí krevního nátěru následovalo barvení. V hematologických laboratořích je využíváno převážně panoptické barvení dle Pappenheima s použitím barviv May-Grünwald a Giemsa-Romanovsky. Při tomto nespecifickém barvení dochází k odlišení jednotlivých buněčných struktur na základě jejich pH (kyselé - eozinofilní, zásadité a neutrální – bazofilní). (38)

Toto barvení jsem provedla za asistence laborantek dle postupu stanoveného laboratoří:

- Krevní nátěr se ponoří do první kyvetky, obsahující pracovní čistý roztok May-Grünwald.
- Ve druhé kyvetce následuje opláchnutí promývacím roztokem (fosfátový pufr pH 6,7 – 6,8)
- V další kyvetce je obsažen naředěný roztok Giemsa – Romanowsky s fosfátovým pufrům pH 6,7 – 6,8 v poměru 1:9.
- Ve čtvrté kyvetce opláchneme promývacím roztokem (čistý fosfátový pufr pH 6,7-6,8)
- V páté kyvetce taktéž nátěry opláchneme čistým promývacím roztokem (čistý fosfátový pufr pH 6,7 – 6,8)

Nakonec nátěry opláchneme pod tekoucí vodou a necháme zaschnout. (16, 35)

3.3.1.3 Mikroskopie

Na suchý preparát nanese se kapka imerzního oleje, do kterého následně vnoříme imerzní objektiv (objektivové zvětšení 100x). Krevní nátěr prohlédneme ve světelném mikroskopu. Diferenciální rozpočet v běžné hematologické laboratoři provádíme zhodnocením 100 leukocytů a jejich rozřazením do základních leukocytárních skupin, tj. segment, tyčka, eozinofilní granulocyt, bazofilní granulocyt, monocyt, lymfocyt a případně jeho reaktivní forma. Při počítání buněk je ale rovněž důležité sledovat morfolologii buněk, která může být nápomocná k diagnostice závažných hematologických onemocnění. (16,35)

3.3.2 Hematologický analyzátor

3.3.2.1 Princip metody

V současné době již patří hematologický analyzátor neodmyslitelně do většiny hematologických laboratoří. Dříve běžně používaný 3 populační diferenciál je dnes již nahrazen 5 populačním, kde je možno stanovit monocyty, lymfocyty, neutrofil, eozinofily a bazofily. Ačkoli je analyzátor schopný rozlišit patologické buňky od zdravých pomocí tzv. flagů (upozornění), některé abnormální buňky mohou být přesto identifikovány nepřesně. V tom spočívá jeho hlavní nevýhoda a krevní nátěr je nutné v tomto případě zhodnotit ještě mikroskopicky. Naopak jeho velkou výhodou je rychlost, kdy jeden vzorek je změřen v průměru za 30 – 60 sekund, a přesnost, která je dána množstvím hodnocených buněk. (25)

Pro vlastní měření jsem použila hematologický analyzátor Sysmex XT 1800i, který je využíván na Hematologicko - Transfúzním oddělení v nemocnici Písek. Tento automatický analyzátor je založen na principu fluorescenční průtokové cytometrie. To umožňuje analýzu fyziologických a chemických vlastností buněk. Poskytuje informace jak o velikosti a struktuře buňky, tak o jejím vnitřním obsahu.

Pro měření je potřeba nesrážlivá krev. Analyzátor si nejprve nasaje část vzorku krve, který následně naředí v předem stanoveném poměru. Poté označí fluorescenčním barvivem, které se specificky váže na nukleové kyseliny. Dále je vzorek transportován do průtokové cely a osvětlen polovodičovým laserem, který oddělí buňky pomocí tří různých signálů:

- přímý rozptyl (forward scatter - FSC)
- boční rozptyl (side scatter - SSC)
- fluorescence (side fluorescence light - SFL)

Intenzita FSC ukazuje objem buněk. SSC poskytuje informace o obsahu buněk (např. jádra, granula). SFL indikuje množství DNA a RNA přítomné v buňce. Vyhodnocení je provedeno v grafu zvaném scattergram, kdy buňky s podobnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi v tomto grafu vytvoří shluk. (17)

3.3.3 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda založená na schopnosti analyzovat jednotlivé buňky v suspenzi a jejich fyzikální a chemické vlastnosti. Za použití fluorescenčně značených monoklonálních protilátek umožňuje detekovat jednotlivé antigeny především leukocytárních buněk. (22)

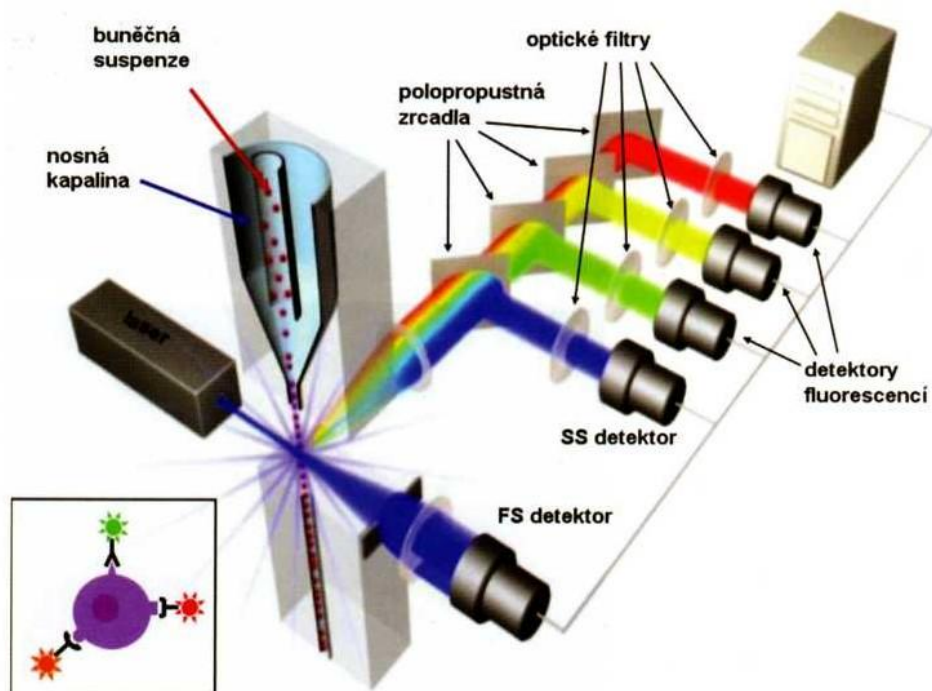
Nejčastěji měřenými parametry jsou:

- Lineárně rozptýlené záření, dopadající na detektor umístěný v ose dopadajícího paprsku, tzv. Forward scatter (FSC). Jeho intenzita je dostačující a není potřeba ji zesilovat. Tento parametr je přímo úměrný velikosti částice. Čím větší je rozptyl světla, tím větší je částice.
- Bočně rozptýlené záření, dopadající na detektor umístěný kolmo na osu dopadajícího paprsku. Nazývá se Side scatter (SSC) a jeho slabší intenzitu je potřeba zesilovat fotonásobičem. SSC odráží granularitu částice, kde rovněž platí přímá úměra. Odraz je tím větší, čím větší je granularita buňky.
- Fluorescenční záření různé vlnové délky. Jeho intenzitu je, stejně tak jako u SS, nutné zesilovat fotonásobičem. Po excitaci zářením o určité vlnové délce dochází k uvolnění energie ve formě fotonů s jinou (delší) vlnovou délkou. Rozdíl mezi vlnovou délkou excitujícího a emitovaného záření se nazývá Stokesův posun. Ten je definován pro každý fluorochrom. Nejčastěji používané fluorochromy jsou FITC, APC, PE a PerCP. (21,27)

Jednotlivé buňky v izotonickém roztoku protékají velmi tenkou tryskou do silnější kapiláry, kterou proudí nosná tekutina (izotonický roztok). To usměrní buňky do tenkého proudu, kde postupují jedna za druhou průtokovou komorou, což je skleněná kapilára o malém průměru. Tento proud protíná laserový paprsek. Tento jev se nazývá hydrodynamická fokusace.

Světlo vznikající interakcí buněk usměrněných hydrodynamickou fokusací při průchodu paprskem laseru (rozptýlené světlo a emitovaná fluorescence) je rozděleno systémem hranolů, optických filtrů a zrcadel podle vlnové délky (barvy) emitované fluorescence. Základními prvky optické soustavy průtokového cytometru jsou long pass filtry – propouštějí světlo od určité vlnové délky a světlo o nižší vlnové délce zachytí, short pass filtry – propouštějí světlo do určité vlnové délky, band pass filtry propouštějí světlo pouze v určitém rozsahu vlnových délek a světlo o nižší i vyšší vlnové délce zachytí.

Jednotlivé světelné signály jsou převáděny na elektrické impulzy a zesíleny fotonásobičem. Takto vzniklé a zpracované signály charakterizují každou jednotlivou buňku řadou parametrů a jsou detekovány v závislosti na intenzitě a následně zpracovány počítačem. (34)



Obr 2 Zjednodušené schéma průtokového cytometru (7)

Měření se vyhodnocuje pomocí různých grafických záznamů, často se používá dvouparametrový histogram, kde na ose x je zobrazena hodnota jednoho signálu a na ose y hodnota druhého signálu. Každá buňka je zde zastoupena tečkou. Množství částic je dáno hustotou bodů. Pokud nás zajímá pouze určitá populace buněk, vytvoříme gate, což je ohraničená oblast částic, kterou chceme dále analyzovat. Vznikne dot-plot histogram rozdělený na 4 kvadranty, negativní pro oba parametry, pozitivní pro jeden a pozitivní pro oba parametry. V jednotlivých kvadrantech pak můžeme kvantifikovat procentuální zastoupení částic. (21, 27)

V imunologické laboratoři nemocnice Na Homolce je využíván průtokový cytometr FACS Calibur a FACS Canto od firmy BD Biosciences.

Pro analýzu buněk pomocí této metody je zapotřebí nesrážlivá plná krev. Ještě než proběhne samotné měření, je zapotřebí připravit vzorek. Přípravu jsem prováděla pod dozorem vedoucích pracovníků imunologického oddělení podle daného postupu:

1. Pro každého pacienta si připravíme 3 cytometrické zkumavky a označíme.
2. Do zkumavek napipetujeme příslušné monoklonální protilátky s navázanou fluorescenční molekulou.
3. Přidáme heparinizovanou krev pacienta a promícháme.
4. Necháme inkubovat 15 minut ve tmě při pokojové teplotě (během této doby dojde k navázání monoklonálních protilátek na cílové antigeny leukocytů).
5. Přidáme lyzační roztok, který způsobí destrukci erytrocytů.
6. Inkubujeme 10 minut při pokojové teplotě (nutné tuto dobu dodržet, v případě překročení může dojít i k rozpadu bílých krvinek).
7. Centrifugujeme 5 minut při 1100 ot/min (velká centrifuga) nebo 1250 ot/min (malá centrifuga).
8. Odlijeme supernatant.
9. Přidáme pufrovací fyziologický roztok, který ukončí lýzu erytrocytů, jemně promícháme a centrifugujeme 5 minut.
10. Odlijeme supernatant.
11. Znovu přidáme pufrovací fyziologický roztok a tím je vzorek připraven k měření.

Zkumavku č. 1 a 2 měříme na průtokovém cytometru FACS Canto II, kde jsou měřeny následující parametry:

- zkumavka č. 1: CD3/CD8/CD45/CD4
- zkumavka č. 2: CD3/CD16+56/CD45/CD19

Třetí zkumavku měříme na průtokovém cytometru FACS Calibur, kde stanovujeme:

- zkumavka č. 3: CD3/HLA-DR (33)

4 Metodika vyšetření žírné buňky

Vyšetření žírné buňky není v hematologických laboratořích v České republice rutinně prováděno. Mastocyty se ale častěji vyšetřují na patologickém oddělení, a to především z kůže nebo tkáně střeva. Příprava preparátu spočívá ve zhotovení tenkých řezů a jejich následném obarvení. Měla jsem možnost vidět 2 způsoby barvení:

May Grünwald – Giemsa Romanowski

1. Preparát naložíme na 2 hodiny do metanolu.
2. Ponoříme na 5 minut do roztoku May Grünwald (neředěný).
3. Ponoříme na 20 minut do roztoku May Grünwald (ředěný v poměru s destilovanou vodou 1:1).
4. Následně naložíme na 40 minut do roztoku Giemsa Romanowski (v poměru s destilovanou vodou 1:4).
5. Opláchneme kyselou vodou (100 ml destil. vody + 5 kapek konc. k. octové)
6. Opláchneme destilovanou vodou.
7. Diferencujeme v etanolu (96%) do světle modrého zbarvení (v případě odbarvování opakujeme bod 5. - 6.).
8. Odvodníme a projasníme – aceton, xylen: po 5 minutách
9. Zamontujeme do Solakrylu.

Toluidinová modř

1. Řezy ponoříme do 1% toluidinové modři na 5 vteřin.
2. Opláchneme kohoutkovou vodou ve 2 lázních
3. Zamontujeme do glycerinu a ihned pozorujeme pod mikroskopem. (37)

5 Výsledky

Nejprve jsem na hematologickém analyzátoru změřila 25 vzorků krve od pacientů různých věkových kategorií. Stejný počet krevních vzorků jsem vyšetřila i mikroskopicky.

Metodou průtokové cytometrie jsem změřila 12 vzorků od náhodných pacientů. Při interpretaci výsledků této metody lze využít textaci uvedenou pod obrázkem č. 3, 4 a 5.

Naměřené výsledky u jednotlivých pacientů je možno porovnat s referenčními hodnotami uvedenými v teoretické části práce.

V poslední části této kapitoly jsou k dispozici fotografie žírné buňky, které jsem získala z histologických preparátů.

Z důvodu ochrany soukromí pacientů, jsem neuvedla jejich jména, rodná čísla a adresy. V tabulkách uvádím pouze pohlaví pacienta, jeho věk a diagnózu.

Tab 3 Vzorky krve změřené v hematologickém analyzátoru

vzorek č.	věk	*10 ⁹ /l	%					diagnóza
		leu	ne	ly	mo	eo	ba	
1	6	8,78	36,9	45,6	7,3	9,2	1	akut. bronchitida
2	75	20,72	86,2	8,4	5,3	0	0,1	bakteriální zánět plic
3	3	7,27	36,6	51,2	9,5	2,3	0,4	akut infekce HCD
4	1	15,94	37	51,9	7,9	3,1	0,1	gastroenteritida
5	2	6,42	45,9	35,2	17	1,4	0,5	gastroenteritida
6	5	13,35	28,6	55,2	12,4	1,3	2,5	akutní zánět hltanu
7	2	11,96	54,8	28,8	13,9	1,2	1,3	salmonelová enteritis
8	1	17,48	54,1	33,8	11,7	0,1	0,3	akutní zánět hltanu
9	3	55,65	75	13,1	11,8	0	0,1	horečka
10	1	19,2	34,4	51,9	7,7	5,8	0,2	nauzea a zvracení
11	18	9,25	18	66,3	13,7	1,5	0,5	infekční mononukleóza
12	3	10,34	7	70	19,6	0,1	3,3	akutní tonzilitida
13	58	19,35	88,4	6,8	3,1	1,5	0,2	sepsse
14	40	7,75	52,6	38,5	7,1	1	0,8	herpes zoster
15	5	13,35	28,6	55,2	12,4	1,3	2,5	akutní zánět hltanu
16	1	17,48	54,1	33,8	11,7	0,1	0,3	akutní zánět hltanu
17	32	16,97	89,6	6,3	4	0	0,1	akutní cystitida
18	44	6,3	48,9	42,2	5,6	3	0,3	herpes zoster
19	56	7,7	56,8	29,3	10,3	3,1	0,5	alergie, autoim. thyroiditis
20	68	20,5	74,3	8,6	7,7	9,3	0,1	urosepsse
21	26	5,3	53,3	26,3	11,1	8,4	0,9	alergie
22	41	7,3	50,7	31,6	8,9	7,4	1,4	alergie, celiakie
23	14	7,7	46,7	44,1	6,8	2,1	0,3	infekční mononukleóza
24	65	22,1	79,6	7,6	8,2	4,3	0,3	mozkový absces
25	30	10,5	11,8	72,8	10,4	4,1	0,9	Infekční mononukleóza

Tab 4 Vzorky krve vyšetřené mikroskopem

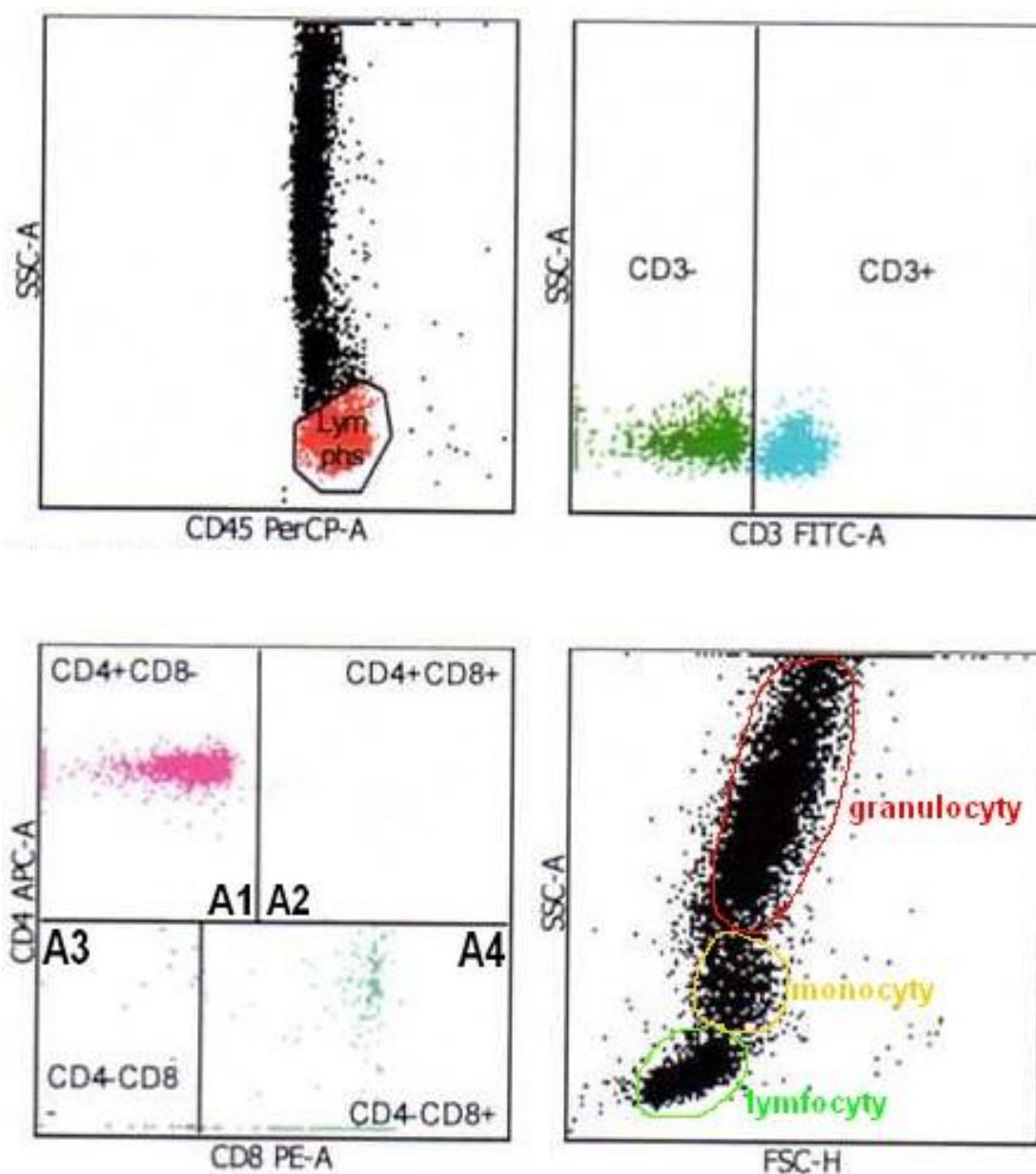
vzorek	věk	%										diagnóza
		se	tyč	eo	ba	mo	ly	RFL	PLB	meta	myelo	
1	6	29	1	12	2	5	48	2	1			Akutní bronchitida
2	75	81	2	0	0	4	9			3	1	Bakt. zánět plic
3	3	40	0	1	1	3	52	3				Akutní infekce HCD
4	1	46	3	2	0	6	40	3				gastroenteritida
5	2	44	14	0	0	7	33	2				gastroenteritida
6	5	25	6	2	0	6	40	21				akutní zánět hltanu
7	2	50	11	0	0	10	26	3				Salmonelová enteritis
8	1	60	7	1	0	6	25	1				Akutní zánět hltanu
9	3	78	10	0	0	5	5			1	1	horečka
10	1	16	1	6	0	3	73	1				nauzea a zvracení
11	18	13	4	2	1	11	59	10				Infekční mononukleóza
12	3	8	4	0	0	11	62	15				Akutní tonzilitida
13	58	47	30	2	0	4	11			5		sepsse
14	40	39	9	0	1	10	41					Herpes zoster
15	5	12	11	2	1	12	42	20				Akutní zánět hltanu
16	1	60	7	1	0	6	25					Akutní zánět hltanu
17	32	71	15	1	0	4	9					Akutní cystitida
18	44	44	7	2	1	7	39					Herpes zoster
19	56	51	3	4	0	12	30					Alergie, autoim.thyroiditis
20	68	46	1	1	0	4	37	10	1			urosepsse
21	26	50	2	9	1	10	28					alergie
22	41	49	3	8	1	10	29					Alergie, celiakie
23	14	39	3	2	1	8	26	21				Infekční mononukleóza
24	65	79	6	4	0	2	6			3		mozk. absces
25	30	15	2	5	1	8	46	23				Infekční mononukleóza

Vzorky krve změřené v průtokovém cytometru

vzorek č. 1: muž, 68 let, dg.: urosepse; léčen již několik dní ATB

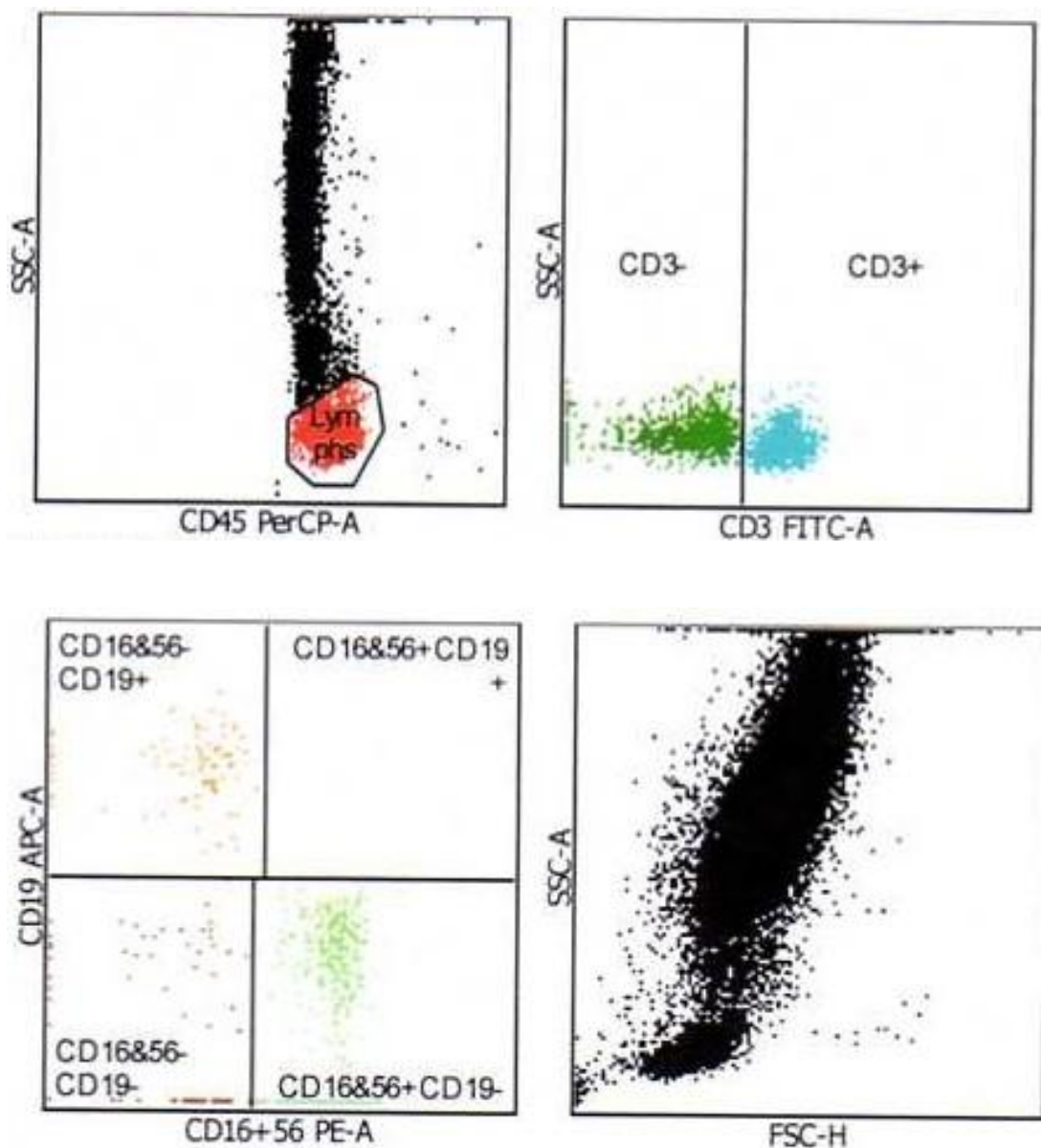
Tab 5 Procentuální vyjádření subpopulací T-lymfocytů u vzorku č. 1

Subpopubace	%
lymfocyty celkem	99
CD3+ (T-ly)	55
CD4+ (T helper)	37
CD8+ (T cytotox)	19
CD19+ (B-ly)	4
CD16+56 (NK bb.)	40
HLA-DR z CD3+	21



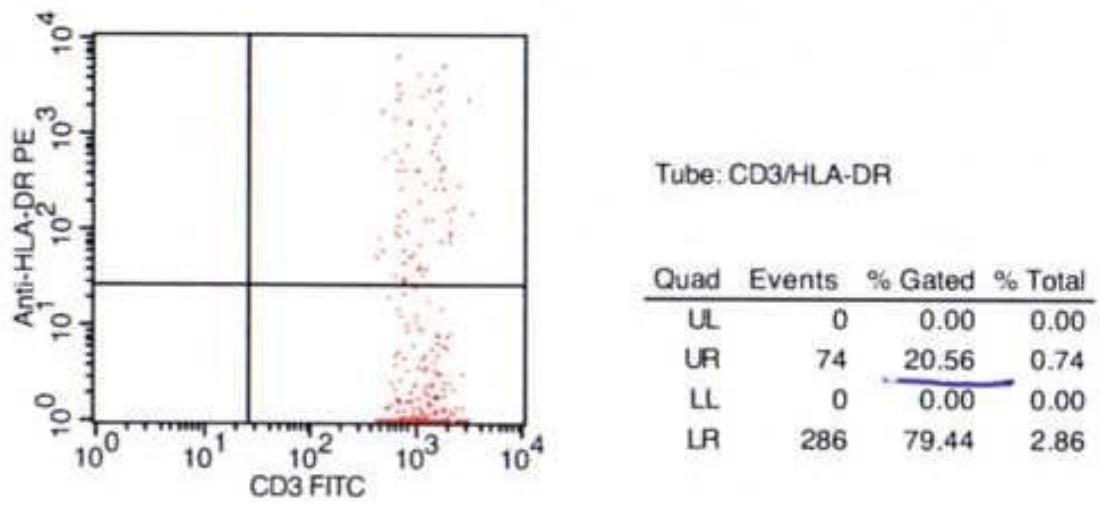
Obr 3 Vyjádření znaků CD3/CD8/CD45/CD4 u pacienta č. 1 (první zkumavka)

Pozn.: CD3 – T lymfocyty, CD8 – cytotoxické T lymfocyty, CD45 – leukocyty, CD4 – pomocné T lymfocyty; na prvním obrázku je červeně označena oblast lymfocytů z celkových CD45; druhý záznam znázorňuje dvouparametrový histogram, kde podle exprese znaku CD3 odlišíme T – lymfocyty od ostatních buněk; třetí záznam je rozdělen do 4 kvadrantů označených A1,A2,A3 a A4, kde např. kvadrant A4 zobrazuje buňky pozitivní pro znak CD8, tedy Tc; poslední záznam ukazuje rozdělení podle exprese leukocytárního znaku CD45 na lymfocyty, monocyty a granulocyty



Obr 4 Vyjádření znaků CD3/CD16+56/CD45/CD19 u pacienta č. 1 (druhá zkumavka)

Pozn.: CD3 – T lymfocyty, CD16+56 – NK buňky, CD45 – leukocyty, CD19 – B lymfocyty; na prvním obrázku je červeně označena oblast lymfocytů z celkových CD45; druhý záznam znázorňuje dvouparametrový histogram, kde podle exprese znaku CD 3 odlišíme T-lymfocyty od ostatních buněk; třetí záznam je rozdělen do 4 kvadrantů označených A1,A2,A3 a A4, kde např. kvadrant A1 zobrazuje buňky pozitivní pouze pro znak CD19; poslední záznam ukazuje rozdělení podle exprese leukocytárního znaku CD45 na lymfocyty, monocyty a granulocyty

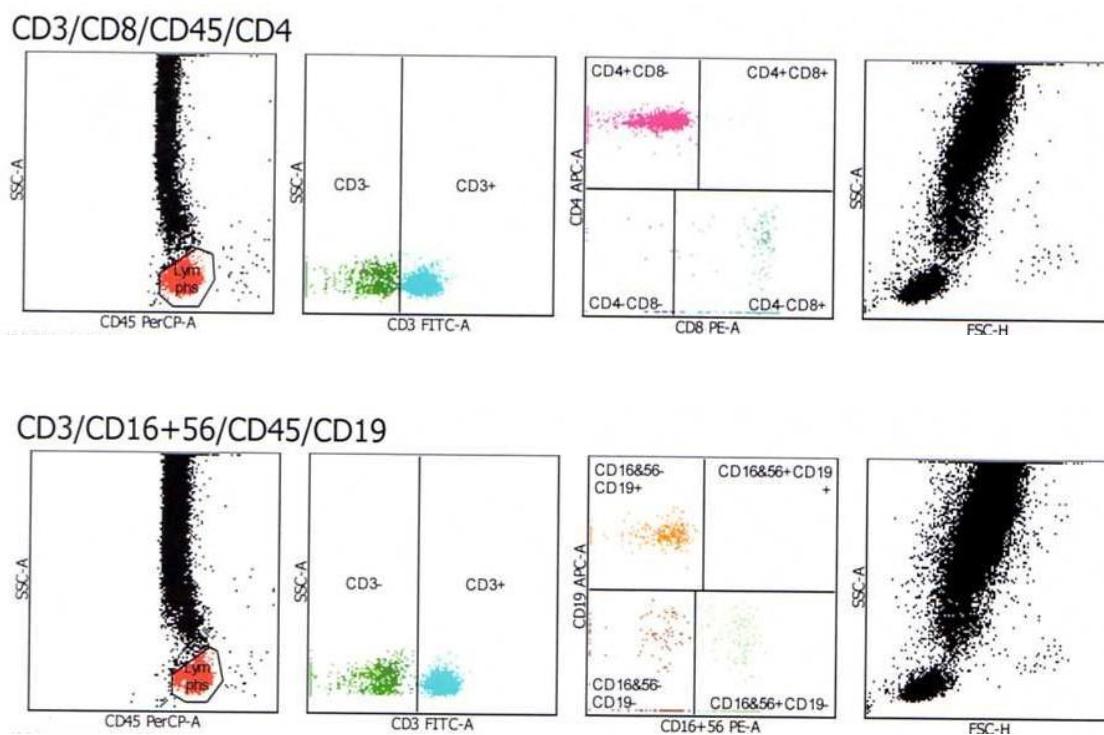


Obr 5 Procentuální vyjádření znaku HLA – DR na CD3+ (aktivované T-lymfocyty) v pravém horním kvadrantu u pacienta č. 1 (třetí zkumavka)

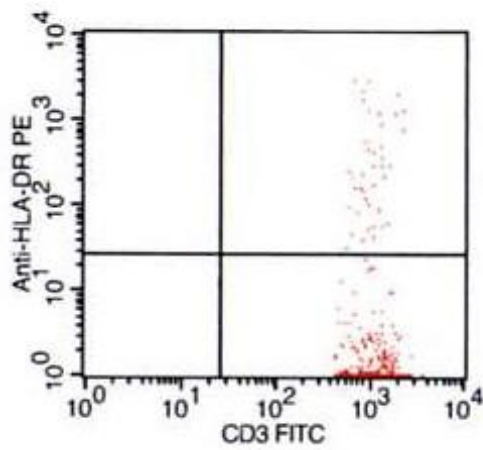
vzorek č. 2: muž, 65 let, dg.: mozkový absces; pacient je již několik týdnů na ATB

Tab 6 Procentuální vyjádření subpopulací T-lymfocytů u vzorku č. 2

Subpopulace	%
lymfocyty celkem	94
CD3+ (T-ly)	72
CD4+ (T helper)	56
CD8+ (T cytotox)	16
CD19+ (B-ly)	11
CD16+56 (NK bb.)	11
HLA-DR z CD3+	10



Obr 6 Grafický záznam z průtokového cytometru u pacienta č. 2



Tube: CD3/HLA-DR

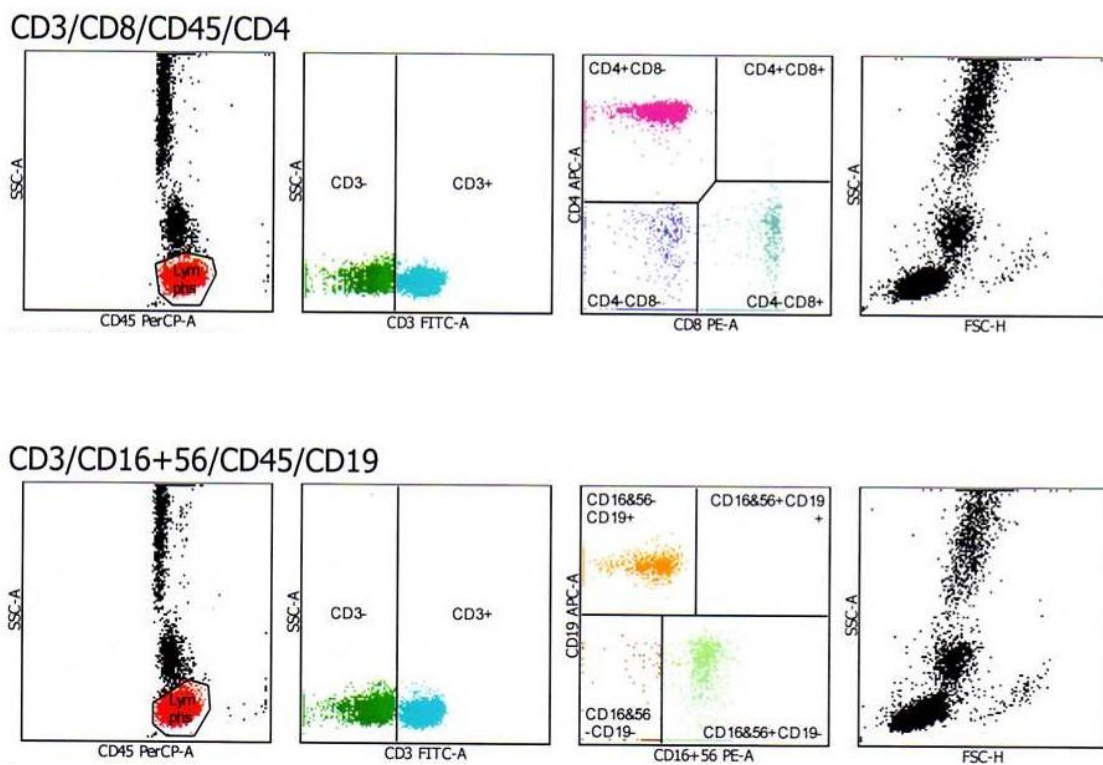
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	42	<u>10.17</u>	0.42
LL	0	0.00	0.00
LR	371	89.83	3.71

Obr 7 Procentuální vyjádření znaku HLA – DR na CD3+ (aktivované T-lymfocyty) v pravém horním kvadrantu u pacienta č. 2

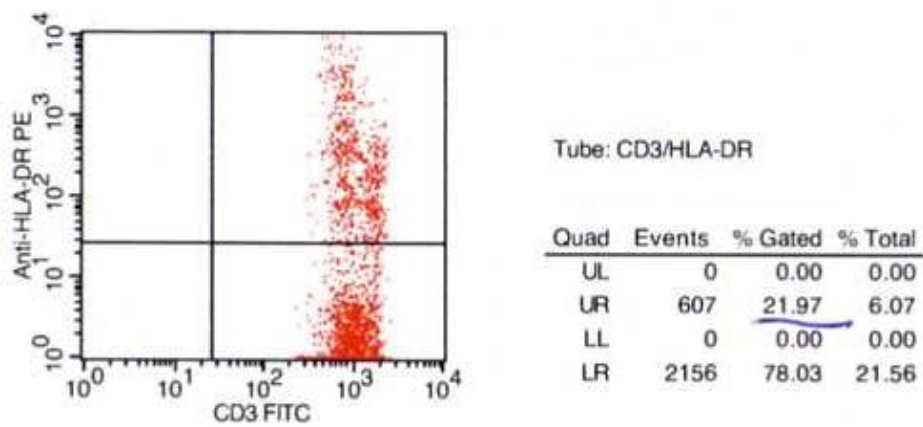
vzorek č. 3: žena, 15 let, dg.: infekční mononukleóza

Tab 7 Procentuální vyjádření subpopulací T-lymfocytů u vzorku č. 3

Subpopubace	%
lymfocyty celkem	98
CD3+ (T-ly)	71
CD4+ (T helper)	38
CD8+ (T cytotox)	31
CD19+ (B-ly)	10
CD16+56 (NK bb.)	17
HLA-DR z CD3+	22



Obr 8 Grafický záznam z průtokového cytometru u pacienta č. 3

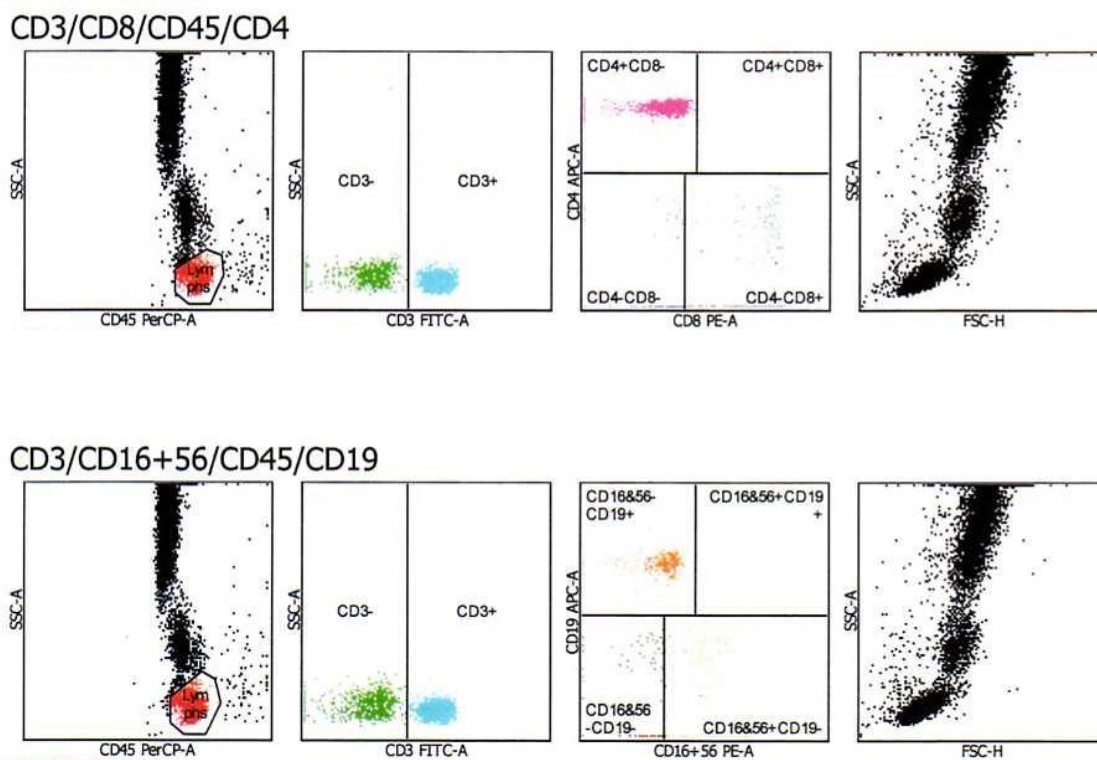


Obr 9 Procentuální vyjádření znaku HLA – DR na CD3+ (aktivované T-lymfocyty) v pravém horním kvadrantu u pacienta č. 3

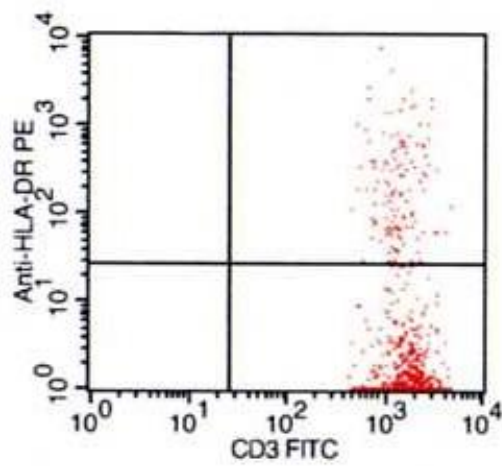
vzorek č. 4: muž, 26 let, dg.: pylová alergie

Tab 8 Procentuální vyjádření subpopulací T-lymfocytů u vzorku č. 3

Subpopubace	%
lymfocyty celkem	98
CD3+ (T-ly)	70
CD4+ (T helper)	42
CD8+ (T cytotox)	26
CD19+ (B-ly)	12
CD16+56 (NK bb.)	16
HLA-DR z CD3+	8



Obr 10 Grafický záznam z průtokového cytometru u pacienta č. 4



Tube: CD3/HLA-DR

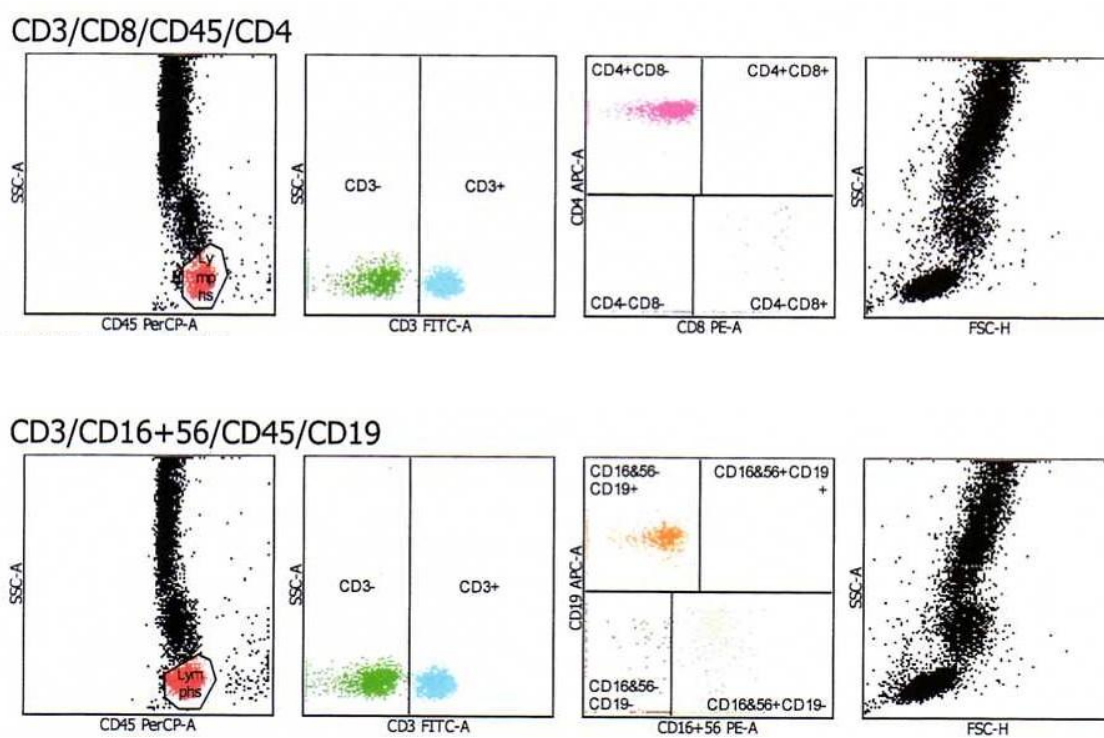
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	131	<u>8.39</u>	1.31
LL	0	0.00	0.00
LR	1430	91.61	14.30

Obr 11 Procentuální vyjádření znaku HLA – DR na CD3+ (aktivované T-lymfocyty) v pravém horním kvadrantu u pacienta č. 4

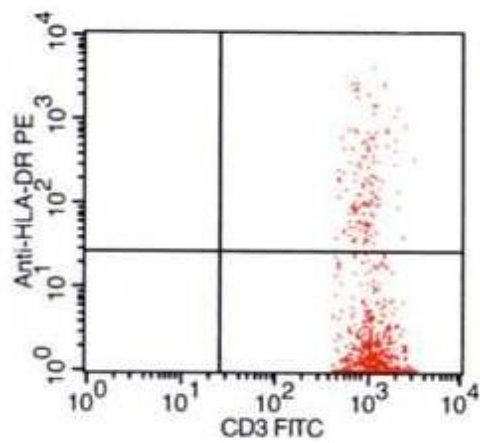
vzorek č. 5: muž, 56 let, dg: alergie na včelí jed, autoimunitní thyroditis

Tab 9 Procentuální vyjádření subpopulací T-lymfocytů u vzorku č. 5

Subpopulace	%
lymfocyty celkem	97
CD3+ (T-ly)	64
CD4+ (T helper)	52
CD8+ (T cytotox)	11
CD19+ (B-ly)	14
CD16+56 (NK bb.)	19
HLA-DR z CD3+	9



Obr 12 Grafický záznam z průtokového cytometru u pacienta č. 5



Tube: CD3/HLA-DR

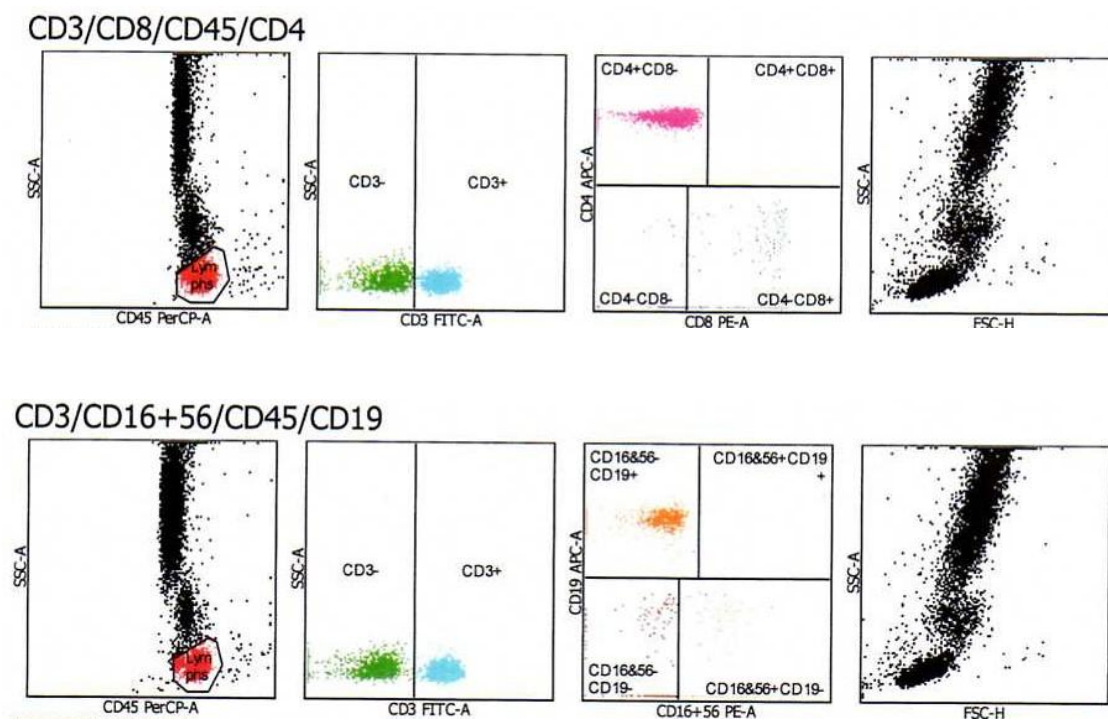
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	133	<u>8.64</u>	1.33
LL	0	0.00	0.00
LR	1406	91.36	14.06

Obr 13 Vyjádření znaku HLA-DR na CD3+ (aktivované T-lymfocyty) u pacienta č. 5

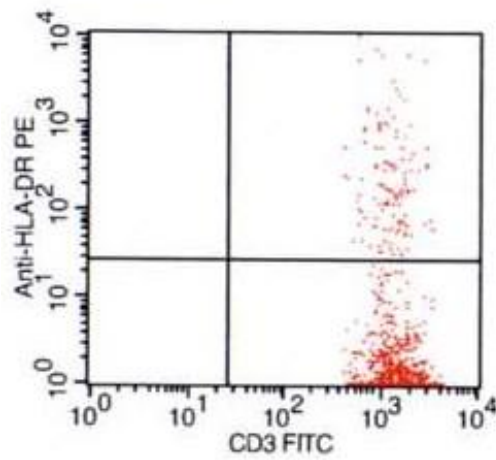
vzorek č. 6: žena, 41 let, dg.: alergie, celiakie

Tab 10 Procentuální vyjádření subpopulací T-lymfocytů u vzorku č. 6

Subpopulace	%
lymfocyty celkem	96
CD3+ (T-ly)	66
CD4+ (T helper)	42
CD8+ (T cytotox)	22
CD19+ (B-ly)	20
CD16+56 (NK bb.)	10
HLA-DR z CD3+	8



Obr 14 Grafický záznam z průtokového cytometru u pacienta č. 6



Tube: CD3/HLA-DR

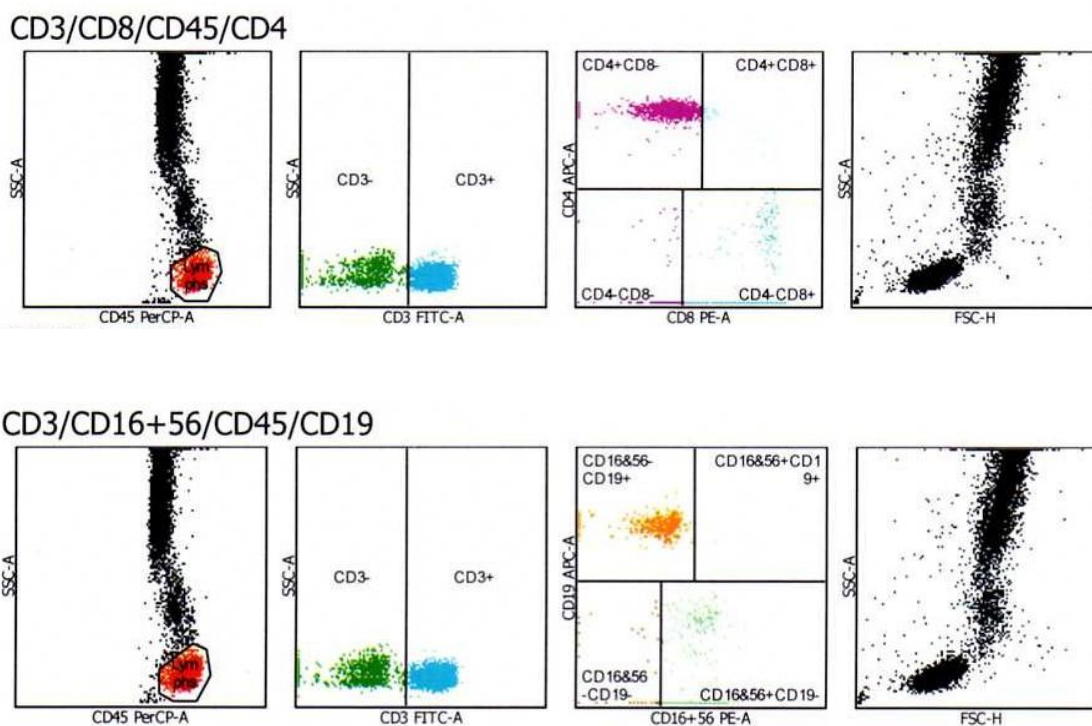
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	123	<u>8.12</u>	1.23
LL	0	0.00	0.00
LR	1392	91.88	13.92

Obr 15 Procentuální vyjádření znaku HLA – DR na CD3+ (aktivované T-lymfocyty) v pravém horním kvadrantu u pacienta č. 6

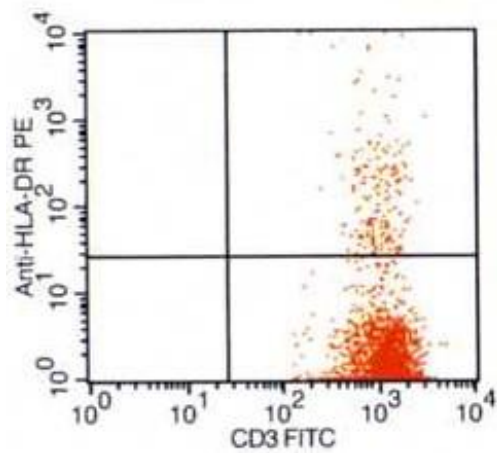
vzorek č. 7: žena, 12 let, dg.: atopická dermatitida

Tab 11 Procentuální vyjádření subpopulací T-lymfocytů u vzorku č. 7

Subpopulace	%
lymfocyty celkem	99
CD3+ (T-ly)	81
CD4+ (T helper)	47
CD8+ (T cytotox)	33
CD19+ (B-ly)	10
CD16+56 (NK bb.)	8
HLA-DR z CD3+	5



Obr 16 Grafický záznam z průtokového cytometru u pacienta č. 7



Tube: CD3/HLA-DR

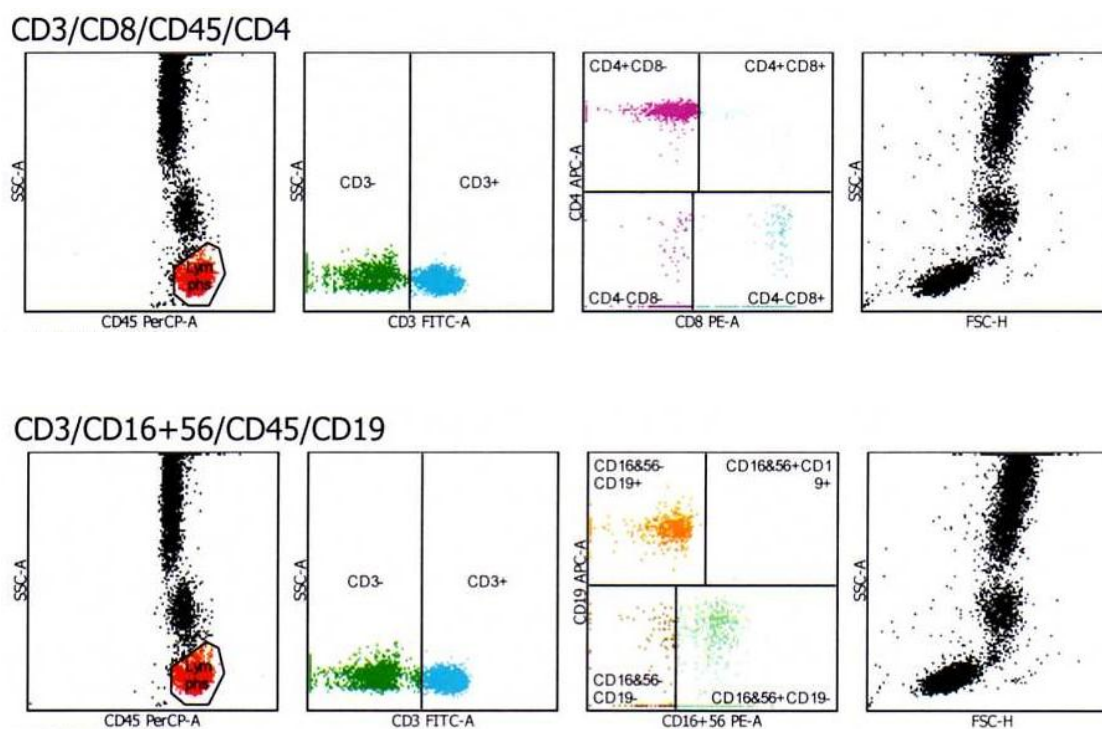
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	162	4.76	1.62
LL	0	0.00	0.00
LR	3244	95.24	32.44

Obr 17 Procentuální vyjádření znaku HLA – DR na CD3+ (aktivované T-lymfocyty) v pravém horním kvadrantu u pacienta č. 7

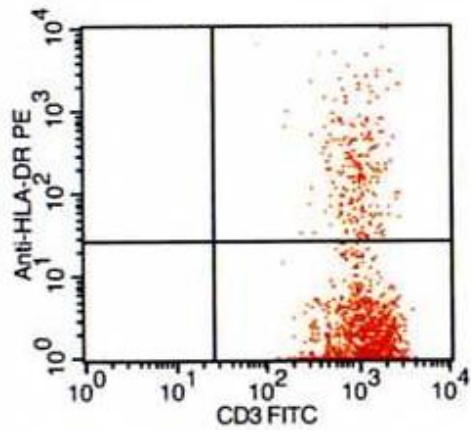
vzorek č. 8: žena, 12 let, dg.: alergie NS

Tab 12 Procentuální vyjádření subpopulací T-lymfocytů u vzorku č. 8

Subpopulace	%
lymfocyty celkem	97
CD3+ (T-ly)	62
CD4+ (T helper)	33
CD8+ (T cytotox)	26
CD19+ (B-ly)	13
CD16+56 (NK bb.)	22
HLA-DR z CD3+	10



Obr 18 Grafický záznam z průtokového cytometru u pacienta č. 8



Tube: CD3/HLA-DR

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	226	10.40	2.26
LL	0	0.00	0.00
LR	1947	89.60	19.47

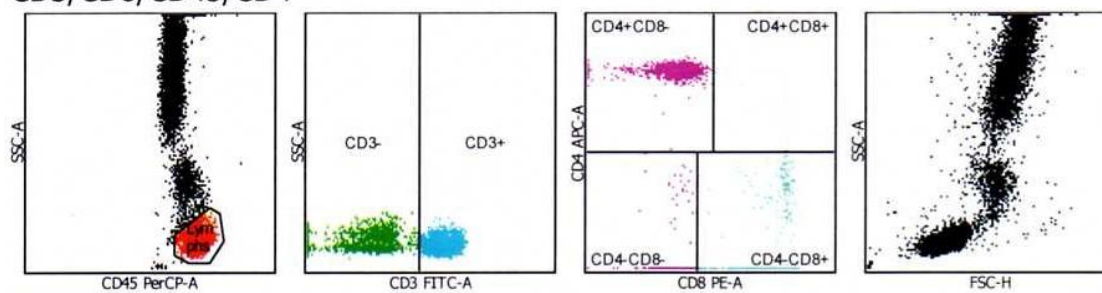
Obr 19 Procentuální vyjádření znaku HLA – DR na CD3+ (aktivované T-lymfocyty) v pravém horním kvadrantu u pacienta č. 8

vzorek č. 9: muž, 12 let, dg.: jiné určené nemoci horních cest dýchacích

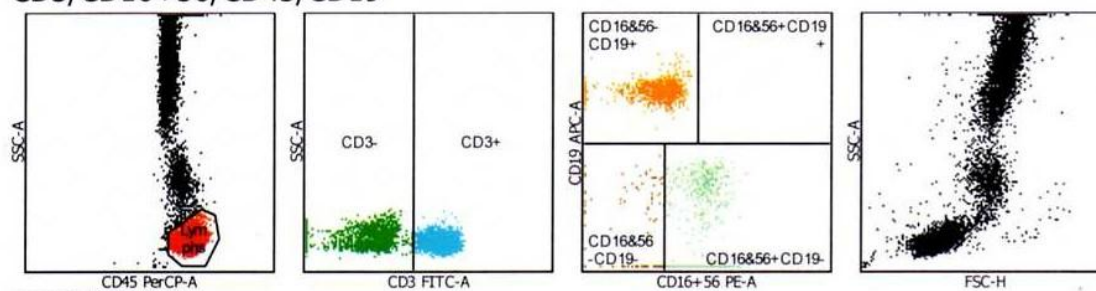
Tab 13 Procentuální vyjádření subpopulací T-lymfocytů u vzorku č. 9

Subpopulace	%
lymfocyty celkem	99
CD3+ (T-ly)	66
CD4+ (T helper)	38
CD8+ (T cytotox)	25
CD19+ (B-ly)	19
CD16+56 (NK bb.)	14
HLA-DR z CD3+	8

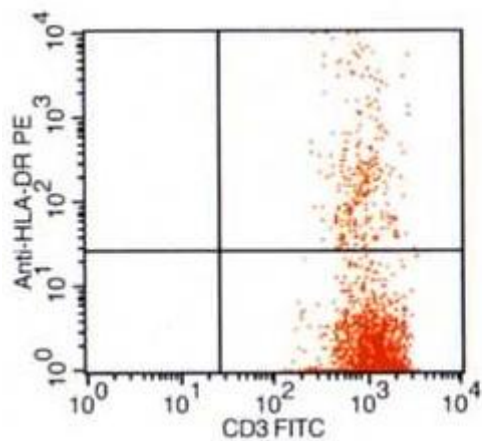
CD3/CD8/CD45/CD4



CD3/CD16+56/CD45/CD19



Obr 20 Grafický záznam z průtokového cytometru u pacienta č. 9



Tube: CD3/HLA-DR

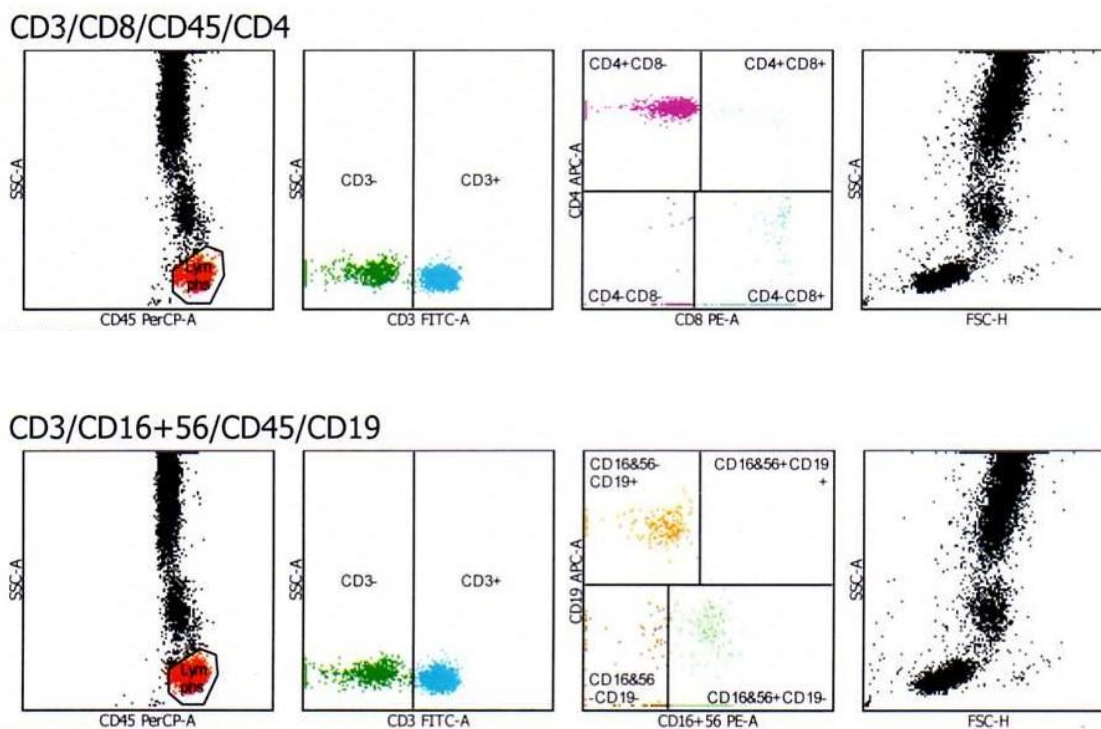
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	252	8.22	2.52
LL	0	0.00	0.00
LR	2815	91.78	28.15

Obř 21 Procentuální vyjádřeni znaku HLA – DR na CD3+ (aktivované T-lymfocyty) v pravém horním kvadrantu u pacienta ř. 9

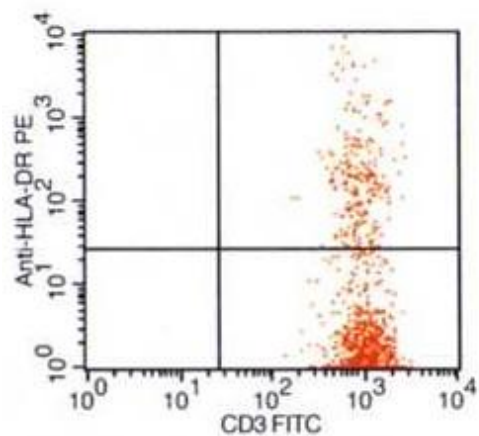
vzorek č. 10: žena, 64 let, dg.: jiné poruchy mechanismů imunity nezařaditelné jinam

Tab 14 Procentuální vyjádření subpopulací T-lymfocytů u vzorku č. 10

Subpopulace	%
lymfocyty celkem	96
CD3+ (T-ly)	76
CD4+ (T helper)	46
CD8+ (T cytotox)	30
CD19+ (B-ly)	6
CD16+56 (NK bb.)	14
HLA-DR z CD3+	13



Obr 22 Grafický záznam z průtokového cytometru u pacienta č. 10



Tube: CD3/HLA-DR

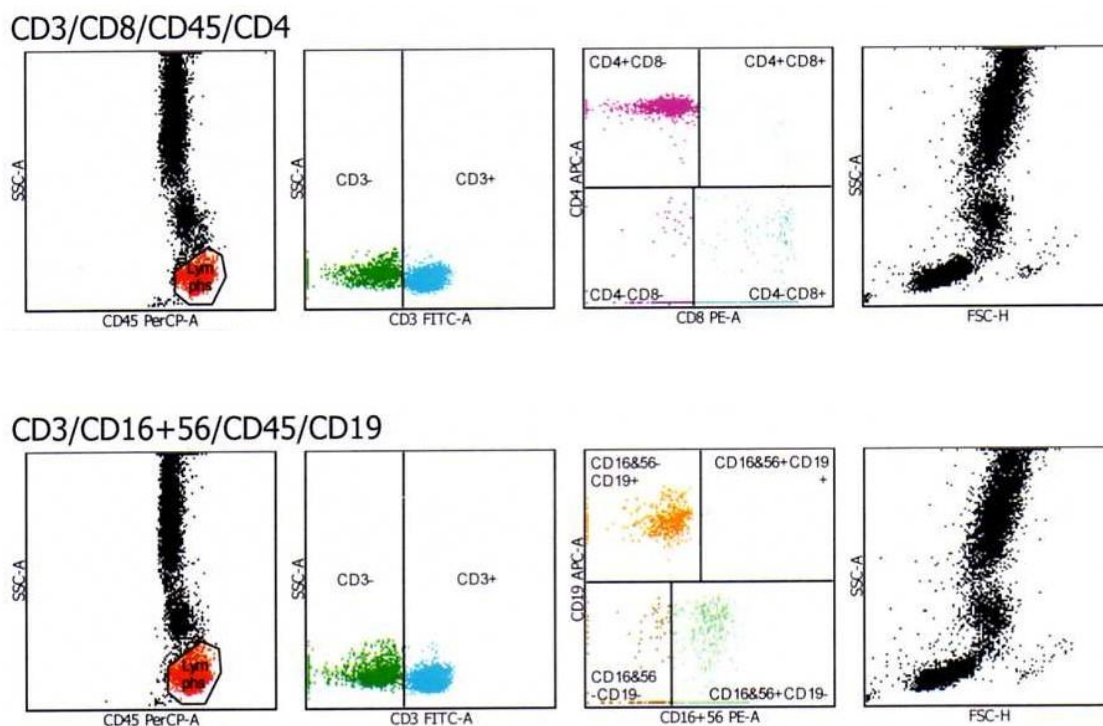
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	214	13.38	2.14
LL	0	0.00	0.00
LR	1386	86.62	13.86

Obr 23 Procentuální vyjádření znaku HLA – DR na CD3+ (aktivované T-lymfocyty) v pravém horním kvadrantu u pacienta č. 10

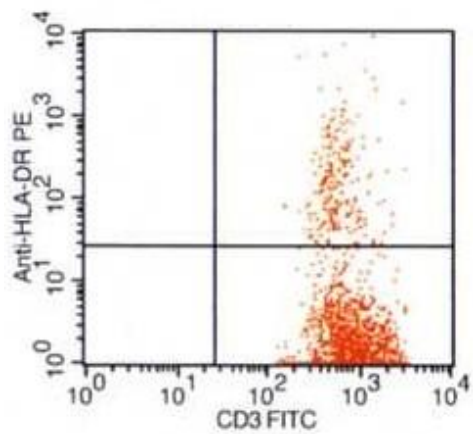
vzorek č. 11: žena, 40 let, dg.: porucha týkající se mechanismů imunity NS

Tab 15 Procentuální vyjádření subpopulací T-lymfocytů u vzorku č. 11

Subpopulace	%
lymfocyty celkem	99
CD3+ (T-ly)	71
CD4+ (T helper)	41
CD8+ (T cytotox)	26
CD19+ (B-ly)	11
CD16+56 (NK bb.)	17
HLA-DR z CD3+	9



Obr 24 Grafický záznam z průtokového cytometru u pacienta č. 11



Tube: CD3/HLA-DR

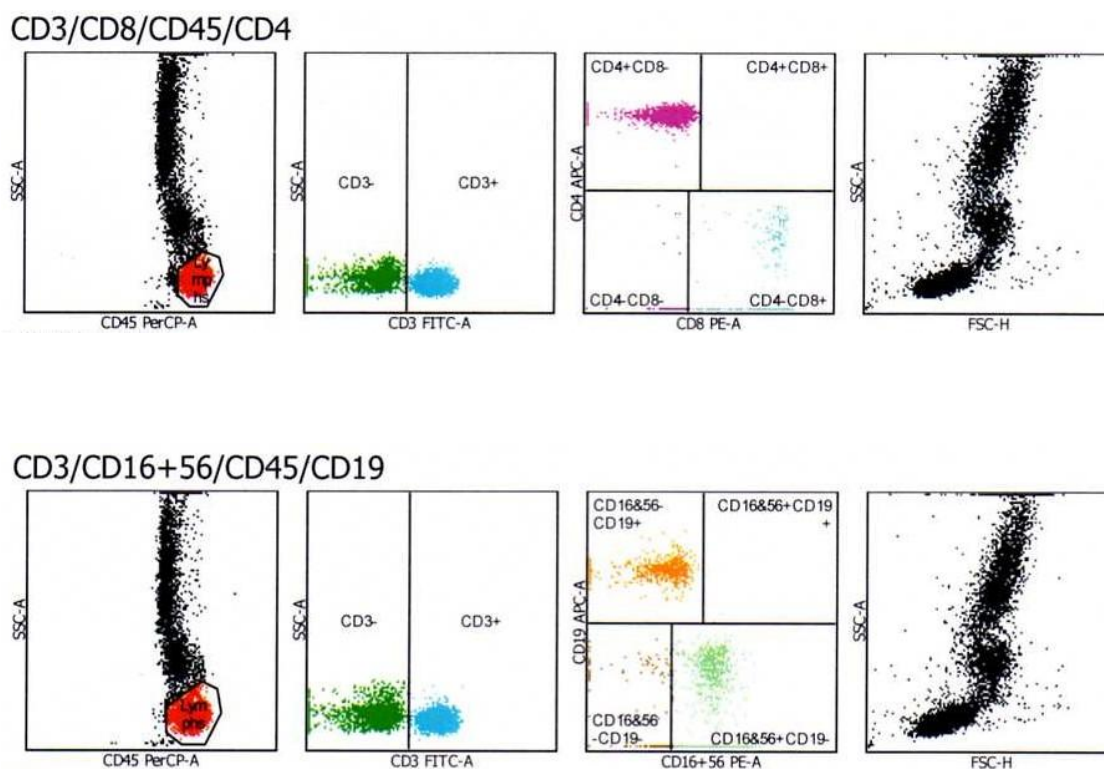
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	214	8.89	2.14
LL	0	0.00	0.00
LR	2194	91.11	21.94

Obr 25 Procentuální vyjádření znaku HLA – DR na CD3+ (aktivované T-lymfocyty) v pravém horním kvadrantu u pacienta č. 11

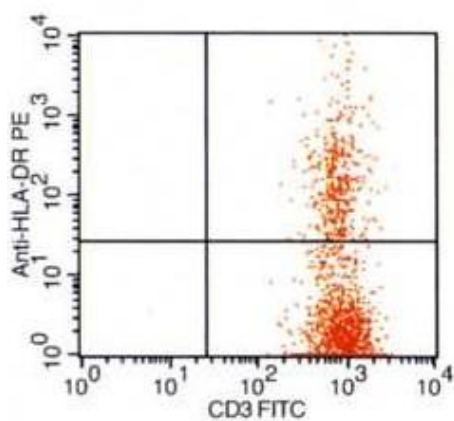
vzorek č. 12: žena, 64 let, dg.: jiné poruchy mechanismů imunity nezařaditelné jinam

Tab 16 Procentuální vyjádření subpopulací T-lymfocytů u vzorku č. 12

Subpopulace	%
lymfocyty celkem	99
CD3+ (T-ly)	66
CD4+ (T helper)	39
CD8+ (T cytotox)	27
CD19+ (B-ly)	11
CD16+56 (NK bb.)	22
HLA-DR z CD3+	16



Obř 26 Grafický záznam z průtokového cytometru u pacienta č. 12



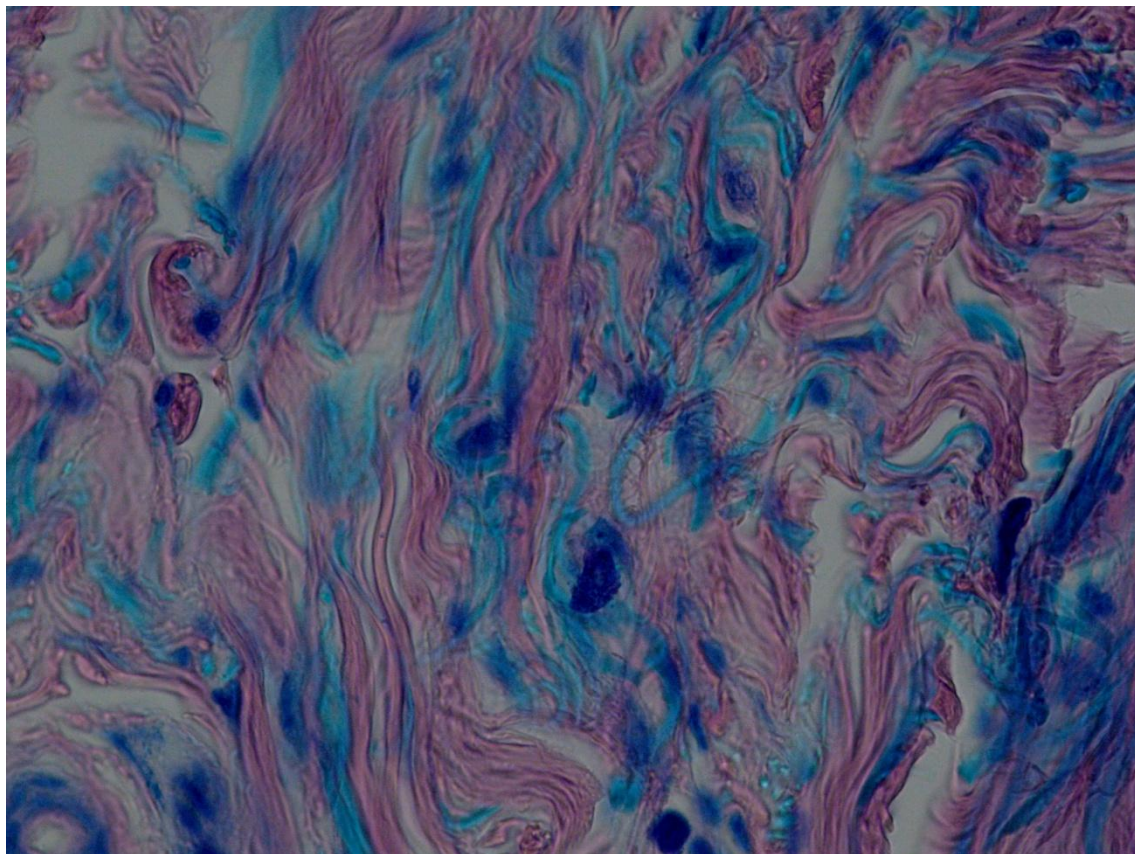
Tube: CD3/HLA-DR

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	364	16.20	3.64
LL	0	0.00	0.00
LR	1883	83.80	18.83

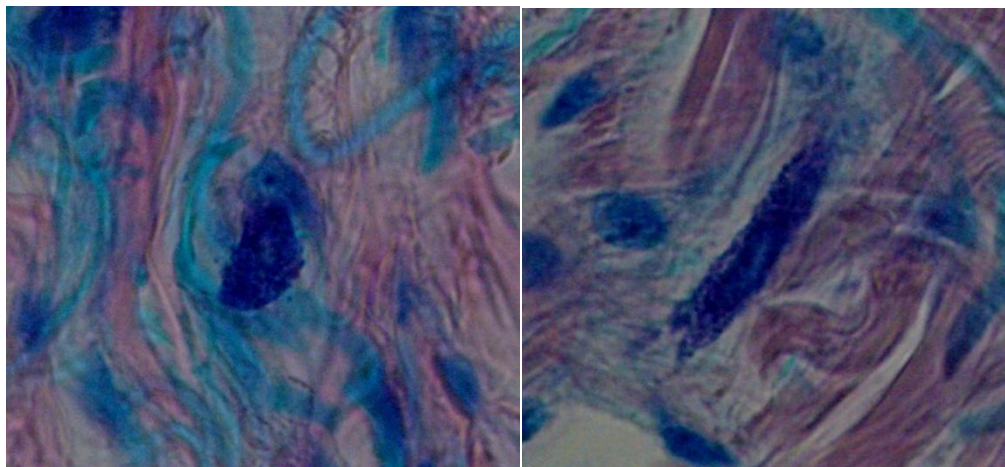
Obr 27 Procentuální vyjádření znaku HLA – DR na CD3+ (aktivované T-lymfocyty) v pravém horním kvadrantu u pacienta č. 12

Žírná buňka

Barvení May Grunwald – Giemsa Romanowski

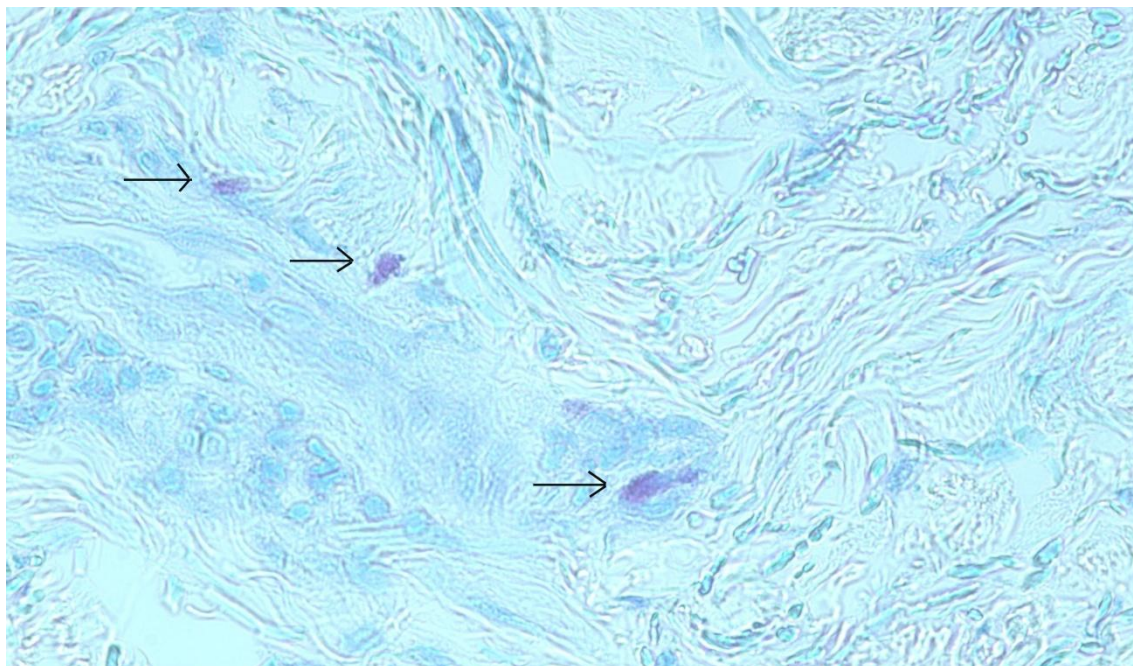


obr 28 Fotografie žírné buňky; preparát kůže. Zvětšení 40x.

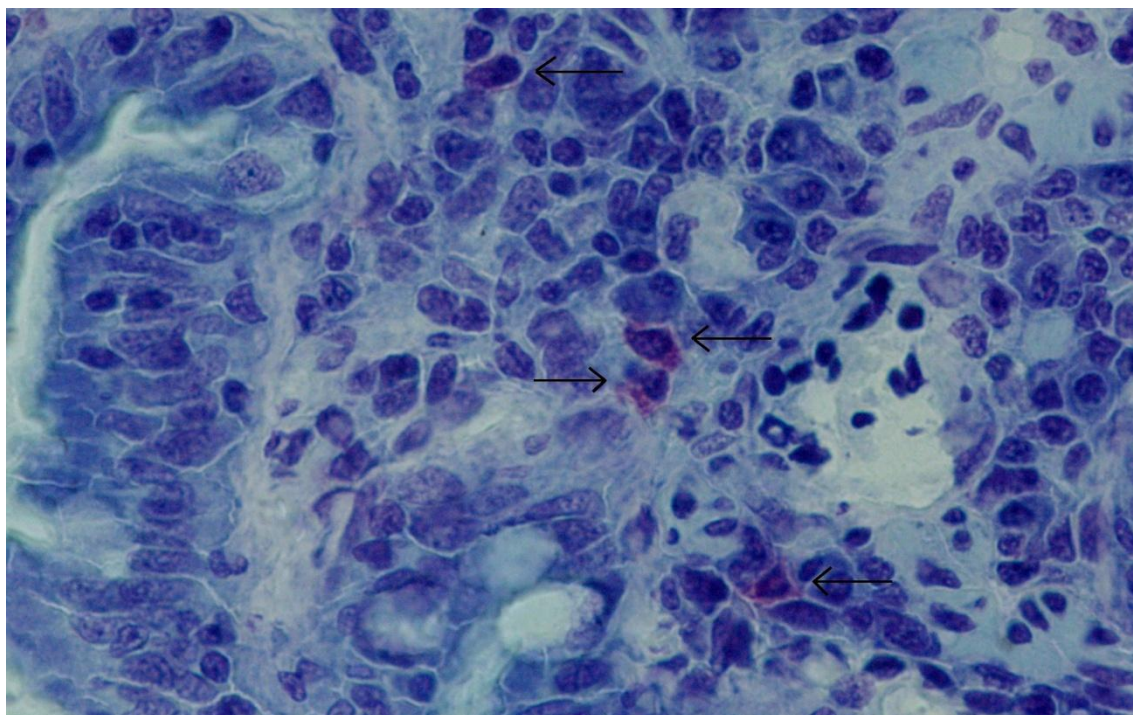


obr 29 Výřezy z předchozí fotografie

Barvení toluidinovou modří



obr 30 Fotografie žírných buněk; preparát kůže.



obr 31 Fotografie žírných buněk; preparát kůže.

6 Diskuse

Problémem při zpracování této bakalářské práce bylo získat možnost praktického zpracování tématu. Téma práce bylo katedrou schváleno, ale pracovníci fakulty nezískali svolení ke zpracovávání biologického materiálu v nemocnici České Budějovice, především vzorků k cytometrickým vyšetřením. Proto jsem si, ve spolupráci s vedoucím práce, musela zajistit možnost tohoto vyšetření na pražském pracovišti Imunologické laboratoře OKBHI Nemocnice Na Homolce. Další problém se vyskytl v souvislosti se získáním možnosti zachytu žírné buňky. Mastocyt je v teoretických sděleních popisován jako ústřední buňka u alergických a zánětlivých reakcí. Získala jsem tedy dojem jednoduchého přístupu k zobrazení této buňky. V průběhu studia jsem však zjistila svůj omyl. V hematologických laboratořích je možnost diagnostikovat mastocyt v krvi nebo kostní dřeni velmi omezená. Na konec jsem měla možnost vyšetřit a zobrazit žírnou buňku z kůže s laskavostí paní MUDr. Katariny Lukáčové z patologického oddělení Nemocnice České Budějovice. Tuto cestu mi doporučil profesor Smetana.

Při mikroskopickém vyšetřování krevních obrazů jsem využila metodiky, která je používána v laboratořích na Homolce a v nemocnici v Písku. Metodika vychází ze základních prací (Dubská, Pecka, Penka, Mikulenková). Lze konstatovat, že metodika, kterou jsem při mikroskopickém vyšetřování krevního obrazu použila, se nelišila od výše uvedených doporučení.

Vyšetřila jsem 25 patientských vzorků jak mikroskopickou, tak přístrojovou metodou. Tito pacienti ale byli vybráni náhodně, tzn. liší se jak věkem, tak diagnózou a nelze je tedy v rámci jedné metody nijak porovnávat. Stejní pacienti ale byli vyšetřeni oběma metodami a při vyhodnocení jsem zjistila, že se výsledky jednotlivých pacientů výrazně neliší a lze je považovat za srovnatelné.

V současné době stále nejsou vyvinuty hematologické analyzátory, které by měly dostatečnou citlivost pro patologické buňky, což může být velký problém především u pacientů s hematologickým onemocněním (nejčastěji se jedná o leukémie). (36) Pacient s touto diagnózou se však mezi mnou analyzovanými vzorky nevyskytoval. Převážnou většinu vyšetřovaných tvořili pacienti se zánětlivým onemocněním. I zde

jsem ale našla patologické nebo jiné abnormální buňky, které přístroj nevyhodnotil. Reaktivní formy lymfocytů se nacházely u většiny nemocných pacientů. Jako příklad uvedu 3 pacienty s diagnostikovanou infekční mononukleózou, kdy u 2 z nich přesahoval počet RFL 20%, u jednoho jsem současně našla plazmatické buňky. V některých vzorcích jsem prokázala přítomnost nezralých buněk, nejčastěji neutrofilní tyč (24 z 25 vzorků), ale i další s výrazně nižším zastoupením - metamyelocyt (4 z 25 vzorků) a myelocyt (2 z 25 vzorků).

Při vyšetřování krevního obrazu pomocí hematologického analyzátoru jsem měla možnost využít analyzátor Sysmex XT 1800i. Tento analyzátor má podle firemní informace Sysmex řadu výhod proti ostatním podobným výrobkům. (26) Tato výhoda spočívá především ve skutečnosti, že lze bohatě nalézt širokou škálu nezralých buněk a tím je dána možnost monitorování zánětu v průběhu terapie a snížit potřebu mikroskopických vyšetření. Vzhledem k tomu, že jsem pracovala tímto systémem, nemohu se vyjadřovat k eventuelním přednostem jiných podobných analyzátorů.

Ačkoliv mikroskopické vyšetřování diferenciálního rozpočtu leukocytů je v současné době na velkém ústupu, v rutinních laboratořích je stále považován za referenční metodu. Hematologický analyzátor totiž není schopný s jistotou identifikovat abnormálně změněné buňky, které jsou však mnohdy klíčovou indicií v diagnostice závažných onemocnění. V případě podezření je proto nutné provést mikroskopické zhodnocení zkušeným laboratorním pracovníkem, který je schopen tyto změny rozpoznat.

Metodou průtokové cytometrie byl u všech 12 pacientů vyšetřen základní panel lymfocytárních subpopulací. Indikace k těmto vyšetřením je stanovení různých buněčných populací v krvi ev. v jiných tělesných tekutinách. Jedná se i současně nejdokonalejší hodnocení buněčných suspenzí. Konkrétně se jedná o imunofenotypizace leukemií a lymfomů. Dále průtoková cytometrie pomáhá k analýze DNA, k funkčnímu vyšetření leukocytů, k diagnostice defektů imunity. Metoda je vhodná k monitorování autoimunních chorob, využívá se v transplantační imunologii, k monitorování zánětů a diagnostice alergických onemocnění. (22,27) Toto vyšetření je indikováno v první řadě při podezření na imunodeficienci, pro diagnostiku primárních imunodeficiencí je to

vyšetření zásadní. Dle literatury jsou vzhledem k frekvenci výskytu indikována neúměrně často. (21)

Přednosti průtokové cytometrie spočívají především ve vysoké frekvenci jednotlivých částic. Velké množství analyzovaného materiálu – velké objemy dat. Analýza je rychlá a poskytuje velké množství informací. Lze provádět jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu. Je možné třídit buňky s vybranými vlastnostmi (cell sorting). Jednoduchá příprava vzorku k analýze. (Celá příprava většinou nezabere víc než 1 hodinu.) Nevýhodou je vysoká finanční náročnost, je nutné pro analýzu získat osobu s velkými a dlouhodobými zkušenostmi, je nutné vzorky dopravit po odběru okamžitě ke zpracování do laboratoře (pracuje se s živými buňkami). (27)

Vyšetřování žírné buňky z periferní krve probíhalo zpočátku se značnými komplikacemi. Jak uvádí literatura, žírná buňka se nachází na rozhraní organismu a vnějšího prostředí. Je to tedy tkáňový element, který se v periferní krvi za fyziologických okolností nevyskytuje. (1) Z tohoto důvodu bylo velmi obtížné ho z periferní krve i kostní dřeně prokázat, což se mi sice po delší době nakonec velmi nedokonale podařilo, ale přičítám to spíše náhodě. Mnohem snadněji prokazatelný je v histologickém preparátu, ale i zde je nezbytná určitá zkušenost laboratorního pracovníka. Pro průkaz žírných buněk jsou nutná speciální barvení: kresyl violet (fialová granula v cytoplazmě), Giemsa (modrá granula), toluidinová modř nebo reakce na naftol-ASD chloracetát esterázu (granula se barví červeně). Já, ve spolupráci s pracovníkem histologické laboratoře, jsem využila dvojí metodu, obvyklejší - barvení May Grunwald – Giemsa Romanowski a barvení toluidinovou modří, která se dle literárních údajů (32) používá mnohem vzácněji.

Z uvedeného vyplývá, že nároky na zdravotního laboranta, který bude pracovat s diagnostikou zánětových buněk, jsou vysoké.

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo získat zkušenosti s metodikou vyšetřování buněk zánětu a interpretaci získaných výsledků tj. vyšetřit buňky zánětu pomocí třech metod a to mikroskopickým odečtením diferenciálního rozpočtu leukocytů, změřením diferenciálu hematologickým analyzátozem a metodou průtokové cytometrie. V průběhu přípravy bakalářské práce jsem si osvojila základy vyšetřování žírné buňky.

Naučila jsem se ovládat vyšetřování buňky zánětu a to metodou mikroskopickou i pomocí hematologických analyzátorů. Zhodnotila jsem přednosti a nedostatky obou metod. Seznámila jsem se s nimi po stránce teoretické i praktické a to v části preanalytické přípravy i při vlastním vyšetřování. U samotných metod tedy ovládám techniku, provedení i vyhodnocení výsledků.

Seznámila jsem se s principem průtokového cytometru a to po stránce teoretické i praktické.

Aktivně jsem se zúčastnila v příslušné laboratoři při vyšetření 25 vzorků krve přístrojově i mikroskopicky a zdokumentovala 12 cytometrických vyšetření.

Naučila jsem se vyšetřovat žírnou buňku ve tkáni. Nepodařilo se mi přesně diagnostikovat žírnou buňku v krevním obraze a kostní dřeni. Podle osobního sdělení profesora Smetany vyšetřování žírné buňky se v hematologických laboratořích neprovádí.

8 Seznam použitých zdrojů

- 1) STITES, Daniel P a Abba I TERR. *Základní a klinická imunologie*. Praha: Victoria Publishing, 1994, 744 s. ISBN 80-856-0537-6.
- 2) KOPŘIVA, František. Praha: Maxdorf, 2003, 224 s., viii s. obr. příl. ISBN 80-85912-73-2.
- 3) FERENČÍK, Miroslav. *Zápal, horúčka, bolest'*. [1. vyd.]. Bratislava: Slovart, c1997, 215 s. ISBN 80-856-6581-6.
- 4) HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009, 316 s. ISBN 978-80-7387-280-9.
- 5) PATE, Mariah, et al. Endothelial cell biology: role in the inflammatory response. *Advances in clinical chemistry*, 2010, 52: 109-130.
- 6) KADL, Alexandra; LEITINGER, Norbert. The role of endothelial cells in the resolution of acute inflammation. *Antioxidants & redox signaling*, 2005, 7.11-12: 1744-1754.
- 7) PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011, 421 s. ISBN 978-80-247-3459-0.
- 8) HULÍN, Ivan. *Patofyziológia*. 6. preprac. vyd. Bratislava: SAP, 2002, 1397 s.: ISBN 80-891-0405-3.
- 9) PENKA, Miroslav a Alena BULIKOVÁ. *Neonkologická hematologie*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2009, 240 s. ISBN 978-802-4722-993.

- 10) WEISSMANN, Gerald a J GORDON. *The Cell biology of inflammation*. New York: sole distributors for the USA and Canada, Elsevier/North-Holland, 1980, xxii, 714 p. ISBN 04-448-0141-3.
- 11) GLEICH, G a A KAY. *Eosinophils in allergy and inflammation*. New York: M. Dekker, c1994, xxiv, 496 p. ISBN 08-247-9121-5.
- 12) BUC, Milan a Abba I TERR. *Imunológia*. 1. vyd. Bratislava: VEDA vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, 2001, 463 s. ISBN 80-224-0667-8.
- 13) GOLDSBY, Richard A a Richard A GOLDSBY. *Immunology*. 5th ed. New York: W. H. Freeman, c2003, xxiii, 549, [56] p. ISBN 07-167-4947-5.
- 14) VÁCHA, Jiří. *Pathologická fyziologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1993, 179 s. ISBN 80-210-0564-5.
- 15) SERHAN, Charles N, Peter A WARD a Derek W GILROY. *Fundamentals of inflammation*. 1. vyd. New York: Cambridge University Press, 2010, xiv, 473 p. ISBN 978-052-1887-298.
- 16) MIKULENKOVÁ, D., M. MATÝŠKOVÁ a L. BOURKOVÁ. Příprava a barvení nátěru periferní krve a aspirátu kostní dřeně. [online]. 2013, s. 1-10 [cit. 2014-06-12]. Dostupné z: http://www.sekk.cz/infoservis/CHS_doporuceni-barveni.pdf
- 17) *Systemex - XT-1800i* [online]. 2014 [cit. 2014-06-15]. Dostupné z: http://systemex.org.ua/images/XT-1800i/Systemex_XT-1800i.pdf

- 18) DRAKE, Victoria J. Two Faces of Inflammation. *Linus Pauling Institute at Oregon State University* [online]. 2007 [cit. 2014-05-15]. Dostupné z: <http://lpi.oregonstate.edu/ss07/inflammation.html>
- 19) GORDON, J. *Platelets in biology and pathology*. New York: Sole distributors for the U.S.A. and Canada, Elsevier/North-Holland, 1976-1981, v. <1, 2 >. Research monographs in cell and tissue physiology, v. 1, etc. ISBN 07204060131.
- 20) LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. 1. české vyd. Překlad Radomír Čihák. Praha: Grada, 2012, xx, 556 s. ISBN 9788024737294.
- 21) BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2005, 176 s. ISBN 80-247-0691-1.
- 22) PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: buňka a krvetvorba*. 1. vyd. Český Těšín: FINIDR, 2002, 160 s. ISBN 80-866-8201-3.
- 23) KUBÁNKOVÁ, Helena: *Laboratorní příručka HTO*. Nemocnice Písek, a.s., 2014.
- 24) SCOTT, A., et al. What is “inflammation”? Are we ready to move beyond Celsus?. *British journal of sports medicine*, 2004, 38.3: 248-249.
- 25) SCOTT, A., et al. What do we mean by the term “inflammation”? A contemporary basic science update for sports medicine. *British journal of sports medicine*, 2004, 38.3: 372-380.
- 26) Sysmex: portál pro pacienty. [online]. 2015. vyd. [cit. 2015-04-27]. Dostupné z: <http://www.sysmex.cz/produkty/xt-1800i-1092.html>

- 27) ROUBALOVÁ, L. Průtoková cytometrie: laboratorní technologie. [online]. s. 1-5 [cit. 2014-06-12]. Dostupné z:<http://web2.stapro.cz/bullfons/22012/labo1.pdf>
- 28) POBER, Jordan S.; SESSA, William C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 2007, 7.10: 803-815.
- 29) WEEDON, David a Geoffrey Strutton CONTRIBUTORS. *Weedon's skin pathology*. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier, 2010. ISBN 9780702034855.
- 30) Immunostep: we know how. [online]. [cit. 2014-07-16]. Dostupné z: <http://www.immunostep.com/two-color-reagents/1392-hla-dr-cd3.html>
- 31) PAULÍKOVÁ, Edita. Buňky imunitního systému. In: [online]. [cit. 2015-04-27]. Dostupné z: <http://editapaulikova.science.upjs.sk/imu/files/tahaj/imu2.pdf>.
- 32) FEIT, Josef, Josef FEIT, Hana JEDLIČKOVÁ, Zdeněk VLAŠÍN, Günter BURG, Werner KEMPF, Luděk MATYSKA: Hypertextový atlas dermatopatologie. *Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů :: Portál Lékařské fakulty Masarykovy univerzity* [online] 14.11.2005, poslední aktualizace 2.2.2010 [cit. 2015-04-27] Dostupný z WWW: <<http://portal.med.muni.cz/clanek-315-hypertextovy-atlas-dermatopatologie.html>>. ISSN 1801-6103.
- 33) SEDLÁČKOVÁ, Lenka. *Pracovní postup: Doplněk k SOP č. 40*. Praha: Nemocnice Na Homolce, 2011.
- 34) ECKSCHLAGER, Tomáš. *Průtoková cytometrie v klinické praxi*. 1. vyd. Praha: Grada-Avicenum, 1999, 169 s. ISBN 8071692794.
- 35) KUBÁNKOVÁ, Helena. *Pracovní postup*. Nemocnice Písek, 2014

- 36) TOHYAMA, K., Shiga, S., et al. Improved detection of minimal acute myeloid leukemia cells by the use of the combined parameters of XE-2100 hematology analyzer. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 2005, 1: 18-24.
- 37) POLÍVKOVÁ, Jana. *Pracovní postup*. Nemocnice České Budějovice, 2014
- 38) MAYER, Jiří a Jan STARÝ. *Leukemie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2002, 357 s., [32] s. obr. příl. ISBN 80-716-9991-8.
- 39) DUBSKÁ, Ladislava: Laboratorní příručka OKBHI: *Příloha č. 3 Podrobný seznam vyšetření – IMUNOLOGIE*. Praha: Nemocnice Na Homolce, 2014.

9 Klíčová slova

zánět

buňky zánětu

leukocyty

průtoková cytometrie

hematologický analyzátor

diferenciální rozpočet leukocytů

Key words

inflammation

inflammatory cells

leukocytes


flow cytometry

hematology analyzer

differential count of leucocytes


10 Přílohy

Příloha č. 1: Žádanka na hematologické vyšetření (Nemocnice Na Homolce)

 Odd. klinické biochemie, hematologie a imunologie www.homolka.cz Roentgenova 2 Tel.: (+420) 2 5727 2420 150 30 Praha 5 Fax.: (+420) 2 5727 2426	RUTINNÍ BIOCHEMIE		
	STATIM <input type="checkbox"/>		
Žádanka bude elektronicky zpracovávána, vypňujte pouze ČERNOU propisovací tužkou dle dole uvedeného vzoru!			
Titul před <input type="text"/> Jméno <input type="text"/>		MÍSTO PRO NALEPENÍ ČÁROVÉHO KÓDU V LABORATORII	
Příjmení <input type="text"/> Titul za <input type="text"/>			
Datum narození <input type="text"/>	Rodné číslo / číslo pojistěnce <input type="text"/>	Pohlaví <input type="checkbox"/> Muž <input type="checkbox"/> Žena	
Kód lékaře <input type="text"/>	Odbornost <input type="text"/>	Výška(cm) <input type="text"/>	
Oddělení <input type="text"/>	Diagnóza <input type="text"/>	Váha(kg) <input type="text"/>	
Datum odběru <input type="text"/>	Hodin <input type="text"/>	Udlost <input type="text"/>	
Minut <input type="text"/>			
Plasma Li/Hep-5ml-10ml		Moč-Sběr-10ml	Plasma Citr.-FW-5ml
<input type="checkbox"/> 10 Sodík <input type="checkbox"/> 120 Cholesterol celkový <input type="checkbox"/> 11 Draslík <input type="checkbox"/> 121 HDL-cholesterol <input type="checkbox"/> 12 Chloridy <input type="checkbox"/> 114 LDL-cholesterol <input type="checkbox"/> 13 Vápník celkový <input type="checkbox"/> 124 Triacylglyceroly <input type="checkbox"/> 15 Hořčík <input type="checkbox"/> 180 CRP <input type="checkbox"/> 17 Fosfáty <input type="checkbox"/> 187 Beta-hCG <input type="checkbox"/> 18 Železo plasmat. <input type="checkbox"/> 109 Myoglobin <input type="checkbox"/> 20 Feritin <input type="checkbox"/> 108 Troponin I <input type="checkbox"/> 21 Močovina <input type="checkbox"/> 104 CK-MB mass <input type="checkbox"/> 22 Kreatinin <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 23 Osmolalita <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 26 Bílkovina celková <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 27 Albumin <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 35 Kys. močová <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 50 Glykémie <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 81 Bilirubin celkový <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 82 Bilirubin přímý <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 83 ALT <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 84 AST <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 85 GMT <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 86 ALP <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 87 Cholinesteráza <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 88 Lipáza <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 89 AMS <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 98 AMS pankreatický izoenzym <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 101 CK <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 105 LDH <input type="checkbox"/>		Doba sběru (H:M) <input type="text"/> Množství (ml) <input type="text"/> Číslo porce <input type="text"/> <input type="checkbox"/> 25 U-osmolalita <input type="checkbox"/> 224 U-Bence-Jones <input type="checkbox"/> 227 U-bílkovina <input type="checkbox"/> 230 U-glukóza <input type="checkbox"/> 240 U-kreatinin <input type="checkbox"/> 245 U-sodík <input type="checkbox"/> 246 U-draslík <input type="checkbox"/> 247 U-chloridy <input type="checkbox"/> 248 U-vápník <input type="checkbox"/> 249 U-hořčík <input type="checkbox"/> 250 U-fosfor <input type="checkbox"/> 251 U-močovina <input type="checkbox"/> 252 U-kys.močová <input type="checkbox"/> 260 Creat. clearance <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 300 FW EDTA-KO-3ml <input type="checkbox"/> 318 Krevní obraz <input type="checkbox"/> 328 Diferenciál <input type="checkbox"/> 322 Retikulocyty <input type="checkbox"/> 75 Glyk. hemoglobin
		Plasma Citr.-Koag-4,5ml	<input type="checkbox"/> 339 PTT <input type="checkbox"/> 340 Quick <input type="checkbox"/> 338 Fibrinogen <input type="checkbox"/> 309 D-dimer <input type="checkbox"/> 341 Faktor V <input type="checkbox"/> 342 Faktor VII <input type="checkbox"/> 343 Trombinový čas <input type="checkbox"/> 344 Fibrinolýza <input type="checkbox"/> 350 AT III <input type="checkbox"/> 351 APC-R <input type="checkbox"/> 352 Protein C <input type="checkbox"/> 365 Protein S <input type="checkbox"/> 347 Ethanolový test
Sérum-5ml		Moč-Chem+Sed-10ml	Hemokult
<input type="checkbox"/> 28 ELFO bílkovin <input type="checkbox"/> 116 ELFO lipoprotein <input type="checkbox"/> 92 Izoenzymy ALP <input type="checkbox"/> 125 ApoA <input type="checkbox"/> 126 ApoB <input type="checkbox"/> 127 Lp(a)		<input type="checkbox"/> 200 Moč chem. orient <input type="checkbox"/> 283 Močový sediment mikroskopický <input type="checkbox"/> 90 U-AMS <input type="checkbox"/> 99 U-AMS pankreatický izoenzym <input type="checkbox"/> 182 U-těhot. test	<input type="checkbox"/> 181 Hemokult
			Pro tato vyšetření je nutný odběr vzorků přímo v naší laboratoři: - 91 Amoniak - 38 Laktát - 36 Kys. fosfatáza - 37 Prost. fosfatáza - 19 Vazebná kapacita železa - 345 Retrakce koagula - 346 Konzumpce protř. - 358 Osm. rezistence erytrocytů (ponděli – čtvrtek) - 348 Faktor VIII - Dysmotlie ery v močovém sedimentu
			Razítka a podpis lékaře

Zdroj: Vlastní obrázek

Příloha č. 2: Žádanka na imunologické vyšetření (Nemocnice na Homolce)

 <p style="text-align: center;">Žádanka na laboratorní vyšetření Imunologie Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie Nemocnice Na Homolce, Roentgenova 2, 150 30 Praha 5 Tel.: (+420)257 272 433 Fax.: (+420)257 272 426</p>				Adresa pacienta (kontakt):	
Titul		Jméno pacienta			
Příjmení pacienta					
Datum narození	Č. pojištěnce	Pojišťovna	Pohlaví <input type="checkbox"/> Muž <input type="checkbox"/> Žena	Výška (cm)	Váha (kg)
Kód lékaře	Oddělení	Odbornost	Diagnóza	Datum a čas odběru	
KREV srážlivá (sérum - červená zkumavka 7-10 ml)					
Humorální imunita <input type="checkbox"/> 1404 IgG <input type="checkbox"/> 1403 IgA <input type="checkbox"/> 1405 IgM <input type="checkbox"/> 1406 C3 <input type="checkbox"/> 1407 C4 <input type="checkbox"/> 1408 CIK <input type="checkbox"/> 1409 Podtřídy IgG1-4 <input type="checkbox"/> 1415 Transferin <input type="checkbox"/> 1416 Prealbumin <input type="checkbox"/> 1417 Alfa-1-antitrypsin <input type="checkbox"/> 1418 Orosomukoid <input type="checkbox"/> 1419 Ceruloplazmin <input type="checkbox"/> 1420 Haptoglobin <input type="checkbox"/> 1421 Alfa-2-makroglobulin <input type="checkbox"/> 1422 Imunofixace <input type="checkbox"/> 1423 volné kappa, lambda řetězce		Autoprotilátky <input type="checkbox"/> 1445 ANP <input type="checkbox"/> 1455 ENA screen <input type="checkbox"/> 1456 ENA typizace <input type="checkbox"/> 1466 dsDNA <input type="checkbox"/> 1467 Anti-nukleosomy <input type="checkbox"/> 1468 ANCA <input type="checkbox"/> 1477 Anti-GBM <input type="checkbox"/> 1483 Anti-mitochondriální protilátky (AMP) <input type="checkbox"/> 1485 Anti-hladký sval <input type="checkbox"/> 1486 Anti-příčně pruhovaný sval <input type="checkbox"/> 1484 Anti-parietální buňky (+ anti- intrinsic faktor) <input type="checkbox"/> 1478 Anti-hepatální panel (AMP-M2, LKM1, SLA) <input type="checkbox"/> 1490 Anti-endomysium <input type="checkbox"/> 1491 Anti-tkáňová transglutamináza (tTG)		<input type="checkbox"/> 1493 Anti-CNS <input type="checkbox"/> 1494 Anti-periferní nerv <input type="checkbox"/> 1495 Anti-gangliosidy <input type="checkbox"/> 1513 Anti-GAD <input type="checkbox"/> 1514 Anti-IA2 <input type="checkbox"/> 1517 ACLA <input type="checkbox"/> 1519 Anti-beta2-glykoprotein I <input type="checkbox"/> 1531 Anti-CCP Alergologie <input type="checkbox"/> 1700 IgE celkové <input type="checkbox"/> 1701 ECP <input type="checkbox"/> Specifické IgE – viz seznam na zadní straně	
Blok Buněčné imunity (pondělí-čtvrtek)					
KREV nesrážlivá (EDTA, fialová zkumavka 2ml)				KREV nesrážlivá (Li-Heparin, zelená zkumavka 2ml)	
<input type="checkbox"/> 1571 Imunodeficiency (CD3, CD4, CD8, CD19, NK, CD3/HLA-DR) <input type="checkbox"/> 1578 Autoimunita (CD3, CD4, CD8, CD19/CD5, CD8/HLA-DR) <input type="checkbox"/> 1644 Průkaz HLA-B27 <input type="checkbox"/> 1645 Protilátky proti trombocytům		Test aktivace bazofilů alergenem (FlowCAST): <input type="checkbox"/> 1657 včela <input type="checkbox"/> 1664 soja <input type="checkbox"/> 1658 vosa <input type="checkbox"/> 1665 arašíd <input type="checkbox"/> 1661 mléko <input type="checkbox"/> 1666 ořech vlašský <input type="checkbox"/> 1662 vejce <input type="checkbox"/> 1668 ořech lískový <input type="checkbox"/> 1663 mouka <input type="checkbox"/> 1669 treska		<input type="checkbox"/> 1641 fagocytóza	
<input type="checkbox"/> 1570 Kryoglobuliny – odběr krve (EDTA) do předehřáté zkumavky pouze v laboratoři NNH po telefonické dohodě na tel. 257 272 424, úterý			Razítko a podpis lékaře		
<input type="checkbox"/> 1900 Calprotectin ve stolici – odběrovou soupravu a návod k použití pacient obdrží v laboratoři					

4/2014

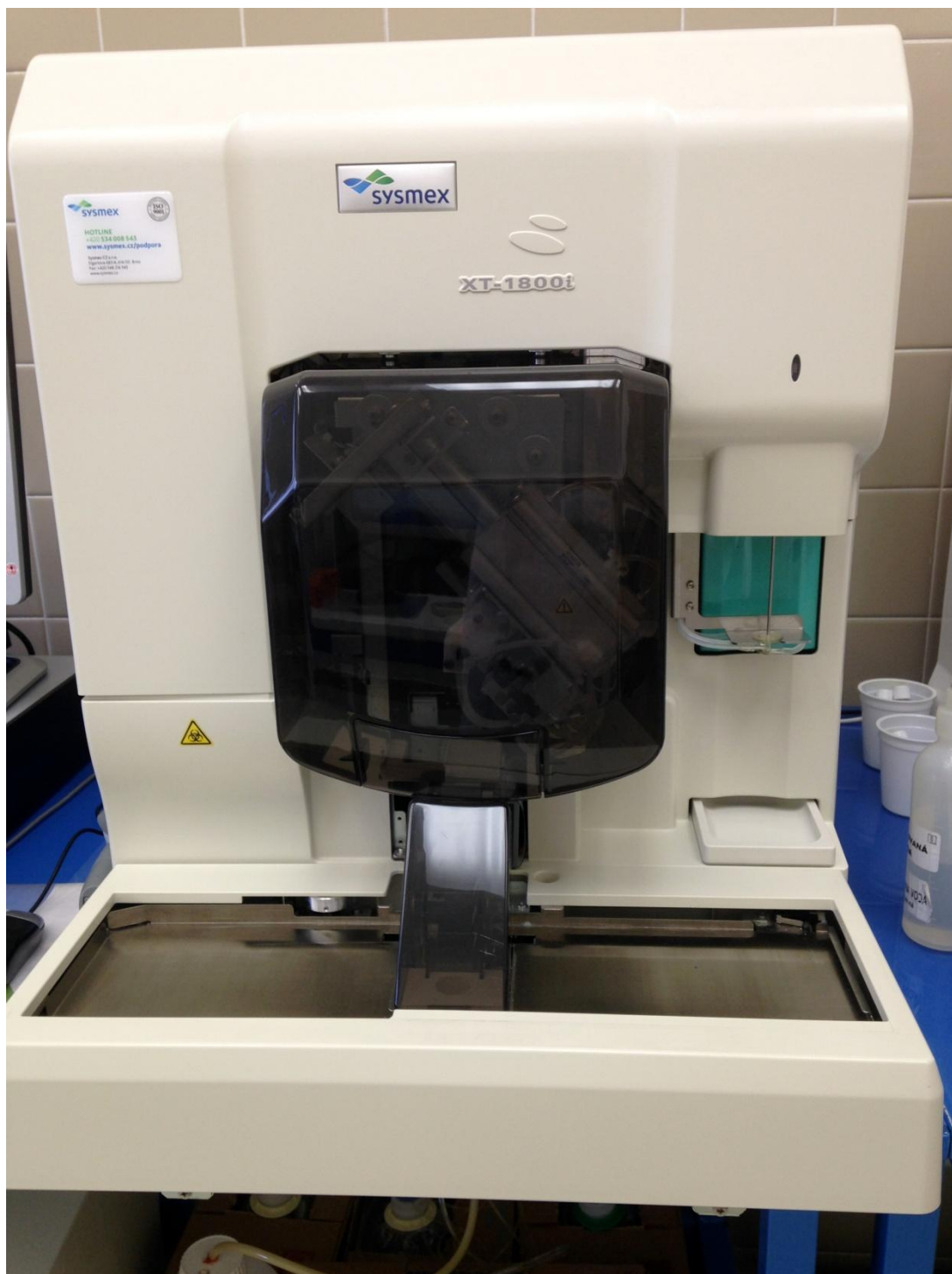
Zdroj: Vlastní obrázek

Příloha č. 3: Fotografie průtokového cytometru FACS Calibur a BD FACS Canto II



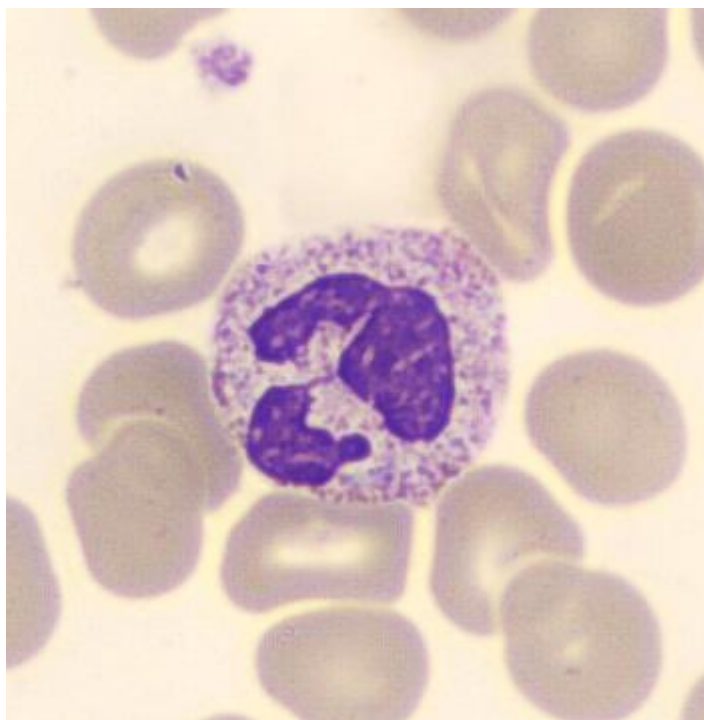
Zdroj: Vlastní fotografie

Příloha č. 3: Fotografie hematologického analyzátoru Sysmex XT-1800i

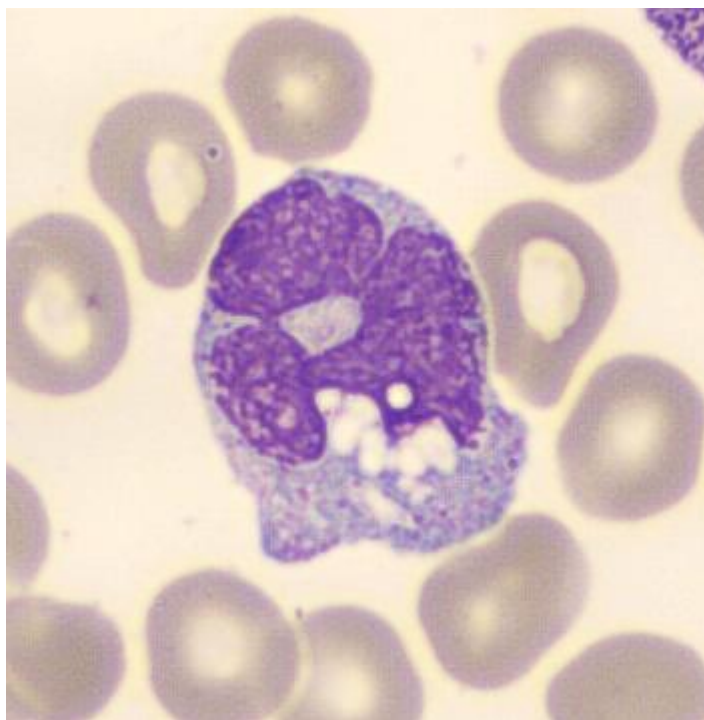


Zdroj: Vlastní fotografie

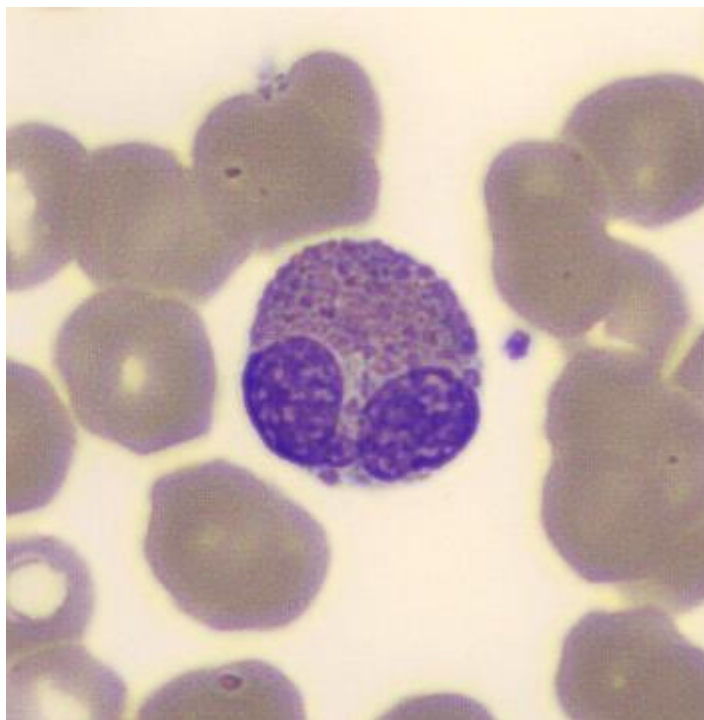
Příloha č. 3: Fotografie jednotlivých buněk z hematologického analyzátoru



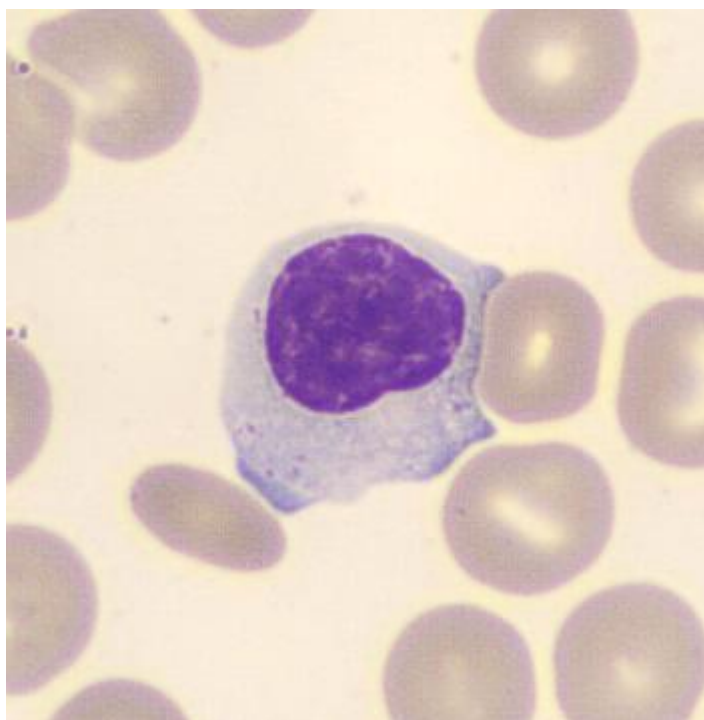
neutrofilní granulocyt



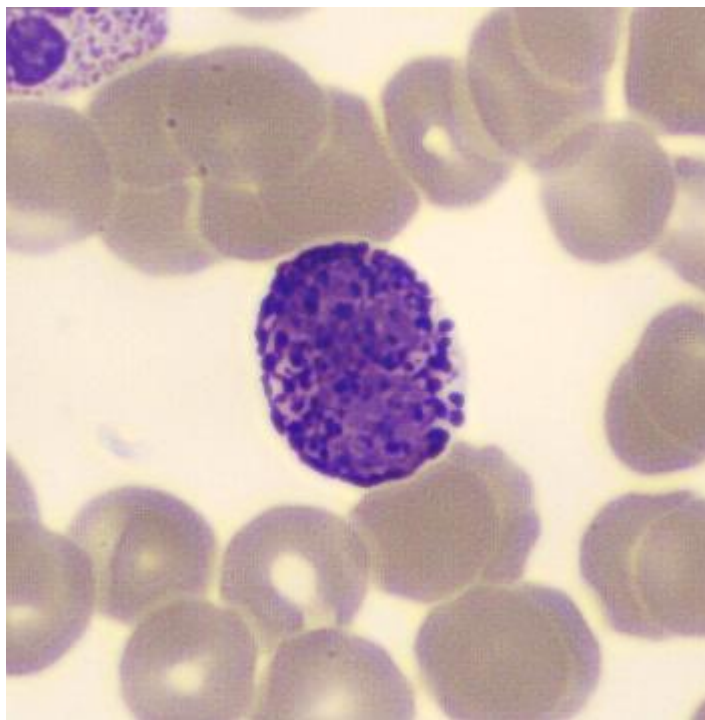
monocyt



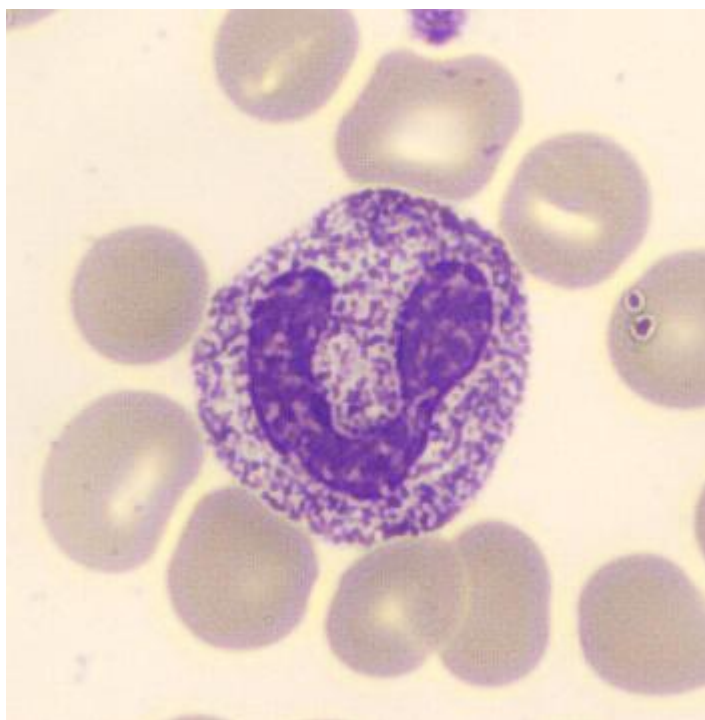
eozinofilní granulocyt



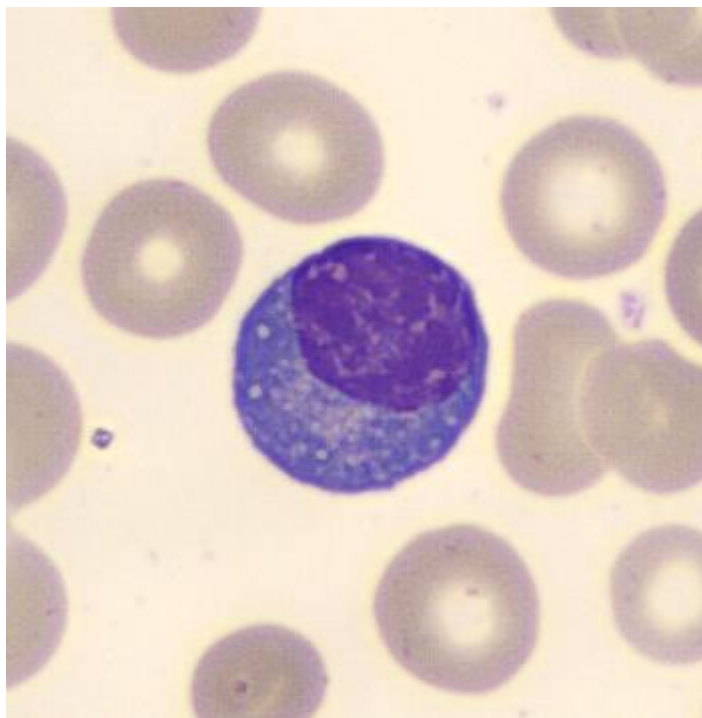
lymfocyt (reaktivní forma)



bazofilní granulocyt



tyč



plazmatická buňka

Zdroj: Vlastní fotografie