

**UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

Katedra biologických a biochemických věd

**POKROČILÉ MIKROSKOPICKÉ TECHNIKY DETEKCE
ERYTROCYTŮ A HODNOCENÍ ASYMPTOMATICKÉ
MIKROSKOPICKÉ HEMATURIE**

Autor práce: Hana Holoubková

Vedoucí práce: Ing. Dagmar Holubcová

2012

**UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**

Department of Biological and Biochemical Sciences

**ADVANCED MICROSCOPIC TECHNIQUES FOR THE
DETECTION OF RED BLOOD CELLS AND ASSESMENT OF
ASYMPTOMATIC HAEMATURIA**

Author: Hana Holoubková

Supervisor: Ing. Dagmar Holubcová

2012

PROHLÁŠENÍ

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Pardubice.

V Pardubicích dne 22. 6. 2012

.....
Hana Holoubková

SOUHRN

Pokročilé mikroskopické techniky detekce erytrocytů a hodnocení asymptomatické mikroskopické hematurie

Cílem bakalářské práce je detailněji specifikovat vybrané pokročilé techniky, užívané v oblasti světelné mikroskopie, se zaměřením na detekci erytrocytů, studium mikroskopické hematurie a následné převedení teoretických poznatků do laboratorní praxe.

V první části práce je uveden základní přehled principů a využití mikroskopických metod používaných v hematologii včetně základních informací o zkoumaných buňkách a proniknutí do problematiky mikroskopické hematurie. Druhá část je zaměřena na testy osmotické rezistence a závislost osmotického tlaku na červené krvinky. Zahrnuje analýzu vlastně zhotovených snímků za pomoci badatelského mikroskopu Nikon Eclipse 80i.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Mikroskopické metody

Mikroskop

Erytrocyty

Hematurie

Osmotická rezistence

Hemolýza

SUMMARY

Advanced microscopic techniques for the detection of red blood cells and assesment of asymptomatic haematuria

The objective of the thesis is detailed specification of selected developed technics that are used in the area of light microscopy . The main focus is on erythrocyte detection, mikroskopic hematuria that is followed by transmition of theoretical knowledge into laboratory practice.

The first part of the thesis provides an overview of the basic principles as well as utilisation of microscopic methods commonly used in hematology. It includes basic information about examined cells and further issues of microspic hematuria. The second part is focused on tests of osmotic resistance as well as dependence between osmotic pressure and red blood cells. It also covers analysis of author's self taken images with the research microscope Nikon Eclipse 80i.

KEYWORDS:

Microscopic methods

Microscope

Erythrocytes

Hematuria

Osmotic rezistance

Hemolysis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své vedoucí Ing. Dagmar Holubcové, která vedla moji bakalářskou práci. Mé díky jí patří za adekvátní přístup, cenné rady a hlavně za pomoc při výběru samotného tématu.

ZKRATKY

DIC	diferenciál interference contrast	diferenciální interferenční kontrast
NA	numerical aperture	numerická apertura
DS - 5M		snímací jednotka kamery
DS- L1		ovládací jednotka kamery
CFI	Chromatic aberration- Free Infinity	nekonečná optika
CCD	charge- coupled device	zařízení s vázanými prvky
RBC	red blood cells	erytrocyty
HA	hemolytic anemia	hemolytická anémie

OBSAH

ÚVOD.....	1
1 Pokročilé mikroskopické techniky v hematologii.....	2
1.1 Historie	2
1.2 Klasická světelná mikroskopie	2
1.2.1 Pozorování ve světlem poli	3
1.2.2 Metody využívající šikmé osvětlení.....	4
1.2.3 Metody s přímou detekci fázových posunů procházejícího světla.....	5
1.2.4 Popis mikroskopu	8
1.2.4.1 Nikon Eclipse 80i.....	11
1.3 Obecná charakteristika ery	16
1.3.1 Tvorba krve (hematopoéza)	16
1.3.2 Morfologie.....	16
1.3.3 Kvantitativní parametry červených krvinek.....	17
1.3.4 Osmotická rezistence ery	18
1.3.5 Membrána červených krvinek.....	20
1.3.6 Hemolýza-chování v roztocích.....	21
1.3.6.1 Anemie za zvýšené destrukce erytrocytů- hemolytická.....	21
1.4 Vyšetření hematurie v močovém sedimentu s využitím fázového kontrastu	23
1.4.1 Definice	23
1.4.2 Klasifikace.....	23
1.4.2.1 Popis hematurií	26
1.4.2.2 Vyšetření moči a močového sedimentu	27
2 Experimentální část zaměřená na testy osmotické rezistence a vyhodnocení tvarů a velikosti erytrocytů v závislosti na osmotickém tlaku	30
2.1 Provedení testu osmotické rezistence erytrocytů.....	30
2.2 Chování erytrocytů v roztocích	32
ZÁVĚR.....	40
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	41

ÚVOD

Člověk se snažil vymyslet způsob, jak zrakové vnímání zdokonalit. V tomto snažení mu pomohla optika a především konstrukce mikroskopu. V současné době se s mikroskopy setkávají už žáci základních škol. Nejdůležitějším a nejrozvinutějším smyslem člověka je zrak, kterým vnímáme až dvě třetiny vjemů okolo nás. Zdravý novorozenec zpočátku rozlišuje pouze světlo a tmu. Později se naučí rozeznávat barvy. Lidské oko je jedinečný orgán, ale k dokonalosti má daleko. Je známa široká škála mikroskopických metod, které jsou neustále vylepšovány a zdokonalovány. Uplatňují se v nejrůznějších oblastech vědy a techniky. Pokročilé mikroskopické techniky, nejen v hematologii nám umožňují nahlédnout do světa buněk. Vývoj se ubíral od čisté charakterizace fixovaných preparátů až k pozorování intracelulárních procesů v reálném čase. V experimentální části jsem se zabývala pořízením snímků za pomoci badatelského mikroskopu Nikon Eclipse 80i, který je vybaven softwarem LUCIA.

1 Pokročilé mikroskopické techniky v hematologii

Cílem této práce bylo představení problematiky pokročilé mikroskopické techniky. Předností těchto technik je využívání mikroskopovacích příslušenství, například pro fázový kontrast, pro pozorování v temném poli a pro Nomarského diferenciální interferenční kontrast. Jsou ideální pro výzkum i pro kontrolu v mnoha odvětvích, jako jsou hematologie, biologie, anatomie, histologie, bakteriologie, imunologie, farmakognózie, agronomie, chemie, mineralogie, geologie.

1.1 Historie

Již od 7. století je znám nejjednodušší mikroskop, spojná skleněná čočka, známá jako lupa. Zásluhy sestrojení prvního mikroskopu jsou přisuzovány Holanďanům. V 16. Století, otec a syn Janssenovi zkonstruovali první mikroskop. Nejznámějšími uživateli byli Robert Hook (1635-1703) a Anton van Leewenhoek(1632-1723). Hook popsal konstrukci mikroskopu s odděleným objektivem, okulárem a osvětlovacím zařízením ve svém díle *Micrographia*. Anton van Leewenhoek sestrojil v roce 1676 jednoduchý mikroskop a můžeme ho tak zaslouženě považovat za zakladatele mikroskopie. Výrobu prvních mikroskopů zahájila firma Carl Zeiss v roce 1847 v Jeně. Mikroskopické techniky dosáhly největšího rozmachu v minulém století. V roce 1932 byla F. Zernickem poprvé využita metoda fázového kontrastu a o několik let později George Nomarksi představil metodu diferenciálního interferenčního kontrastu. Za tento objev mu v roce 1955 byla udělena Nobelova cena. V poslední době se též využívá hojně digitálních mikroskopů, které umožňují rychlý a pohodlný přenos studovaných preparátů do počítačů. [1, 2]

1.2 Klasická světelná mikroskopie

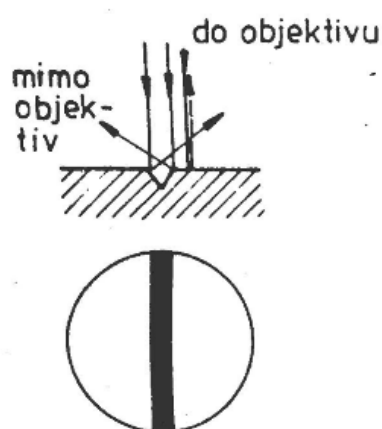
Světelná mikroskopie je založena na zákonech optiky, která pojednává o světle, jeho vlastnostech a chování. Optický mikroskop, je přístroj, který je navržen tak, aby byly viditelné i jemné detaily během pozorování drobných předmětů a to při velkém zvětšení. Pro dosažení tohoto zvětšení používá soustavu optických čoček. Pro dosažení vysoké rozlišovací schopnosti musí být zajištěn kontrast obrazu a dostatečné množství světla odražené od detailu obrazu, který chceme rozlišit. [3]

Podle způsobu pozorování můžou být mikroskopy rozděleny do dvou skupin. Episkopické osvětlení shora využijeme během pozorování předmětů v dopadajícím světle, které jsou vesměs neprůhledné. Diaskopické osvětlení naopak umožní sledovat průhledné objekty v procházejícím světle. [4]

1.2.1 Pozorování ve světlém poli

Pozorování ve světlém poli je základní mikroskopickou technikou a jedná se o nejjednodušší formu mikroskopie. Název této metody je odvozen ze skutečnosti, že tmavý vzorek kontrastuje s jasným zobrazením pole. Využívá kolmého osvětlení vzorků a odraženého světla. Světlo z kondenzoru prochází vzorkem a vstupuje do objektivu, pak okuláru a nakonec do očí uživatele. Objekty absorbují záření a tím zeslabují intenzitu procházejícího světla a stávají se viditelnými. Nepoužívají se zde zařízení, která by měnila vlastnosti světla (polarizátory a filtry) na rozdíl od studia barevných a přirozeně pigmentovaných vzorků. Zkoumat lze jak nativní preparáty (zejména při studiu pohybu nebo dělení mikroorganismu) tak i fixované preparáty. Pro vylepšení kontrastu se používá dobarvování (fuchsin, methylenová modř a jiné). Barviva ovlivňují amplitudu světla, které projde preparátem a umožní rozlišení. Na této metodě jsou závislé především vědy, jako jsou hematologie, mikrobiologie, parazitologie, patologie. V posledních letech se využívají digitální možnosti zobrazení. Nevýhodou pozorování ve světlém poli je především barvení biologických preparátů, kdy během procesu barvení dochází k usmrcení studovaných objektů. Preparáty je možno pozorovat suchou cestou a pod imerzí. [5, 6]

Obrázek č. 1: Pozorování ve světlém poli (kolmé osvětlení)



Zdroj: Základy světelné mikroskopie;

Dostupné na < <http://ime.fme.vutbr.cz/files/Studijni%20opory/bmsz/datastranek/zsm.htm>>

1.2.2 Metody využívající šikmé osvětlení

Tyto metody slouží ke zvýraznění těch objektů, které výrazně mění směr šíření jimi procházejícího světla.

- Šikmé osvětlení
- Pozorování ve tmavém poli

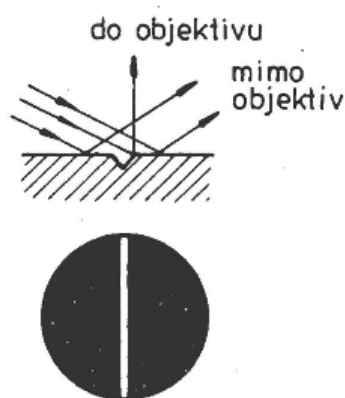
Šikmé osvětlení

Šikmého osvětlení používal ke zviditelnění neabsorbujících objektů již koncem 19. století Ernst Abbe, německý fyzik, věnující se problematice vzniku obrazu v optické mikroskopii. Kondenzor je asymetricky zacloněn nebo nastaven excentricky, aby část světelného kužele vycházejícího z kondenzoru procházela mimo objektiv. To vede ke snížení jasu zorného pole. Objekty, které ohybem, odrazem či rozptylem světla mění směr paprsků tohoto kužele, se jeví ve výsledném obraze jako tmavší nebo světlejší než pozadí. Objekt je velmi dobře viditelný a jeví se plasticky. [7, 8]

Pozorování ve tmavém poli

Během pozorování ve světlém poli je soustředěno světlo kondenzorem do roviny, tak aby dopadalo pod pravým úhlem. Během pozorování v zástinu je tomu jinak. Princip lze vysvětlit na příkladě viditelnosti hvězd za temné noci, navzdory jejich ohromné vzdálenosti od Země. Díky ostrému kontrastu mezi jejich světlem, které vyzařují a černým nebem. Během dne jsou neviditelné, protože převáží drtivý jas ze Slunce. Při úplném zatmění jsou hvězdy vidět i přes den. Zjednodušeně řešeno, viditelnost slabého světla hvězdy se enormně zvýší na tmavém pozadí. Úpravou mikroskopu, kdy upravíme kondenzor tak, že z obrazu se vyloučí světlo, které by dopadalo za normálních podmínek přímo do objektivu. Na trhu jsou speciální kondenzory (paraboloidní nebo kardioidní). Obraz se v mikroskopu jeví jako tmavý pokud není přítomen žádný objekt, který by světlo rozptyloval. Pokud j objekt přítomen, jeví se oku pozorovatele jako zářivě svítící struktura na černém pozadí.

Obrázek č. 2: Pozorování ve tmavém poli (šikmé osvětlení)



Zdroj: Základy světelné mikroskopie;

Dostupné na: <<http://ime.fme.vutbr.cz/files/Studijni%20opory/bmsz/datastranek/zsm.htm>>

- Temné pole v procházejícím světle. Tato kontrastní metoda je zvláště používána pro zviditelnění rozptýlených objektů jako jsou malé živé vodních mikroorganismy. Ty mají index lomu od 1,2 do 1,4, což vede k zanedbatelně optickému rozdílu od okolního vodního prostředí. Mikroskop musí být vybavený kondenzorem. Aby nám žádné přímé světlo nevstoupilo do objektivu, numerická apertura (NA) kondenzoru musí být asi o 15 % vyšší než NA objektivu. Pro studium většiny objektů se pozorování v temném poli nehodí, neboť jsou při něm zdůrazněny kontury a malé strukturní detaily. [9]
- Temné pole v odraženém světle umožňuje zviditelnit i nepatrné trhliny a změny ve výšce vzorku díky kruhovému šikmému osvětlení. Výsledný obraz tvoří rozptýlené světlo ze vzorku přenášející se do objektivu. [10]

1.2.3 Metody s přímou detekcí fázových posunů procházejícího světla

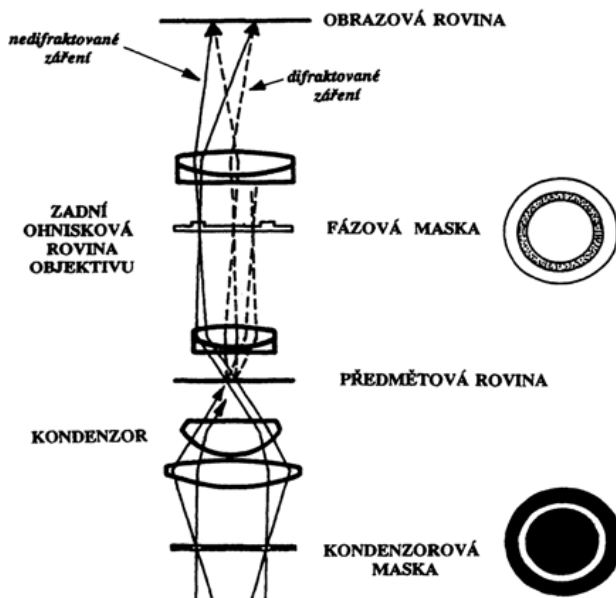
- Fázová kontrast
- Diferenciální fázový kontrast DIC

Metoda fázového kontrastu

Jedná se o metodu zvyšující kontrastní zobrazení ve světelném mikroskopu. Tato technika umožňuje kontrast obrazu živé buňky a jejich struktur. Rozlišovací schopnost fázového kontrastního mikroskopu se blíží 0,1 μm . Buňky jsou zachyceny ve svém

přirozeném stavu bez nutnosti fixace a barvení. Do přední ohniskové roviny kondenzoru je přidána clona se šterbinou ve tvaru mezikruží, kterou proniká světlo do objektu. Prochází-li světlo vzorkem, jsou paprsky odchylovány z původního směru. V obrazové ohniskové rovině objektivu se nachází fázová destička, tvaru mezikruží, posunující fázi o $+p/2$ nebo $-p/2$, tj. čtvrtinu vlnové délky, díky napařené polopropustné vrstvě kovu. Tato destička propouští paprsky, které nezměnily svůj směr na fázových objektech. Ostatní paprsky se na daném objektu ohýbají, lámou a procházejí bez změny fáze. Lidské oko nezaznamená posun fáze, ale pouze rozdíly v intenzitě světla. Obraz se vytváří interferencí fázově posunutých a neposunutých paprsků. Fázové objekty se jeví, jako tmavé nebo světlé vůči svému okolí (pozitivní nebo negativní kontrast). Volíme objektivy podle velikosti fázového prstence s označením jako Ph1, Ph2, Ph3 nebo PhC, PhL, PhP. Mnohé bezbarvé biologické objekty, obtížně pozorovatelné v běžném mikroskopu se řadí mezi fázové objekty. Barviva objekty zviditelní, ale často jsou pro buňky jedovatá. Mikroskopy s fázovým kontrastem umožňují pozorovat objekty bez barvení. Nevýhodou je halo efekt. Vytváří se na rozhraní mezi objektem a okolím, a tím jsou ztraceny skutečné hranice objektů. Efekt je způsoben lomem světla na strukturách s velkým indexem lomu. [7, 11, 12,]

Obrázek č. 3: Schéma optické soustavy mikroskopu pro fázový kontrast

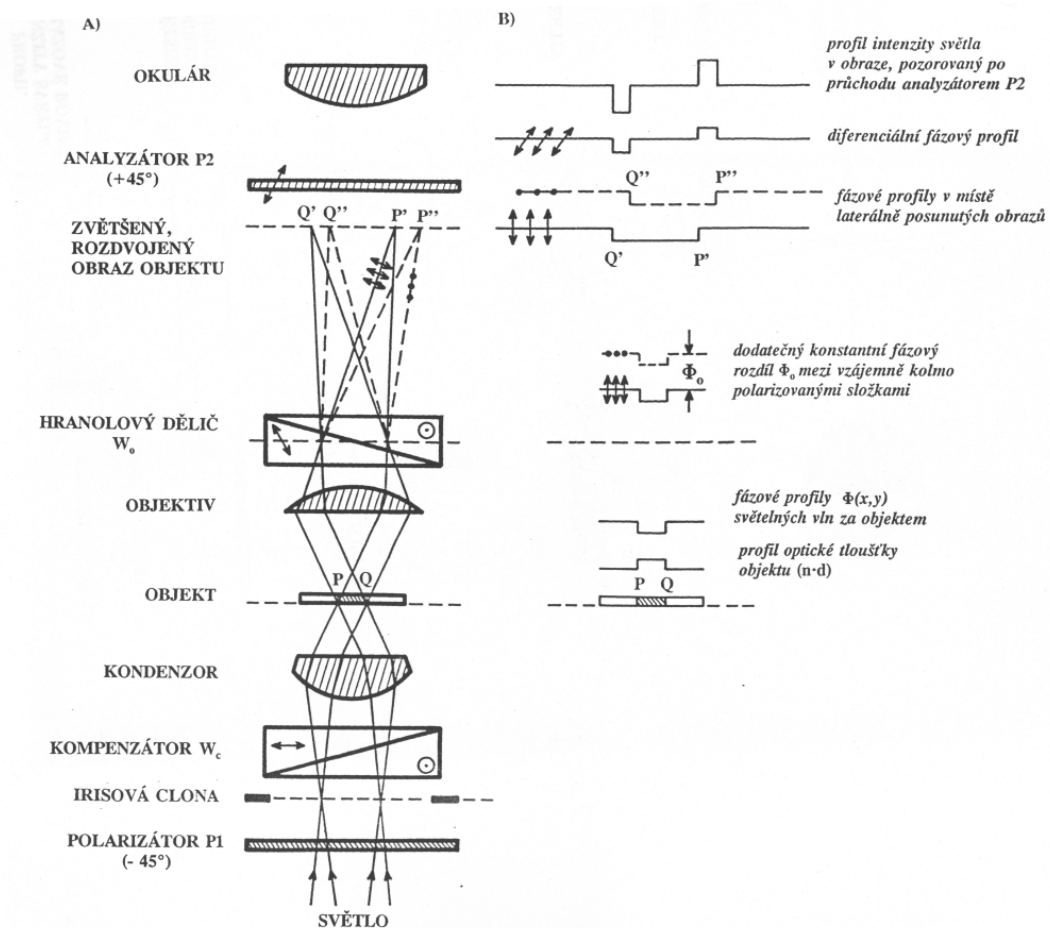


Zdroj: PLÁŠEK, J.: Nové metody optické mikroskopie, [online]. Dostupné na: http://dml.cz/bitstream/handle/10338.dmlcz/139719/PokrokyMFA_41-1996-1_1.pdf,s.12

Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC)

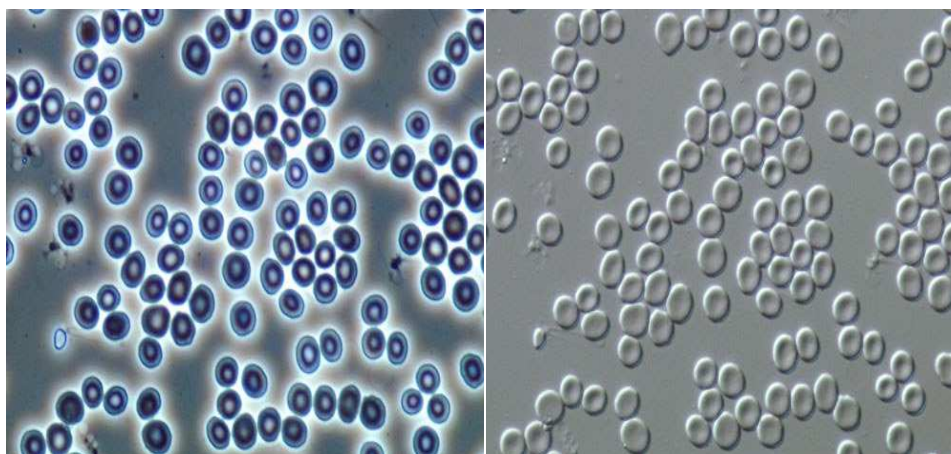
DIC využívá polarizované světlo. V optickém mikroskopu jsou vloženy dva Wollastonovy hranoly a pár zkřížených polarizátorů. Metoda dostala název po svém objeviteli, který záměrně upravil hranol a umístil jej do objektivu, jmenoval se George Nomarski. Díky společnému spojení polarizátoru, analyzátoru a dvou dvojlomných děličů mohou být objekty krásně viditelné. Výškové rozdíly na povrchu studovaného objektu se zvýrazní a zdají se nám jako třírozměrné. Metoda je výhodná pro zviditelnění nepatrných reliéfních stupňů a nerovností. Nevýhodou je, že objekty nemůžeme za žádnou cenu změřit. Hodnoty jsou nereálné. [13]

Obrázek č. 4: Schéma optické soustavy mikroskopu pro Nomarského diferenciální interferenční kontrast



Zdroj: PLÁŠEK, J.: Nové metody optické mikroskopie, [online]. Dostupné na <http://dml.cz/bitstream/handle/10338.dmlcz/139719/PokrokyMFA_41-1996-1_1.pdf>, s. 13>

Obrázek č. 5: Vlevo erythrocyty-fázový kontrast, vpravo DIC,(zvětšení 60x15)



Zdroj: MICROSKOPY RESOURCE CENTRE;

Dostupné na <<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/dic/dicoverview.html>>

1.2.4 Popis mikroskopu

Moderní mikroskopy, s kterými se můžeme setkat v hematologické laboratoři jsou vybaveny světelným a kondenzorovým systémem, objektivem, okulárem, clonou a Nikolovými hranoly. Elektronový mikroskop se od světelného mikroskopu odlišuje rozlišovací schopností, která je až 1000x větší tj. až 0,2 nm. [14]

Popis mikroskopu

Mikroskop je přístroj, který slouží k vizuálnímu zvětšení předmětů, které jsou příliš malé a nejsou viditelné pouhým okem. Úkoly optického mikroskopu můžeme shrnout do třech bodů:

- Vytvořit zvětšený obraz vzorku
- Oddělit detaily v obraze
- Vykreslit detaily pro lidské oko nebo fotoaparát

Základní prvky mikroskopu:

- Zdroje světla – žárovka
- Posuvný reostat, který reguluje světelný tok vycházející ze žárovky.

- Proud paprsků je soustředěn za pomoci kondenzoru. Pomáhá při změně kontrastu obrazu. Neúčastní se přímo tvorby obrazu. Vliv na vlastnosti (jas, ostrost, kontrast).
- Množství paprsků je ovlivněno clonou.
- Stolek, na nějž upevňujeme řez, umístěný na podložním sklíčku do speciální svorky.
- Objektivy jsou optické členy, které zvětšují obraz řezu a promítají ho směrem k okuláru. Mají různé hodnoty zvětšení.
- Okulár, který obraz ještě více zvětšuje a jímž obraz pozorujeme. Může být vybaven i motivem jako je kříž na stupnici, ukazovací jehla, síťka.
- Zaostření mikroskopu provádíme mikrometrickým šroubem, který se nachází z obou stran a posunuje polohu stolku.
- Polohu sklíčka upravujeme posuvnými šrouby, které sklíčkem upnutým ve svorce pohybují předozadně a pravolevě
- Běžná rozlišovací schopnost u světelného mikroskopu je 0,5 - 0,2 um. Nezbytnou podmínkou je, aby členy včetně osvětlovacího zařízení ležely v optické ose mikroskopu. [12, 15, 16]

Podstata vzniku obrazu v optickém mikroskopu:

Jako první tuto teorii v roce 1873 definoval Ernstem Abbe. Abbe tuto teorii popisuje, cituji: „*Teorie je složitá, ale opírá se o Hungensův princip. Huygensův princip je geometrickou metodou pro zjištění tvaru vlnoplochy v libovolném okamžiku ze známého tvaru vlnoplochy v některém z předcházejícím okamžiku. Princip říká, že každý bod vlnoplochy můžeme považovat za zdroj sekundárního vlnění, které se šíří všemi směry od jednotlivých bodů rychlostí rovnající se rychlosti šíření vlny.*“ [17 s. 45] Zaostřená rovina preparátu je takovým objektem.

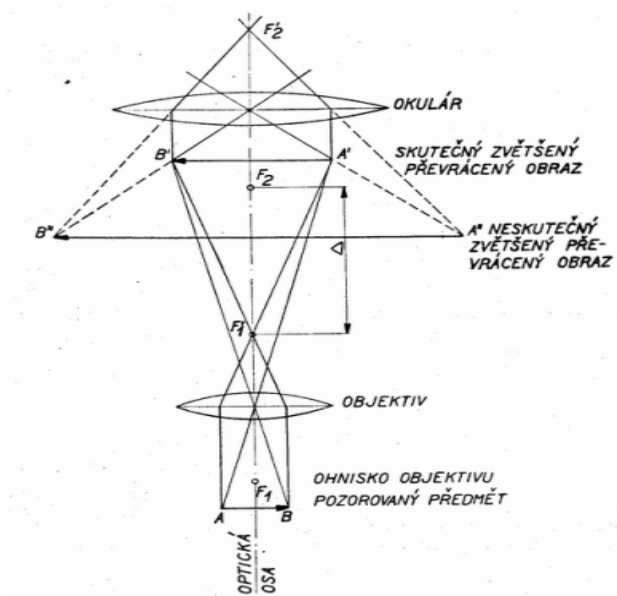
Schéma průchodu světelných paprsků:

- Objektiv vytvoří skutečný, převrácený a zvětšený obraz.
- Okulár vytvoří přímý, zvětšený a zdánlivý obraz.

Optický mikroskop dosahuje zvětšení max. 2000 krát, další zvětšení není možné

z důvodu vlnové povahy světla, která omezuje rozlišovací schopnost mikroskopu. [12]

Obrázek č. 6: Schéma průchodu světelných paprsků při pozorování pomocí světelného mikroskopu



Zdroj: Světelná mikroskopie;

Dostupné na <<http://ime.fme.vutbr.cz/files/Studijni%20opory/sm/Optika%20a%20typy%20kap3.html>>

Kvalita zobrazení buněk závisí na:

- dostatečném zvětšení obrazu
- kontrastu obrazu
- rozlišovací schopnosti mikroskopu- primárně závisí na NA a na kondenzoru, kvalita osvětlení preparátu na nastavení Köhlerova osvětlení

Numerická apertura - je dána součinem indexu lomu prostředí (n), v němž je pozorovaný objekt a sinu úhlu mezi osou objektivu a krajním paprskem, který vstupuje z pozorovaného bodu do frontální čočky objektivu ($d = \lambda/NA$ a $NA = n \cdot \sin \alpha$).

Objektiv mikroskopu s malou ohniskovou vzdáleností vytváří 10 až 100 násobný zvětšený převrácený skutečný obraz, který sledujeme okulárem. [12]

Základní termíny v oboru mikroskopie:

Zorné pole - oblast vzorku, kterou je vidět mikroskopem s daným objektivem.

Zvětšení - součin zvětšovací schopnosti objektivu a čoček okuláru.

Rozlišení - dva předměty jsou tak blízko u sebe, že již nejsou nadále detekovány jako samostatné objekty (zpravidla v nm).

Pracovní vzdálenost je vzdálenost mezi tělem mikroskopu a stolcem mikroskopu.

Studené světlo - souhrnné označení pro osvětlení, která na výstupu produkují pouze světlo, nikoliv teplo.

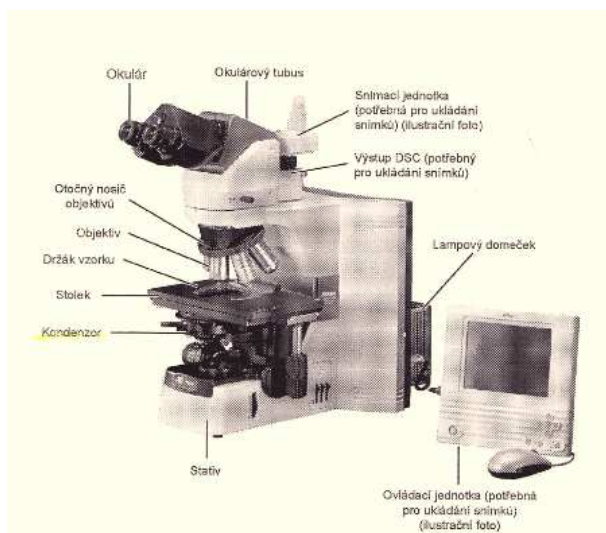
Okulár a přídavný objektiv – jejich zvětšením se ovlivňuje celkové zvětšení mikroskopu

a pracovní vzdálenost. U přídavného objektivu platí, čím menší zvětšení, tím větší pracovní vzdálenost. Zvětšení okuláru podstatně ovlivňuje zvětšení celé sestavy mikroskopu. [12, 18]

1.2.4.1 Nikon Eclipse 80i

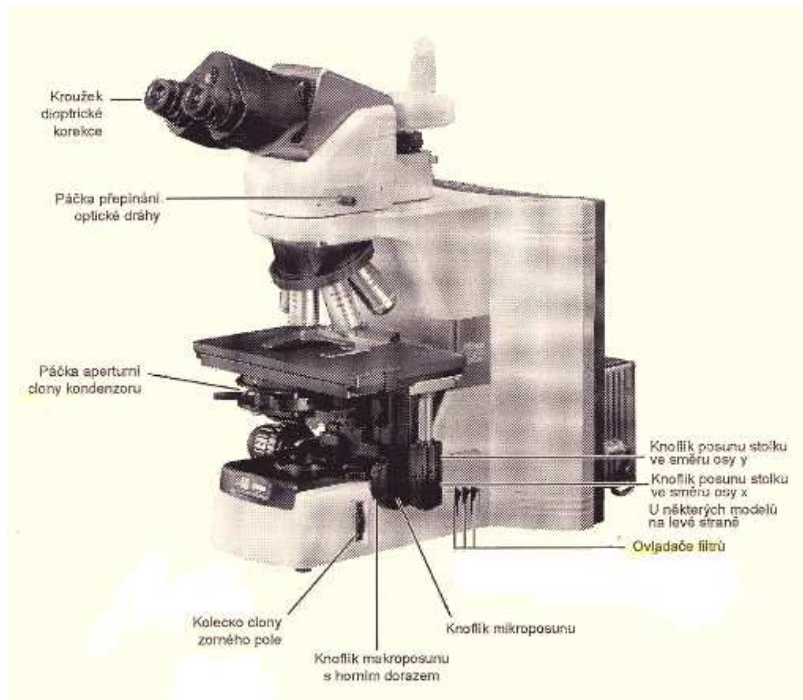
Tento univerzální mikroskop je určen k mikroskopickému pozorování živých buněk s diaskopickým a episkopickým osvětlením. Funkcemi nabitý model 80i je ideální pro digitální zobrazování v každém laboratoři nebo výzkumu v oborech jako je patologie, hematologie a cytologie .

Obrázek č. 7: Sestava pro mikroskopování ve světlém poli- názvy hlavních součástí



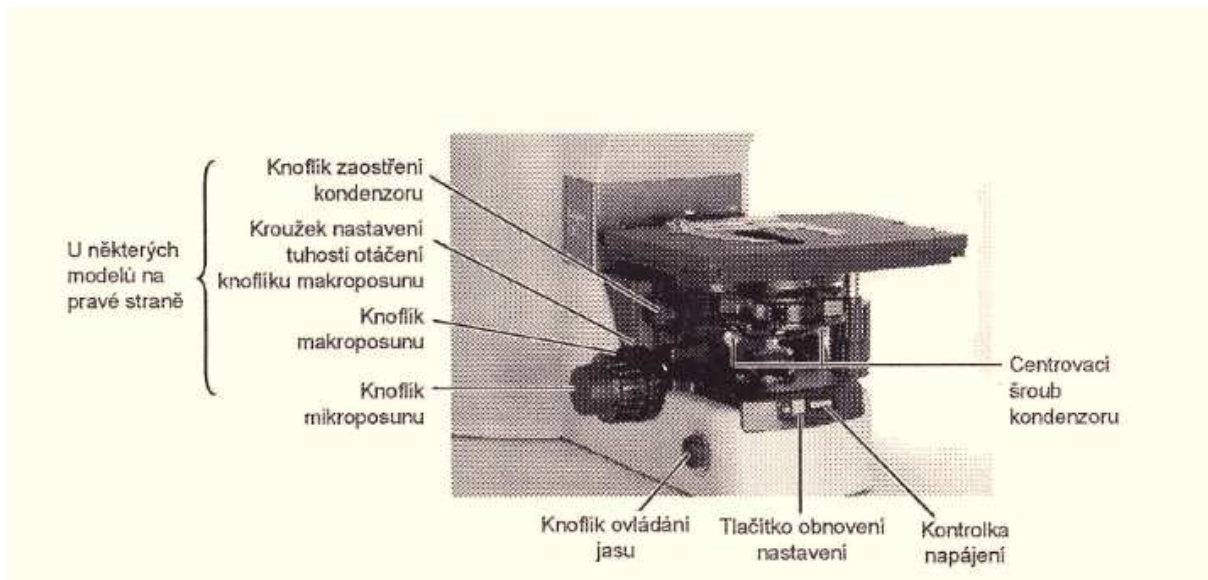
Zdroj: Mikroskop Nikon Eclipse 80i- Návod k použití 1.díl- Základní informace [dokument University Pardubice, KBBV] s. 14

Obrázek č. 8: Sestava pro mikroskopování ve světlém poli- pohled zprava



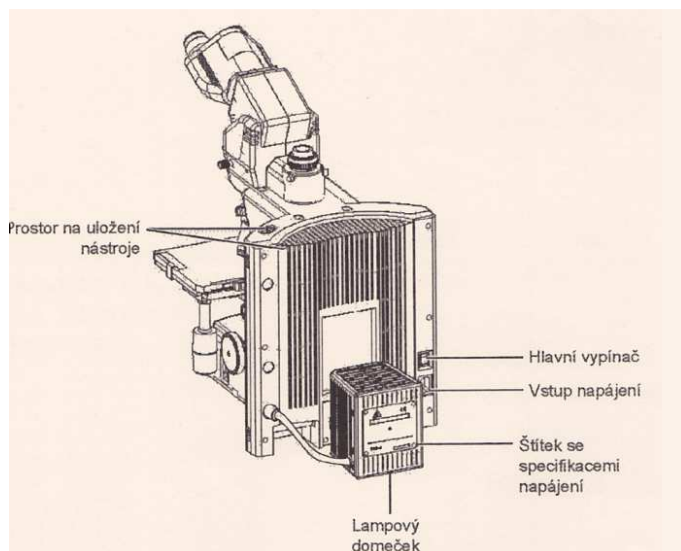
Zdroj: Mikroskop Nikon Eclipse 80i- Návod k použití 1.díl- Základní informace [dokument University Pardubice, KBBV] s. 15

Obrázek č. 9: Sestava pro mikroskopování ve světlém poli- pohled zleva



Zdroj: Mikroskop Nikon Eclipse 80i- Návod k použití 1.díl- Základní informace [dokument University Pardubice, KBBV] s. 16

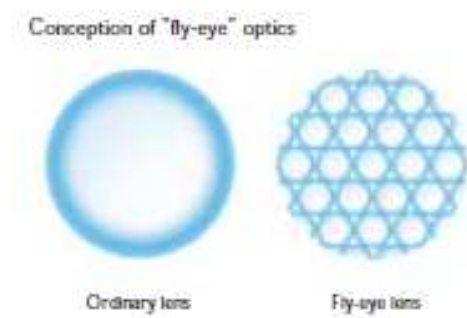
Obrázek č. 10: Sestava pro mikroskopování ve světlém poli- pohled zezadu



Zdroj: Mikroskop Nikon Eclipse 80i- Návod k použití 1.díl- Základní informace [dokument University Pardubice, KBBV] str. 16

- Důležitými součástmi mikroskopu jsou **snímací jednotka DS-5M** a **ovládací jednotka kamery DS-L1** vyvinuté pro digitální zpracování mikroskopických údajů o obrazu, které jsou automaticky detekovány a mohou být uloženy jako textový soubor společně s obrázkem. Tím se eliminuje potřeba vkládat data ručně. Je-li digitální fotoaparát Nikon DS-5M-L1 namontován na "hlavu" pořizující digitální snímky, pak jsou zobrazovací port, zoom a fluorescence, výběr filtru automaticky odhaleny a umožnění vytvoření velké databáze snímků pořízených v různém nastavení. [14]
- Do systému osvětlení byla u posledních typů mikroskopů NIKON ECLIPSE 80i zařazena optika "**muší oko**" zajišťující rovnoměrné osvětlení. Vzhled připomíná oko hmyzu. Světlo projde soustavou čoček tak, že se obrazy světelného pole promítnou mnohokrát přes sebe a nedojde k poklesu intenzity osvětlení k okraji obrazu.

Obrázek č. 11: Optika "muší oko" s porovnáním obyčejné čočky



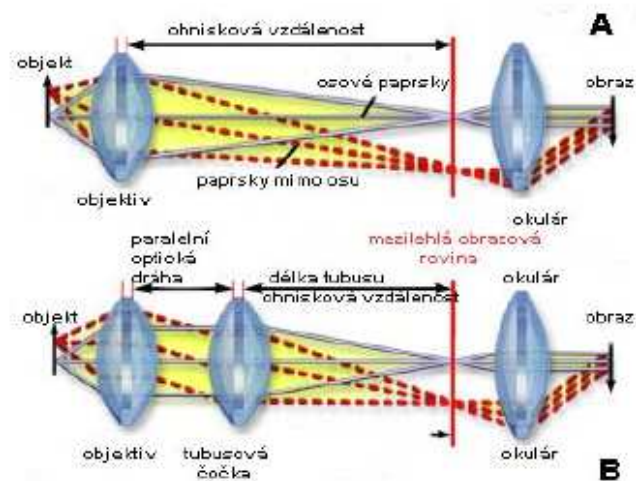
Zdroj: Mikroskop Nikon ECLIPSE 80i;

Dostupné na: <http://www.techinst.com/pub_docs/brochures/bio/80i_brochure.pdf>

- **Objektivy** uvedené pod názvem Plan Apo VC, zajišťují ostrý obraz ve vysokém rozlišení přímo na okraji zorného pole. Snaží se o vyrovnání zklenutí obrazu do roviny.
- **Okuláry** určené pro snímání obrazu z mikroskopu kamerou jsou konstruovány na dokonalé potlačení zklenutí obrazu (promítání obrazu do roviny čidla). Takovým okulárům se říká projektivy.
- Ergonomický **okulárový tubus** a designová platforma zajišťuje pohodlné ovládání pro všechny uživatele.
- Masivní **konstrukce** zajišťuje velmi přesné a stabilní zaostření.
- **Provozní platforma** je ergonomická a lze s ní snadno manipulovat, včetně polohovatelné rukojeti a vyklápěcího teleskopického ergonomického okulárového tubusu, jehož délka a sklon mohou být upraveny tak, aby vyhovovaly každému subjektu.
- Nikon výrazně zvýšil stabilitu v porovnání s předchozími modely Eclipse. Zvýšená **stabilita** minimalizuje možnost nechtěné rozostření obrazu nebo posuny, které mohou nastat při pozorování s velkým zvětšením.
- Mikroskopy byly dříve konstruovány tak, že jejich mechanická délka tubusu byla 160 mm. Bylo nutností s každým optickým členem vkládat do tubusu další čočky, aby se optická délka tubusu přizpůsobila prodloužení jeho mechanické délky. To přinášelo zhoršení kvality výsledného obrazu. Změna nastala po zavedení „nekonečné optiky“ (**CFI**). Je jedním z parametrů mikroskopických objektivů. Je to vzdálenost v milimetrech od plochy, kterou dosedá objektiv do

revolverového nosiče k povrchu preparátu, případně krycího skla. U objektivů řady CFI 60 činí parfokální vzdálenost 60mm, což vede k delší pracovní vzdálenosti a vysoké N.A., zatímco produkuje ostrý a jasný obraz s vysokým kontrastem a minimálním rozmazáním. Má-li vzniknout obrázek detailu předmětu, ležícího mimo optickou osu, poskytuje „nekonečná optika“ výhodu. Paprsky svírají s optickou osou menší úhel, než v mikroskopu s konečnou optikou. Ztráty jasu obrazu budou omezeny. Výhodné hlavně u fázovém kontrastu a při použití diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC).

Obrázek č. 12: Chod paprsků v mikroskopu s konečnou optikou (A) a v mikroskopu s nekonečnou optikou (B)



(paralelní optická dráha mezi objektivem a tubusovou čočkou dovoluje prodloužení mechanické délky tubusu)

Zdroj: NIKON (*Základní metody světelné mikroskopie*);

Dostupné na <<http://ime.fme.vutbr.cz/files/Studijni%20opory/sm/Optika%20a%20typy%20kap3.html>>

- Pomocí **softwaru LUCIA ToolScan** umožňující 3D vizualizaci nasnímaných objektů. Ideálně se hodí v rámci výzkumu, kde je třeba aplikovat zobrazení nejen biologických objektů ale i pořizovat fotodokumentaci. [18]
- Mechanismus optického zoomu 0,8 x 2,0 x na zadním portu umožňuje focení při jakémkoliv zvětšení. Na rozdíl od digitálního zoomu, optický zoom vytváří hedvábně hladký obraz, maximalizuje celkový počet pixelů na CCD. [14]

1.3 Obecná charakteristika ery

Erytrocyty řadíme společně s leukocyty a trombocyty mezi formované krevní elementy. První zmínky o formě jednoduchých krvinek se objevují již u některých bezobratlých živočichů. U obratlovců jsou již plně vyvinuty. U většiny živočichů tohoto podkmene nenacházíme jaderné erytrocyty. U savců je jádro z buňky vypuzeno před vstupem do oběhu. V dospělosti erytrocyty vznikají v krvetvorných orgánech jako je kostní dřeň. Odumírají ve slezině, kde jsou postupně pohlcovány specializovanými buňkami. Jádro se vyskytuje pouze během vývoje. Bez jádra a mitochondrií nedokážou syntetizovat nové enzymy. [19,20,22]

1.3.1 Tvorba krve (hematopoéza)

Délka jednotlivých krevních elementů se liší. Doba existence červené krvinky u člověka se pohybuje řádově okolo 110-120 dní. Místo vzniku se u červených krvinek během vývoje mění. Zahájení krvetvorby u člověka nastává již prenatálně ve žloutkovém váčku (2-3. týden). Od šestého do dvanáctého týdne je tvorba přesunuta do jater a sleziny. Toto období se nazývá hepatolienální. Ve 20. týdnu se konečnou stává kostní dřeň, kde probíhá po zbytek života. Poté se krvetvorba omezuje na kostní dřeň, hrudní kost, obratle a dlouhé kosti (pažní a stehenní). Aktivita kostní dřene v ostatních kostech ustává, až ustane úplně. Vyšší výskyt adipocytů dává dřeni novou formu, je vyplněna tukem a má podle toho i typickou žlutou barvu. [19, 20, 23, 26]

1.3.2 Morfologie

Červená krvinka je typická svým bikonkávním (dvojdutým) tvarem, který jí dokonale pomáhá plnit transportní funkci při výměně plynů, kyslíku (z plic ke tkáním) a oxidu uhličitého (od tkání do plic) a umožňuje tedy flexibilní průchod kapilárami. Jedinečným tvarem připomínající cukrářský piškot, je docíleno maximálního povrchu při zachování stejného objemu. Díky tomuto uzpůsobení se erytrocytární povrch, oproti kouli stejného poměru, zvětší asi o 30%. Průměr disku se v suchém nátěru pohybuje okolo střední hodnoty $7,4 (\pm 0,5 \mu\text{m})$. Takovým krvinkám říkáme normocyty. V krvi se mohou vyskytovat i menší a větší (mikrocyty a makrocyty). Tloušťka činí $2,5 \mu\text{m}$, uprostřed $0,8 \mu\text{m}^2$. Povrch červené krvinky je $130-140 \mu\text{m}^2$. Objem zaujímá $85 (\pm 10 \text{fl})$. [19, 20, 22, 26]

Dospělé červené krvinky se řadí mezi bezorganelové buňky. Postupným stárnutím ztrácejí elasticitu. Vnitřek buňky je vyplněn cytoplazmou, kde je rozptýlen

hemoglobin. Jedná se o dýchací barvivo, díky němuž má erytrocyt zelenožlutou barvu, kterou ve větší vrstvě vnímáme jako červenou. [23]

Tabulka č. 1: Charakteristika lidských červených krvinek

		Muži	Ženy
Hematokrit (Hct) (%)		47	42
Červené krvinky (RBC) (10 ⁶ /μl)		5,4	4,8
Hemoglobin (Hb) (g/l)		16	14
Průměrný objem erytrocytu (fl)	$= \frac{\text{Hct} \cdot 10}{\text{RBC (106/}\mu\text{l)}}$	87	87
Průměrný obsah Hb v erytrocytu (pg)	$= \frac{\text{Hb} \cdot 10}{\text{RBC (106/}\mu\text{l)}}$	29	29
Průměrná koncentrace Hb v erytrocytu (g/l)	$= \frac{\text{Hb} \cdot 100}{\text{Hct}}$	34	34
Střední průměr erytrocytu (μm)	= Průměr z 500 buněk v nátěru	7,5	7,5

Buňky o objemu > 95 fl (femtolitrů) jsou makrocyty, o objemu < 80 fl jsou mikrocyty, buňky s obsahem hemoglobinu < 25 pg jsou hypochromií

Zdroj: Vlastní zpracování s odkazem na GANONG, W.F.: Přehled lékařské fyziologie, s.536

1.3.3 Kvantitativní parametry červených krvinek

RBC (Red Blood Cells) vyjadřuje celkový počet krvinek v jednom litru. U novorozence se hodnoty pohybují ve vyšších číslech až 7 miliónů v 1 mm³. Tento fakt je zapříčiněn tím, že arteriální krev plodu se sytí kyslíkem v placentě při nižším parciálním tlaku. Počet se postupně snižuje až do 3. měsíce, kde začnou opět znovu rapidně stoupat až do dospělosti, kde se RBC postupně ustálí, ale je ovlivněn ohlavními hormony (testosteronem a estrogenem) na erythropoetin. To zapříčiňuje, že muži mívají vyšší fyziologické rozmezí. Vezmeme-li v úvahu, že se u mužů se pohybuje počet ery mezi 4,3 - 5,7 · 10¹²/ l. Při objemu krve 5 litrů lze odhadnout na 25 x 10¹², tj. 25 biliónů.

U žen $3,8-4,9 \cdot 10^{12}/l$. Fyziologicky zvýšené hodnoty se kromě novorozenců objevují i u lidí žijících delší dobu ve vyšších nadmořských výškách, kde je impulsem pro tvorbu pokles parciálního tlaku kyslíku v arteriální krvi. Patologickým jevem je překročení fyziologického rozmezí u mužů nad $5,7 \cdot 10^{12}/l$ a žen $4,9 \cdot 10^{12}/l$. Může být důsledek konstatování hypoerytrocytózy, polycytémii vera či sekundární polyglobulinémie (u vrozených srdečních vad, nádorů, plicních onemocněních). Úbytek červených krvinek nebo-li hypoerytrocytóza, se vyskytují nejčastěji u velkého množství vrozených anemií (aplastické či hemolytické), ale i u získaných, která často doprovázejí některá onemocnění. [22, 23, 24]

1.3.4 Osmotická rezistence ery

Zachování správné funkce krvinek závisí na nepřetržitém udržování bikonkávního tvaru i při průchodu nejtenčím kapilárním systémem a slezinnými sinusy, kde jsou nuceny zmenšit se až na $1,5\mu m$ původní velikosti. Tato mechanická vlastnost je dána submembránovým propojením proteinů. Membránový skelet zajišťuje fluiditu, pružnost a snadnou neformovatelnost buňky. Rozhodující úlohu zde sehrává cytoplazmatická membrána, hlavně bílkoviny tvořící polovinu váhy membrány. Spektrin je jeden z hlavních proteinů cytoskeletu erytrocytu, složený ze dvou řetězců.

V cytoskeletu se vyskytuje jako tetramér $\alpha_2\beta_2$ a je propojen s kapnoforinem (proteinem vyměňujícím aniony, proužek č.3) prostřednictvím ankyrinu a přes band-4.1 protein je vázán na transmembránový integrální glykoforin C a aktinová vlákna. [22, s.129]

Erytrocyty jsou do velké míry značně odolné vůči změnám osmotické rovnováhy. Zkoumáme-li odolnost krvinek vůči nízkému osmotickému tlaku prostředí, je přisuzována podle koncentrace roztoku, ve kterém pozorujeme první známky osmotické hemolýzy erytrocytů (tzv. minimální osmotická rezistence) a podle koncentrace roztoku, ve kterém hemolyzovaly všechny krvinky (tzv. maximální osmotická rezistence). V izotonickém prostředí (0,9% NaCl) je forma zachována. Koncentrační gradient zůstává konstantní. Do červených krvinek se nedostává žádná tekutina, ani není voda nasávána dovnitř. Během změn fyziologických podmínek či při výskytu patologických jevů v organismus může dojít k její ztrátě. V hypertonickém roztoku, koncentrace prostředí je vyšší než intracelulárně, se buňka smršťuje. Osmotickou odolnost je možné stanovit pomocí roztoku NaCl, jehož koncentrace se

pohybuje mezi 2,0-9,0 g/ l soli. S postupně klesající koncentrací chloridu sodného nejčastěji o 0,2 g/l , dojde k jevu, minimální osmotické rezistenci, kdy začínají hemolyzovat nejstarší krvinky. Ve zkumavce pozorujeme nad sedimentem světle červené zbarvení. [22, s. 281] Maximální osmotická rezistence erytrocytů je stav, kdy začnou prskat i ty nejodolnější červené krvinky. Projeví se úplnou hemolýzou ve zkumavce s nápadně červeným zbarvením roztoku, který je bez sedimentu. Z rozdílu těchto rezistencí, může být spočítána rezistenční šíře. Vypovídá o odolnosti k hypotonickému prostředí v celé populaci krvinek. [22, s. 282-283]

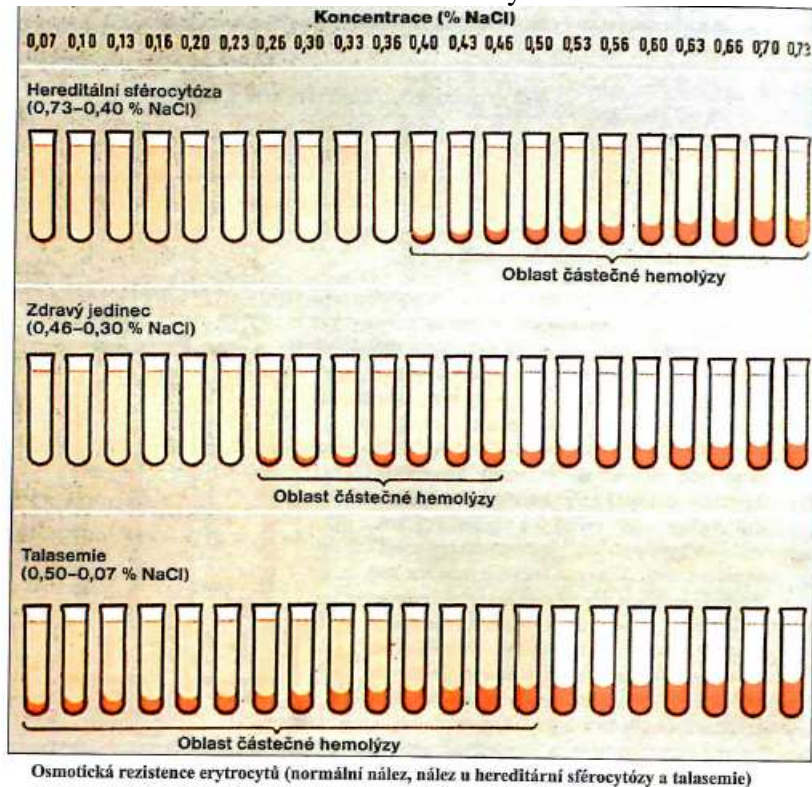
Tento děj se nazývá hemolýza. V roztocích o nižším osmotickém tlaku, hypotonickém prostředí, postupně dochází k vyrovnání tlakového gradientu přijímáním vody z vnějšího prostředí do buňky. Zvětšování objemu erytrocytu vede k následnému narušení buněčné membrány, prasknutí a k uvolnění hemoglobinu. [20, s. 125]

Tabulka č. 2: Fyziologické hodnoty osmotické rezistence

<i>Fyziologické hodnoty:</i>	
$4^{\circ}C$	<i>osmotická rezistence minimální 4,4-4,0 g/l NaCl(0,44-0,40% NaCl) osmotická rezistence maximální 3,2-3,0 g/l NaCl(0,32-0,30% NaCl)</i>
$20^{\circ}C$	<i>osmotická rezistence minimální 4,6-4,0 g/l NaCl(0,46-0,40% NaCl) osmotická rezistence maximální 3,4-3,0 g/l NaCl(0,34-0,30% NaCl)</i>

Zdroj: PECKA, M. a kolektiv. *Praktická hematologie: Laboratorní metody*,s.283

Obrázek č. 12 : Osmotická rezistence ery



Zdroj: PECKA, M. a kolektiv. Praktická hematologie: Laboratorní metody s. 71

V klinické praxi se sníženou osmotickou rezistencí setkáme u hemolytických anémií a hereditárních sférocytóz. Zvýšená osmotická rezistence je typická pro: polycytemie, jaterní onemocnění, srpkovitou anemii či anemii z nedostatku železa. [22, s. 281]

1.3.5 Membrána červených krvinek

Membrána erytrocytů je strukturovaná jako plochá lipidová dvojvrstva. Hydrofilní konce fosfolipidů tvoří zevní a vnitřní cytoplasmatický povrch membrány, hydrofobní konce jsou orientovány k sobě ve středu membrány. Asymetricky uspořádané proteiny se dělí na integrální membránové proteiny, které jsou přímo zabudovány do lipidové dvojvrstvy a můžeme je dále dělit na penetrující a nepenetrující, a periferní membránové proteiny, které jsou k povrchu membrán připojeny volněji a jsou situovány na zevním nebo vnitřním povrchu membrány. Proteiny v membráně nejsou schopny laterální difúze.

Spektrin (proužek 1)

Je hlavním cytoskeletárním proteinem. Obsahuje čtyři vazebná místa pro spektrin, ankyrin, aktin a poslední pro protein 4.1.

Ankyrin (proužek 2.1) připomínající svým tvarem jehlan. Váže k sobě spektrin a proužek 3. zajišťuje vazbu spektrinu k cytoplazmatické membráně.

Kapnoforin(nebo-li proužek číslo 3) zabezpečuje transport chloridových aniontů.

Proužek 4.1 utváří trojici společně se spektrinem a aktinem. Vznikající komplex vážou k cytoplazmatické membráně. Poruchy směřují k hereditární eliptocytóze.

Glykoforiny A,B,C se řadí mezi intergrální proteiny, které prostupují napříč mebránou. [19,20,23]

1.3.6 Hemolýza-chování v roztocích

Hemolýza Je to stav, kdy dochází k porušení integrity membrány červené krvinky. Obsah se dostává ven z buňky.

Rozlišujeme:

Osmotická – během pobytu krvinky v hypotonickém prostředí absorbují vodu a mění se v kouli. Mladší erythrocyty mají určitou odolnost. To se nedá říci o starších, ty hemolyzují dříve.

Fyzikální- nastává za podmínek, kdy jsou erythrocyty vystaveny změnám teplot nebo mechanickému třepání.

Chemická- typickými představiteli jsou rozpouštědla, kyseliny a louhy vyvolávající reakci v membráně. Dochází k interakci s lipidovou složkou membrány.

Toxická- může být vyvolána například po uštknutí hadem nebo po vystavení jiným toxinům

Imunologická- hlavním viníkem je komplement, který má lytické účinky. [20, s.125]

1.3.6.1 Anemie za zvýšené destrukce erythrocytů- hemolytická

Chudokrevnost nebo-li anemie je onemocnění, jejíž příčinou je zkrácené přežívání erythrocytů. Spočívá v okolních podmínkách a vlivech.

Hemolytické anemie (HA) dělíme na:

- **Dědičné** nebo-li korpuskulární HA (příčina hemolýzy spočívá přímo v krvince)
 - Talasemie - porucha tvorby hemoglobinu

- Srpkovitá anemie - tvorba hemoglobinu probíhá, ale je patologická. Krvinky srpkovité tvary.
- Dědiční sférocytóza -. defekt v membráně. Ztráta bikonkávního tvaru. Erytrocyt kulovitý.
- **Získané** (extrakorpuskulární) HA - nesouvisí s krvinkou jako takovou
- **Imunitní HA**
- **Neimunitní HA**

Definice HA:

„Heterogenní skupina chorobných stavů, kdy k rozpadu erytrocytu dochází v důsledku působení jiných než imunitních vlivů, přičemž však porucha samotná není ve vlastním erytrocytu.“ [24, s. 204]

Tabulka č. 3: Rozdělení extrakorpuskulárních anemií

Imunitní	Neimunitní
Způsobené aloprotilátkami: postransfúzní hemolytické reakce, hemolytické onemocnění novorozence	Z příčin chemických, metabolických či biologických
	Z příčin fyzikálních
Způsobené autoprotilátkami: autoimunitní HA	Z příčin infekčních
	Mikroangiopatické HA

Zdroj: Vlastní zpracování, NEJEDLÁ, M., ŠAFRÁNKOVÁ, A.: Interní ošetřovatelství I., s.96

Anemie by neměla být brána jako choroba, ale spíše jako syndrom „vznikající z různých příčin a charakterizovaných snížením koncentrace hemoglobinu pod 135g/ l u mužů a 120g/ l u žen (podle WHO pod 110 g/l,) hematokritu a počtu erytrocytů.“ [25, s. 96]

Člověka trpícího anemií je možno subjektivně poznat podle vzhledu. Jeví se jako bledý. Sám pociťuje slabost a malátnost. Organismus se snaží kompenzovat buněčnou hypoxii těmito mechanismy:

- zvyšuje přísun kyslíku (nemocný hyperventiluje- zrychleně dýchá)
- zrychlená srdeční akcelerace (tachykardie). Pomáhá rychlejšímu rozvodu kyslíku po těle a tím i minutový objem srdeční.
- zvyšuje hormonální zabezpečení tvorbou erytropoetinu v ledvinách. Uspíší krvetvorbu v kostní dřeni. [25, s. 98-99]

1.4 Vyšetření hematurie v močovém sedimentu s využitím fázového kontrastu

1.4.1 Definice

„Hematurie (z latinského haematuria, ae, f. ř. haima – haimos krev ř. úron moč) je přítomnost erytrocytů v moči. Norma : 5 erytrocytů / μl (hranice stanovitelnosti testačními papírky je 5-10 ery) / μl .“ [27, s.28]

U zdravého jedince by se v zorném poli centrifugovaného vzorku neměly erytrocyty vyskytovat. Nález 1- 2 krvinky v zorném poli, při vyšetření močového sedimentu se pořád nepovažuje za patologický. Pokud se jedná o moč, která nebyla centrifugována, pak za fyziologické hodnoty považujeme 0 – 2 erytrocyty v zorném poli. U hodnocení pomocí Bürkerovy komůrky je vyhodnocen jako normální nález do 5 erytrocytů na 1 mm³. Hematurie může být velmi dobře znatelná pouhým zrakem nebo vyhodnocena mikroskopem. Často se v literatuře setkáváme s užíváním slova erytrocyturie, jako synonyma hematurie. Oba termíny se používají k označení dosti podobných syndromů, u kterých se objevuje krev v moči. Na rozdíl od erytrocyturie je hematurie vždy postrenální původu, někdy se objevují i koagula. [25]

1.4.2 Klasifikace

a. Dle množství (intenzity)

- **Mikroskopická**

- Moč není zbarvena do červena. Potvrzení pozitivního výsledku pomocí laboratorního vyšetření. Je často asymptomatická,
- Prozkoumání močového sedimentu pod mikroskopem (2-5 ery/zorné pole při zvětšení 400krát)

- **Makroskopická**

- Viditelná pouhým okem, Moč má typickou červenou barvu, přecházející do hnědých odstínů.

b. Podle výskytu:

- Přechodná (ojedinělá)
- Opakovaná (intermitentní)
- Trvalá (permanentní)

Přechodné a intermitentní formy hematurií se objevují většinou u mladších pacientů. Onemocnění má lehčí průběh, často se v praxi setkáváme s benigním charakterem. Hlavní skupinou, kteří trpí permanentní formou jsou lidé nad 50. let. Prognózy na uzdravení nejsou tak příznivé. Jedná se především o maligní zvraty.

c. Dle patofyziologie:

Prerenální - Hemoragické diatézy, systémová porucha procesu srážlivosti, iatrogeně nepřiměřitelná antikoagulační terapie.

Renální - Postižení glomerulů nebo tubulo - intersticiální. Přechodem erytrocytů přes porušenou membránu se mění jejich tvar, vznikají dysmorfní erytrocyty". Převaha dysmorfních erytrocytů v močovém sedimentu při vyšetření fázovým kontrastem je známkou glomerulárního původu.

Postrenální - Porušená sliznice vývodných cest močových. Příměs erytrocytů má původ v přímém prosakování z cév sliznic [25, s.119]

d. Z hlediska příčiny:

Tabulka č. 4: Rozdělení hematurií z hlediska příčin:

extrarenální příčiny	<ul style="list-style-type: none"> • předávkování antikoagulačními léky • protidestickové inhibitory • leukemie • polycythaemia vera
intrarenální příčiny	<ul style="list-style-type: none"> • idiopatická glomerulonefritida • glomerulopatie v rámci systémových chorob (systémový lupus erythematoses, Schönleinova-Henochova purpura, Wegenerova granulomatóza, mikroskopická polyarteritida, polyarteritis nodosa, Goodpastureův syndrom, endocarditis lenta) • glomerulopatie v rámci jiných chorob (hemolyticko-uremický syndrom, Alportův syndrom, benigní familiární hematurie, Fabryho choroba, nail-patela syndrom) • vaskulární příčiny (maligní hypertenze, tromboembolická choroba ledvin, cholesterolová embolie ledvin, trombóza renální tepny, stenóza renální tepny – hematurie je způsobena periureterálním kolaterálním cévním systémem, trombóza renální žíly, intrarenální arteriovenózní fistule) • akutní intersticiální nefritida (alergická forma, leptospiróza, hantaviry, akutní intrarenální obstrukce – akutní urátová nefropatie, vysoká dávka metotrexátu) • lokalizované a další rozličné příčiny (Grawitzův tumor, polycystická choroba ledvin, papilární nekróza – zejména při analgetické nefropatii, trauma, houbovitá ledvina nebo nefrokalcinóza z jiných příčin)
postrenální příčiny	<ul style="list-style-type: none"> • litláza v párnici nebo ureteru • uroteliální karcinom • tuberkulóza • hydronefróza • bakteriální infekce • ptóza ledviny – intermitentní venózní kongesce • Fraleyův syndrom – hydrokalix při aberantní cévě komprimující krček kalichu • pelviureterální obstrukce • Ormondova choroba – postradiačními vazivovými změnami podmíněné obstrukce močovodů • varikozity a divertikly ureteru • malformace – malrotace, dystopie, ektopie ledviny, podkovovitá ledvina
vezikální a subvezikální příčiny	<ul style="list-style-type: none"> • uroteliální karcinom (papilokarcinom) nebo infiltrace extravezikálním karcinomem • vezikolitiáza a cizí tělesa • zánět • cyklofosfamidová a postradiační cytopatie • trauma a mikrotrauma • cytokéla, divertikly a pseudodivertikly, vagino-vezikální a rekto-vezikální fistule při karcinomech a Crohnově chorobě, vzácněji traumatu • endometrióza močového měchýře • hypertrofie prostaty, karcinom prostaty

Zdroj: TEPLAN, V. Praktická neurologie, s. 26

1.4.2.1 Popis hematurií

Makroskopická hematurie

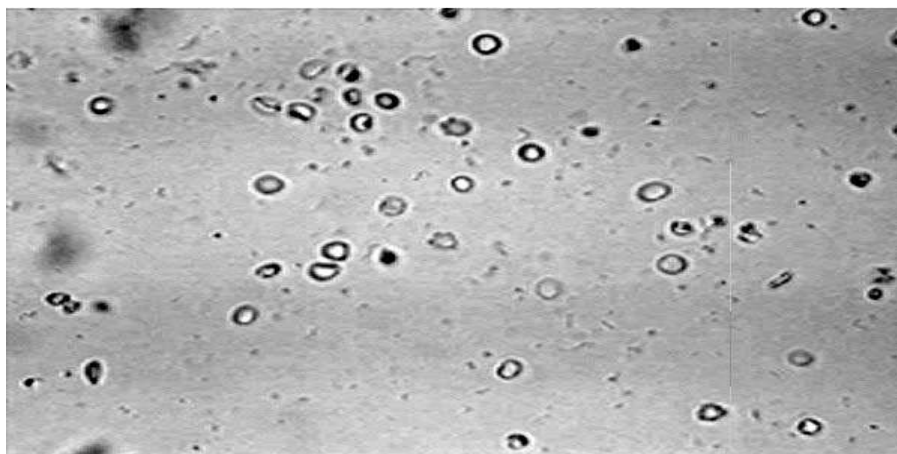
Hodnocena podle viditelného zbarvení. Zbarvení moče má širokou barevnou škálu od tmavorudé, červenou, přes tmavěhnědou až ke vzhledu, který bývá přirovnáván vzhledu vody po vyprání masa. Provází úrazy po dopravních nehodách. Doprovází nefropatii, urolitiázu, infekce močových cest, koagulopatie, trombocytopenie.

Mikroskopická hematurie (okultní)

Až polovina mikroskopických hematurií je bez zjevně nalezené patologie, příčina je neznámá. Na mikroskopickou hematurii se přichází během kontroly moči, která je prováděna z jiných důvodů, proto se nazývá také skrytá hematurie. Je zjištěna náhodou v rámci onemocnění, které nemusí s tímto problémem vůbec souviset. Průkaz je prováděn testovacím ponorným proužkem. Jako falešně pozitivní výsledky mohou být vyhodnoceny vzorky moči s výrazným alkalickým pH. Také přítomnost některých bakterií, bílých krvinek a spermií může vyhodnocovaný výsledek výrazně zkreslit. Ve vodě solubilní vitamín C, který se při vyšších koncentracích dostává do moče, může zapříčinit tentokrát falešně negativní výsledek.

1. Klasické vyšetření močového sedimentu – použití speciálně upraveného mikroskopu (fázový kontrast), při 400 násobném zvětšení.
2. Průtoková cytometrie - necentrifugovaná nativní moč. Přesnost a správnost výsledku ovlivňuje především transport vzorku. Doba po odběru by neměla přesáhnout dobu 45 minut. Ideálnější je odebrání vzorku až z druhé ranní mikce.

Obrázek č.13: Obraz červených krvinek v glomerulární hematurie. Typický vzhled: vlastní RBC jsou malé a liší se velikostí, tvarem a obsahem hemoglobinu.



Zdroj: INDIAN PEDIATRICS,

Dostupné na : <<http://www.indianpediatrics.net/nov2006/nov-965-973.htm>>

Mikroskopická hematurie, nepředstavuje v žádném případě klinicky závažný problém. Výjimkou může být extraglomerulární hematurie při níž dochází k tvorbě sraženin, jejíž výskyt je organismu nežádoucí. Urologové, neurologové i gynekologové se setkávají s hematurií pravidelně. Je důležité, aby příčina, která by vedla k odhalení závažnému ledvinnému nebo urologickému onemocnění, byla odhalena, co nejdříve. Významné postavení v rámci odhalení mikrohematurie je neinvazivní metoda vyšetření močového sedimentu ve fázovém kontrastu. Toto stanovení dokáže odlišit, zda má onemocnění glomerulární či neglomerulární původ. Po důsledné konzultaci s lékařem se volí i radikálnější metody stanovení, jako je renální biopsie, která dokáže zjistit pravou příčinu postižení. [33]

1.4.2.2 Vyšetření moči a močového sedimentu

K biochemickému vyšetření moči se používají speciální diagnostické testovací proužky, které dokážou díky změně barvy odhalit krev v moči. Patří k rutinním vyšetřením. Provedení je jednoduché a finančně nenáročné. Ke změně dojde specifickou reakcí chemické látky, kterou je napuštěn papírek a stanovované složky (erytrocytů) v moči. Způsob hodnocení je buď subjektivní (zrakem) či za použití speciálních fotometrů. Používání testovacích papírků pomohlo ke zvýšenému zachytu mikroskopické hematurie. Významnou metodou je stanovení formovaných elementů v močovém sedimentu. Používá se ke stanovení hlavně buněk (červených krvinek, leukocytů, epitelů), krystalů, válců, parazitů (*Trichomonas vaginalis*), bakterií, artefaktů. Jedná se o cytologickou analýzu, která pomáhá při stanovení správné

diagnózy. Provádí se u pacientů trpících hematurií s příznaky infektu močových cest. Pro pacienta s nefropatií je výhodou stanovení diagnózy bez provedení invazivního vyšetření. V některých případech mohou být laboratorní výsledky zkreslené. Kontaminace může být zapříčiněna menstruační krví, pohlavním stykem, krví časně po porodu, poškozením z děložního čípku během kolpity fluorem. Namáhavější cvičení jako je aerobik nebo jízda na koni, kde dochází k otřesům, mohou zapříčinit případnou pozitivitu. Po konzultaci s pacientem, který může udat některý z předcházejících argumentů, se doporučuje laboratorní vyšetření po nějaké době zopakovat. Během klinické praxe známy i případy, kdy si sami pacienti přidávali krev do odebraného vzorku. Abychom si byli jisti, že se jedná opravdu o hematurii, je nutné vyloučit bilirubinémii, hemoglobinurii, myoglobinurii nebo porfyrinurii. Jsou také typické tím, že tmavě zbarvují moč. [21]

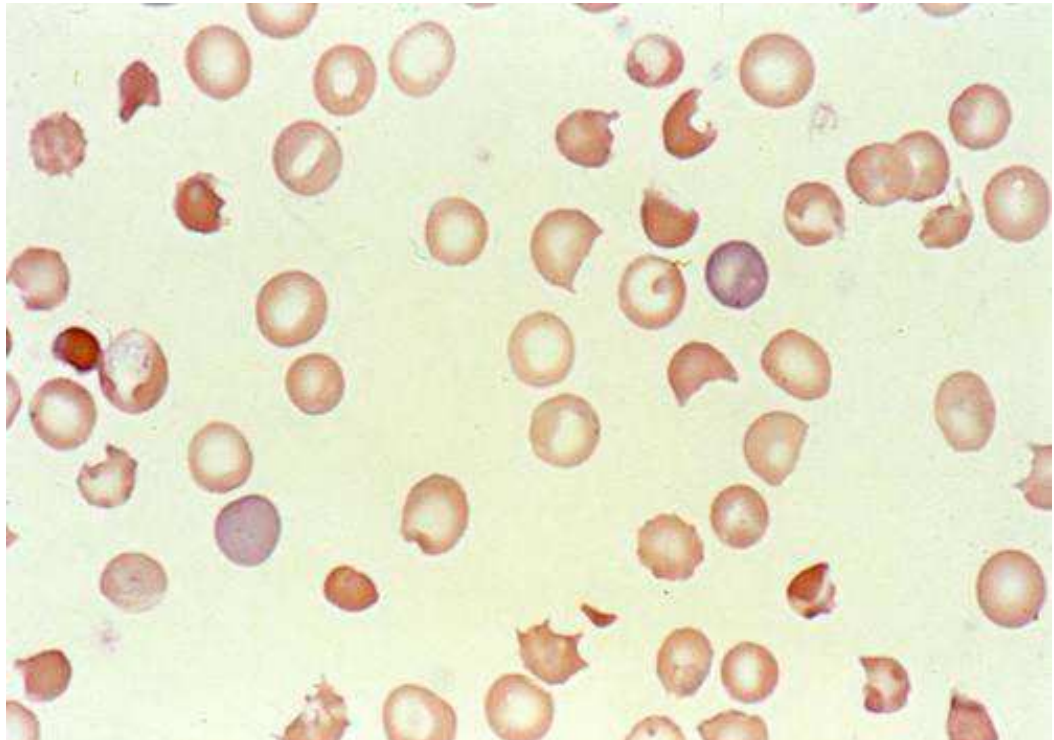
Rozdělení hematurie z hlediska příčin:

Glomerulární typ

Příčina je nefrologická. Krvinky přecházejí přes membránu glomerulu a pak směrem do ledvinových tubulů se stávají součástí moči. V močovém sedimentu bychom našli dysmorfní tvary erytrocytů, které vznikly poškozením membrány během transportu. Krev by měla být filtrována zpět do cév a nedostávat se do moči. Typickým nálezem jsou akantocyty. Více jak 5% nález těchto buněk je téměř jistým potvrzením glomerulonefritidy. Spojení hematurie s granulovaným, buněčným či hyalinním typem válcem opět potvrzuje tuto diagnózu.

Problém u **neglomerulárního typu** bychom museli hledat v urologickém poškození. „Zpravidla hodnotíme 100 erytrocytů, přičemž 80% a více dysmorfních erytrocytů svědčí pro glomerulární typ hematurie. Naopak 80% a více izomorfních erytrocytů svědčí pro neglomerulární hematurii.“ [21, s. 27]

Obrázek č.13: Akantocyty v periferní krvi nemocného s hemolyticko-uremickým syndromem



Zdroj: Medicabaze, Dostupné na

<http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term_detail&categId=14&cname=Hematologie+a+transfuzn%C3%AD+1%C3%A9ka%C5%99stv%C3%AD&termId=770&tname=An%C3%A9mie+hemolytick%C3%A9+mikroangiopatick%C3%A9&h=empty#jump>

2 Experimentální část zaměřená na testy osmotické rezistence a vyhodnocení tvarů a velikosti erytrocytů v závislosti na osmotickém tlaku

Realizaci jsem prováděla v laboratoři fyziologie pomocí badatelského mikroskopu Nikon Eclipse 80i. K testům byly využity vzorky vlastní krve, které byly odebrány ve zdravotnickém zařízení za účelem stanovení, zda výsledné chování v roztocích bude adekvátní změně tvaru.

Zaměřila jsem se na:

- práci s mikroskopem (studentský i badatelský)
- testy zaměřené na osmotickou rezistenci – jejich provedení
- testy chování ery v roztocích různé koncentrace
- pořízení snímků a následné vyhodnocení.

2.1 Provedení testu osmotické rezistence erytrocytů

Materiál:

- nesrážlivá lidská krev (použitý protisrážlivý prostředek: chelaton 3)
- zkumavky
- pipety
- 1% roztok NaCl
- Pasteurova pipeta
- destilovaná H₂O

Postup práce:

1. Ze zásobního 1% roztoku NaCl a destilované vody byla připravena sada zkumavek (označené 1-11) různých koncentrací podle následujícího schématu:

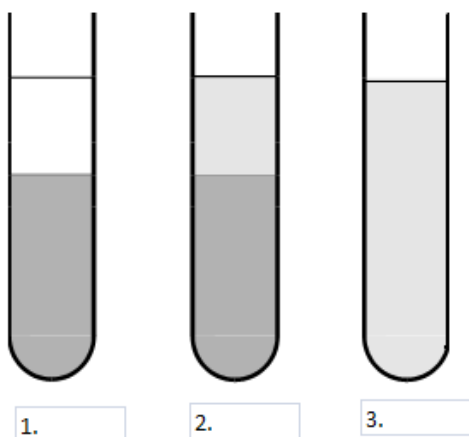
Tabulka č. 5: Příprava roztoků (vlastní zpracování)

Číslo zkumavky	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
c%(NaCl)	0,7	0,66	0,62	0,58	0,54	0,5	0,46	0,42	0,38	0,34	0,3
V (NaCl) [ml]	3,5	3,3	3,1	2,9	2,7	2,5	2,3	2,1	1,9	1,7	1,5
V (H ₂ O) [ml]	1,5	1,7	1,9	2,1	2,3	2,5	2,7	2,9	3,1	3,3	3,5

2. Do takto připravených zkumavek dána 1 kapka nesrážlivé krve (10μl).

3. Obsah zkumavky byl opatrně promíchán obrácením zkumavky tak, abychom získali stejnoměrně zbarvenou suspenzi erytrocytů, kterou necháme stát při pokojové teplotě.
4. Výsledek odečtete přibližně za 2 hodiny. Pro posuzování je rozhodující vzhled roztoku a jeho zbarvení ve zkumavce. Ve zkumavce, kde nedošlo k hemolýze, vidíme neprůhledný růžový sediment erytrocytů a nad ním čirý, bezbarvý roztok NaCl. Počínající hemolýzu poznáte podle růžového zbarvení roztoku NaCl nad neprůhlednou růžovou sedlinou erytrocytů. Růžové zbarvení je způsobeno hemoglobinem uvolněným z hemolyzovaných červených krvinek. Koncentrace NaCl v této zkumavce udává minimální osmotickou rezistenci. Pakliže je obsah zkumavky růžový bez sedimentu erytrocytů, znamená to, že v roztoku hemolyzovaly všechny krvinky a koncentrace NaCl v této zkumavce je hodnotou maximální osmotické rezistence.

Obrázek č. 14: Zkumavky se suspenzí erytrocytů v hypotonických roztocích NaCl .



1. sediment erytrocytů + bezbarvý roztok NaCl
2. sediment erytrocytů + růžový roztok NaCl (odpovídá hodnotě minimální osmotické rezistence)
3. růžový roztok NaCl bez sedimentu erytrocytů (odpovídá hodnotě maximální osmotické rezistence)

Výsledek:

Hodnota minimální osmotické rezistence byla 0,46% NaCl a 0,34% NaCl u maximální osmotické rezistence. Výsledek provedeného testu je v rozmezí fyziologických hodnot. Osmotická rezistenční šířka byla vypočtena $0,46 - 0,34 = 1,2\%$ NaCl.

2.2 Chování erytrocytů v roztocích

Materiál:

- podložní a krycí sklíčka
- 0,8 -5 % roztoky NaCl
- destilovaná voda
- zkumavky, kádinky
- skleněná pipeta a automatická pipeta
- Badatelský mikroskop Nikon Eclipse 80i

Postup práce:

Práce s čerstvou krví, která byla nabrána do fialových zkumavek obsahující protisrážlivou látku EDTA.

Tabulka č. 5: Příprava jednotlivých roztoků

Kádinky	Navážka NaCl + doplnění do 50 ml
0,8 % roztok NaCl	0,4g
0,9 % roztok NaCl- isotonický roztok	0,45g
1,0 % roztok NaCl	0,5g
1,1 % roztok NaCl	0,55g
1,2% roztok NaCl	0,6g
5% roztok NaCl - hypertonický roztok	2,5g
Destilovaná voda – hypotonický roztok	50 ml

1. Byly připraveny jednotlivé roztoky podle tabulky č. 5. Reprezentantem hypotonického prostředí bude destilovaná voda a hypertonického 5% NaCl.
2. 1 ml daného roztoku byl smíchán s 200 μ l krve. Takto připravíme 7 zkumavek. Preparáty připraveny na podložním sklíčku. Zvolena reverzibilní forma pipetování, která je přesnější. Dávkuje 10 μ l krve, kterou smícháme s kapkou jednotlivých roztoků, přikryjeme sklíčkem a studujeme pod mikroskopem.

Pro pozorování připravených preparátů byl využit badatelský mikroskop Nikon 80i. Veškeré objekty pozorovány metodou fázového kontrastu při 400 násobném zvětšení v místě, kde nejsou erytrocyty příliš blízko u sebe, jsou rozptýleny. Procvičovány techniky mikroskopování s cílem pořízení kvalitního

snímku. Pokud se do preparátu dostalo více bublinek, byl preparát připraven znovu.

Hodnocení vybraných snímků:

Snímky 1 – 4: Erytrocyty byly vystaveny působení roztoku NaCl v rozmezí koncentrací

0,8 až 1,2%. Buňky si zachovávají svůj bikonkávní, diskoidní tvar s centrálním projasněním. Takto vypadá pohled na krvinky zdravého jedince. Za normálních okolností by měly buňky vypadat jako na obrázku č. 4.

Snímky 4 – 5: Rozdíl mezi těmito snímky srovnává tvarovou změnu stejného vzorku krve po 5. hodinách od začátku mikroskopování.

Snímky 6 – 7: Na těchto dvou snímcích jsou červené krvinky vystavené už takovému koncentračnímu gradientu NaCl, že dochází ke změně tvaru krvinek. Na snímku č. 6 se tak děje na některých místech, ale při detailnějším prozkoumání pomocí modrého filtru snímek

č. 7 se přesvědčíme, že membrána je již změněna (hvězdičkování). Je různě zprohýbána.

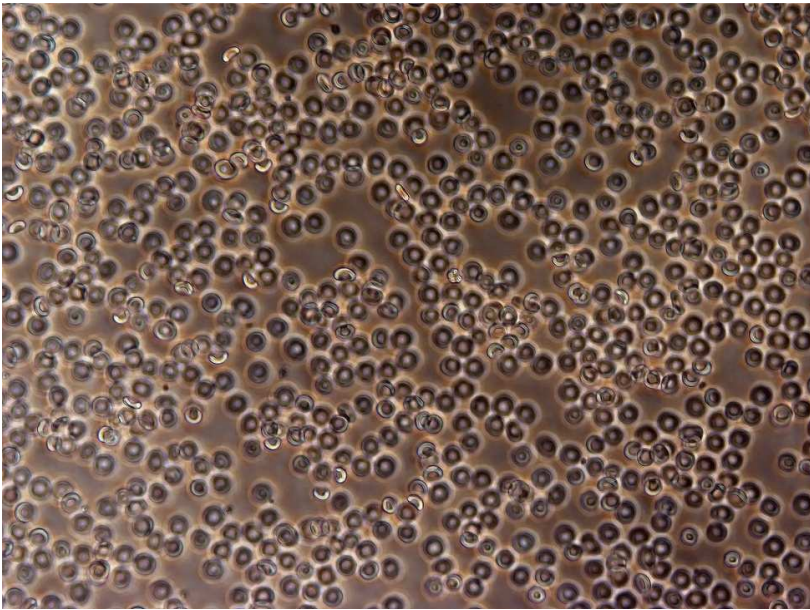
Snímky 8 – 9: Zachycují erytrocyty 5. hodin po začátku práce s krví. Po obvodu buňky se vytvářejí četné výběžky. Za zmínku stojí fakt, že na snímku č. 9 by nemělo docházet ke srašťování buněk, ale po pěti hodinách ztrácí membrána erytrocytů svou odolnost.

Snímek 10: Na snímku vidíme odchylky jednotlivých tvarů erytrocytů- poikilocyty. Na snímku patrné stíny bývalých erytrocytů.

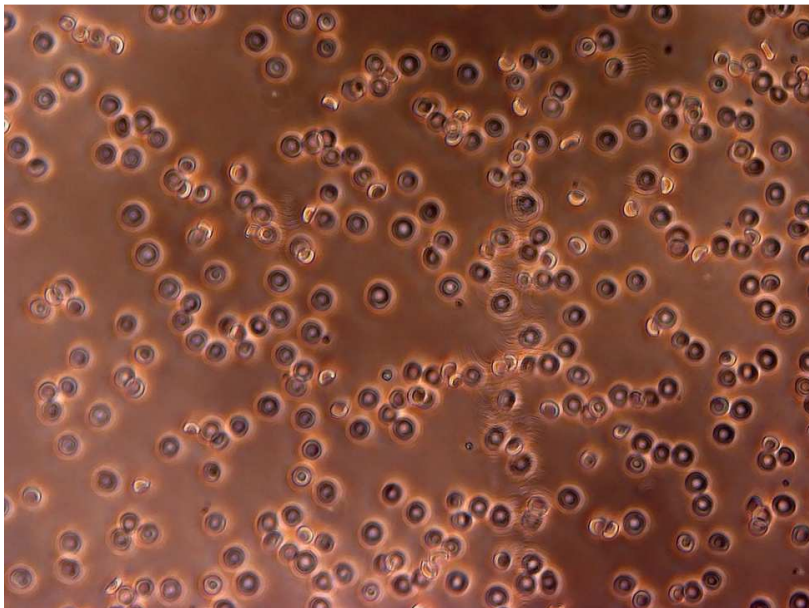
Snímek 11: Erytrocyt v hypotonickém roztoku nasává vodu z okolí. Zvětšující objem napíná membránu, během tohoto děje dochází k jejímu narušení a prasknutí. Buňky syté, tmavší, nenacházíme projasnění uprostřed terčíku. Takovým buňkám se říká sférocyty.

Snímek 12: Krvinky po dvou minutovém třepání na vortexu vykazují také poškození integrity membrán.

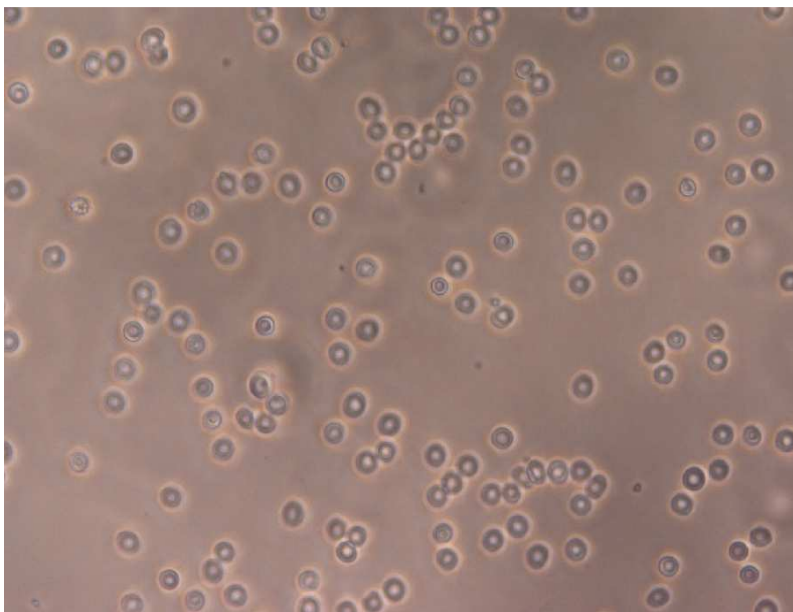
Snímek č. 1: erythrocyty v 0,8 % roztoku NaCl (zvětšení 40x10, Ph2)



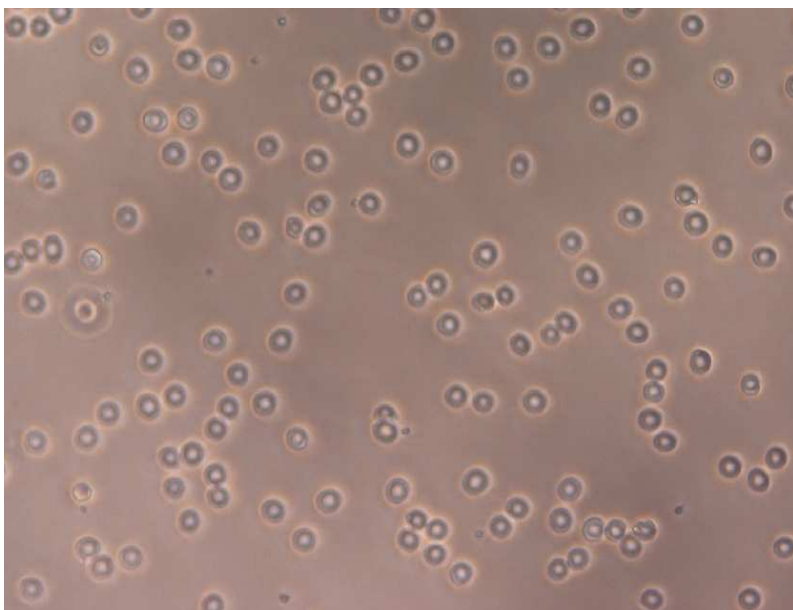
Snímek č. 2: erythrocyty v 0,9 % roztoku NaCl (zvětšení 40x10, Ph2)



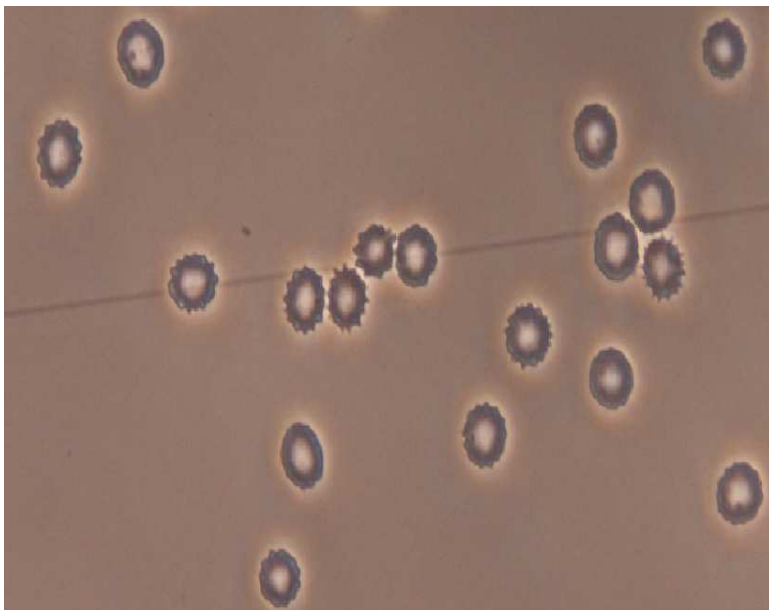
Snímek č. 3: erythrocyty v 1,1 % roztoku NaCl (zvětšení 40x10, Ph2)



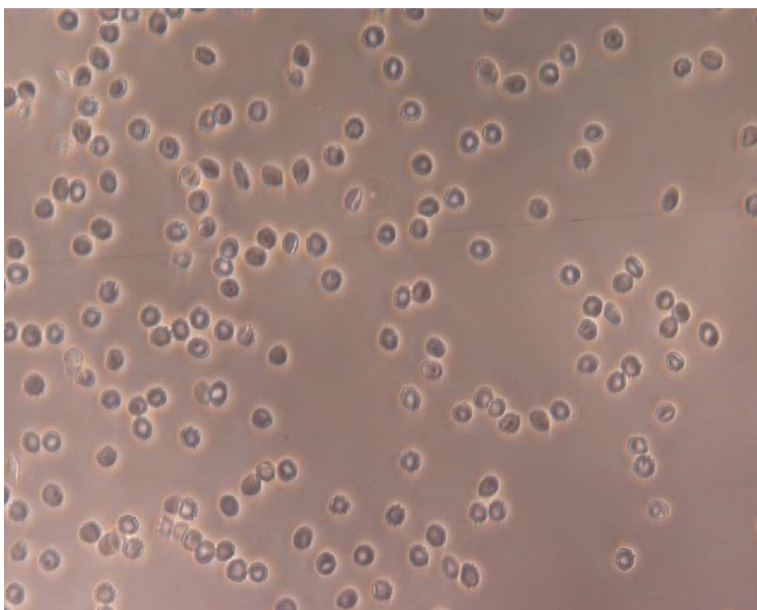
Snímek č. 4: erythrocyty v 1,2 % roztoku NaCl (zvětšení 40x10, Ph2)



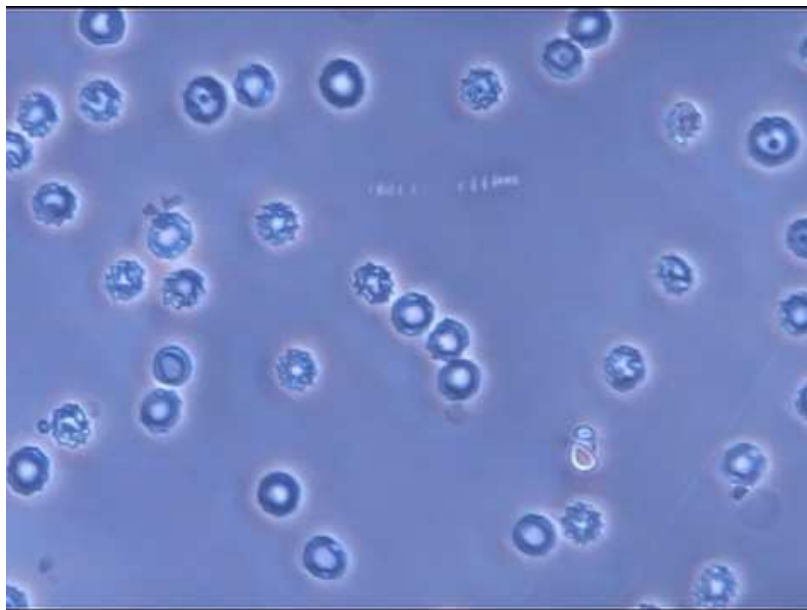
Snímek č. 5: erythrocyty v 1,2 % roztoku NaCl po 5.hod (zvětšení 40x10, Ph2)



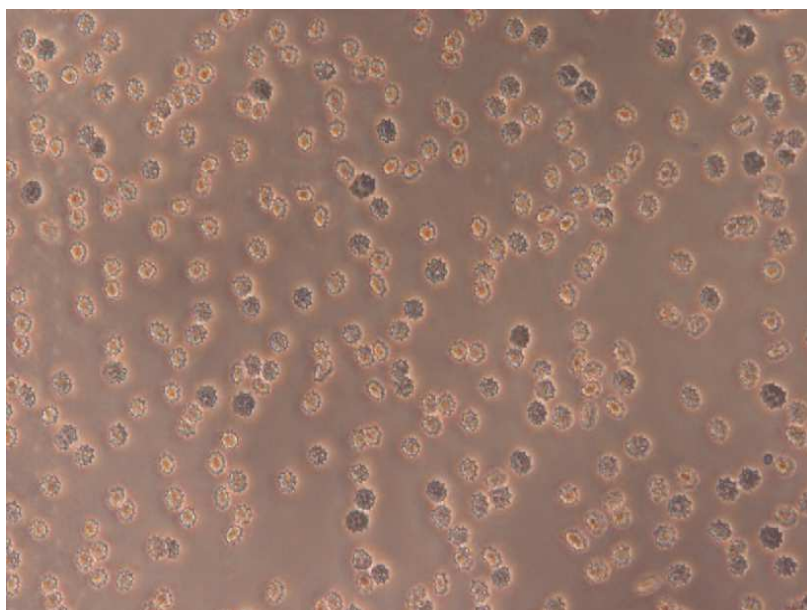
Snímek č. 6: erythrocyty v 5 % roztoku NaCl (zvětšení 40x10, Ph2)



Snímek č. 7: erythrocyty v 5 % roztoku NaCl (zvětšení 40x10, Ph2)



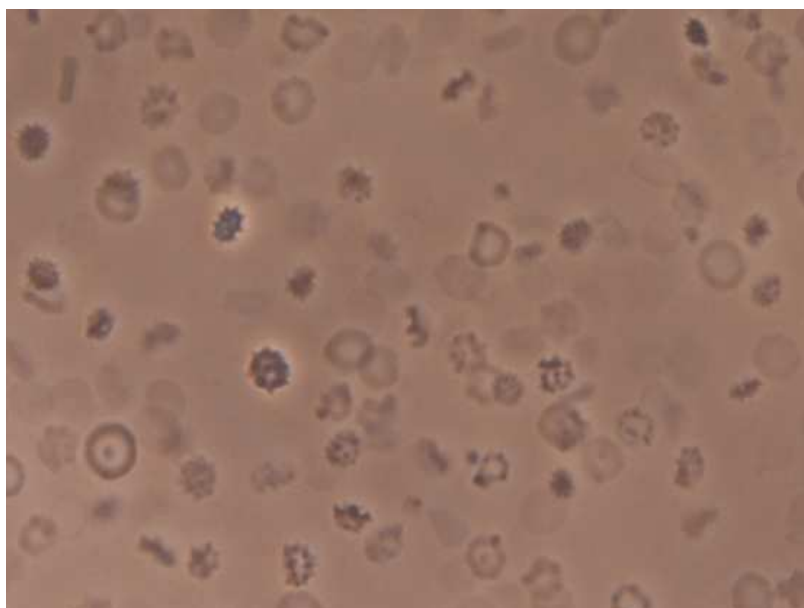
Snímek č. 8: ery v hypertonickém roztoku po 5.hod (zvětšení40x10, Ph2)



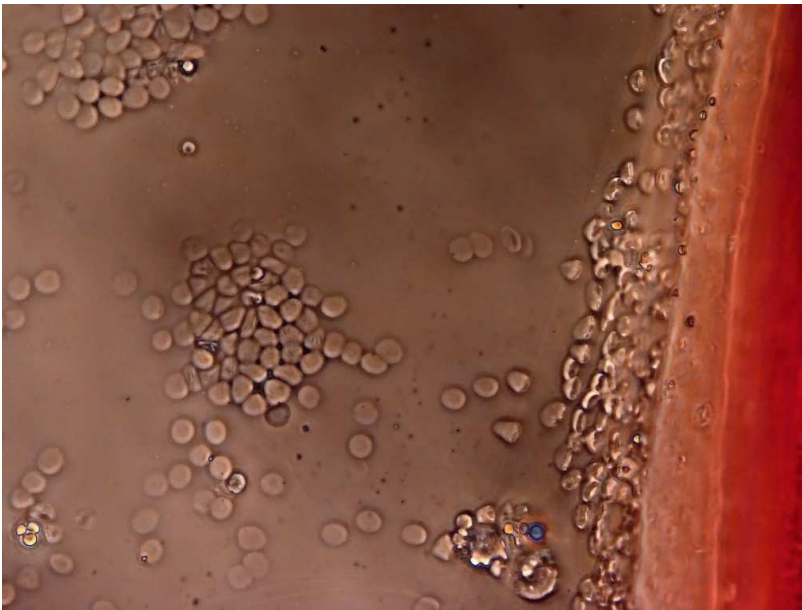
Snímek č. 9: ery ve fyziologickém roztoku po 5 hod (zvětšení 40x10, Ph2).
Snímek zachycuje přechod do isotonického prostředí.



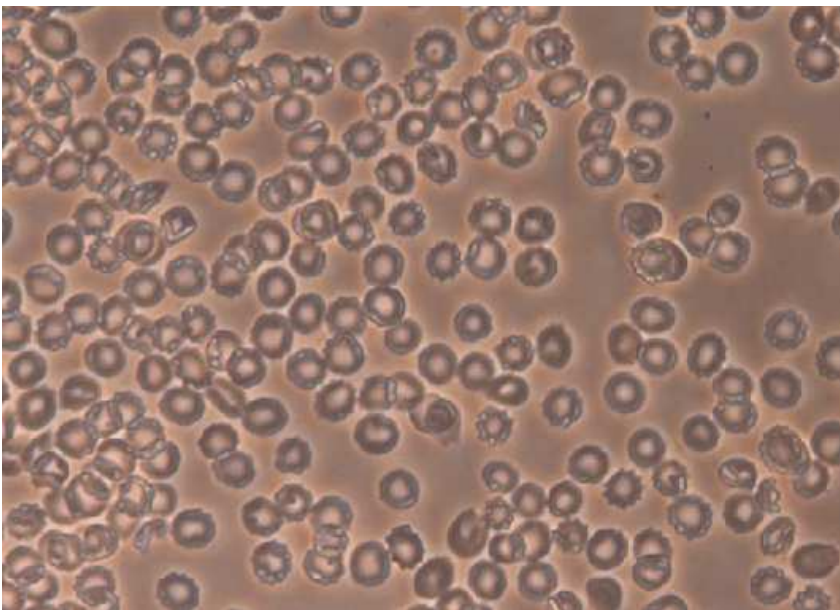
Snímek č. 10: erythrocyty vystavené krystalům NaCl (zvětšení 40x10, Ph2)



Snímek č. 11: erythrocyty v hypotonickém roztoku (zvětšení 40x10,Ph2)



Snímek č.12: červené krvinky po mechanickém poškození (zvětšení 40x10,Ph2)



ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši shrnující problematiku vybraných pokročilých mikroskopických technik v hematologii s využitím badatelského mikroskopu Nikon Eclipse 80i a jeho příslušenství. Mikroskop v 21. století už není chápán jako přístroj, který slouží jen k zobrazení okem neviditelných předmětů. Mikroskopická technika prošla pozoruhodným historickým vývojem a v dnešní době zaznamenává průlom v jednotlivých odvětvích vědy a techniky. Hlavním záměrem bylo vyzvednout jejich přednosti, objasnit jednotlivé principy a využití konkrétních metod. Pozornost byla zaměřena na studium funkce a vlastností erytrocytů, které sehrávají životně důležitou roli v lidském organismu a jejich změny, které mohou vést k rozvoji vážných onemocnění. Práce objasňuje problematiku vyšetření hematurie v močovém sedimentu za pomoci fázového kontrastu. Jeho význam podtrhuje v analytické části, kde byla tato metoda využita při pozorování a vyhodnocování tvarů červených krvinek vlastně zhotovených preparátů. Testy osmotické rezistence a testy sledující chování erytrocytů v roztocích sloužily k potvrzení obecně známých zákonitostí týkajících se ery.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Mikroskopy* [online] [cit. 17.2.2012]. Dostupné na:
<<http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/digitalni-mikroskopy/>>
- [2] *Mikroskopy-UK* [online] *Micscape magazine* [cit. 17.2.2012]. Dostupné na:
<<http://www.microscopy-uk.org.uk/intro/histo.html>>
- [3] JANDOŠ F., ŘÍMAN R., GEMPERLE A.: *Využití moderních laboratorních metod v metalografii*. 1. vydání. Praha: SNTL, 1985. str. 384
- [4] *Mikroskop NIKON Eclipse 80i- Návod k použití 1.díl- Základní informace*
[dokument University Pardubice,KBBV]
- [5] *Mikroskopy* [online] [cit. 17.2.2012]. Dostupné na:
<<http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/barveni-biologickych-preparatu/>>
- [6] *NIKON (Technické materiály společnosti NIKON)* [online] [cit. 18.2.2012].
Dostupné na: <http://www.nikoninstruments.com/en_CZ/Information-Center/Brightfield>
- [7] PLÁŠEK,J.: *Nové metody optické mikroskopie*, [online]. Dostupné na:
<http://dml.cz/bitstream/handle/10338.dmlcz/139719/PokrokyMFA_41-1996-1_1.pdf>
, str. 12
- [8] *Mikroskopy* [online] [cit. 17.2.2012]. Dostupné na:
<<http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/sikme-osvetleni/>>
- [9] *MICROSCOPY RESOURCE CENTER* [online] [cit. 14.3.2012]. Dostupné na:
<<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/darkfield.html>>
- [10] *Mikroskopy* [online] [cit. 17.2.2012]. Dostupné na:
<<http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/temne-pole/>>

[11] *NIKON (Technické materiály společnosti NIKON)* [online] [cit. 28.3.2012]. Dostupné na: <http://www.nikoninstruments.com/en_CZ/Information-Center/Phase-contrast>

[12] *NIKON (Základní metody světelné mikroskopie)* [online] [cit. 2.3.2012]. Dostupné na: <http://www.are.cz/documents/ZAKLADNI_METODY_SVETELNE_MIKROSKOPIE.pdf>

[13] *MICROSCOPY RESOURCE CENTER* [online] [cit. 14.3.2012]. Dostupné na: <<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/dic/dicoverview.html>>

[14] *Mikroskop Nikon ECLIPSE 80i* [online] [cit. 14.3.2012]. Dostupné na: <http://www.techinst.com/pub_docs/brochures/bio/80i_brochure.pdf>

[15] *Mikroskopy* [online] [cit. 17.2.2012]. Dostupné na: <<http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/prace-s-mikroskopy/>>

[16] *Mikroskopy* [online] [cit. 17.2.2012]. Dostupné na: <<http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/popis-mikroskopu/>>

[17] FUKA J., HAVELKA B.: *Optika a atomová fyzika: Optika*, SPN Praha 1961, 845s. 45.

Dostupné na: <http://www.opto.cz/fuka_havelka/t014.html#TOC1>

[18] *NIKON (Technické materiály společnosti NIKON)* [online] [cit. 28.3.2012]. Dostupné na: <http://www.nikoninstruments.com/en_CZ/Products/Microscope-Systems/Upright-Microscopes/Biological/Eclipse-80>

[19] KITTNAR, O. A KOLEKTIV. *Lékařská fyziologie*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing a.s, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4. 121-131 s

[20] TROJAN, S. a kolektiv. *Lékařská fyziologie*. 4. doplněné vydání. Praha: Grada Publishing a.s, 2003. ISBN 80-347-0519-5. 111-136 s

[21] TEPLAN, V. *Praktická nefrologie: 2. zcela přepracované a doplněné vydání.* Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-0503-6. 26-28 s

[22] PECKA, M. a kolektiv. *Praktická hematologie: Laboratorní metody.* 1. vyd. Český Těšín: Infiniti art,s.r.o., 2010. ISBN 978-80-903871-9-5.

[23] GANONG, W.F.: *Přehled lékařské fyziologie*, 20.vyd. Praha: Galén, 2005. ISBN 80-7262-311-7. s. 519, s. 535-539

[24] PENKA, M., TESAŘOVÁ, E. a kolektiv. *Hematologie a transfuzní lékařství: Hematologie.* 1. vyd. Praha: Grada, 2011, s. 421. ISBN 978-80-247-3459-0 (BROŽ.). s. 81

[25] NEJEDLÁ M., ŠAFRÁNKOVÁ A. *Interní lékařství I.* 1.vydání. Praha: Grada, 2006, s.280, ISBN 80-247-1148-6

[26] LANGMEIER, M. *Základy lékařské fyziologie.* 1. vyd. Praha: Grada, 2009, s. 320. ISBN 978-802-4725-260, s. 44

[27] LUKÁŠ, K., ŽÁK, K. a kolektiv. *Chorobné znaky a příznaky.* 1. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2764-6

[28] Česká nadace pro nemoci ledvin. [online] *Informační brožury.* Dostupné na: <<http://www.nadaceledviny.cz/informacni-brozurky-hematurie.html>>

[29] Urologie pro praxi. [online] *Hematurie glomerulárního původu aneb jak může pomoci nefrolog urologovi v případě mikroskopické či makroskopické hematurie.* [cit. 11.4.2012]

Dostupné na: <<http://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2002/05/02.pdf>>