

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Srovnání metod pro diagnostiku akutní lymfoblastické leukémie u dětí

**Nela Bartoníčková
Jihomoravský kraj**

Brno 2025

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Srovnání metod pro diagnostiku akutní lymfoblastické leukémie u dětí

A comparison of the methods for diagnosing acute lymphoblastic leukaemia in children

Autor: Nela Bartoníčková

Škola: Gymnázium Matyáše Lercha, Žižkova 55, 616 00 Brno

Kraj: Jihomoravský kraj

Konzultant: MUDr. Veronika Fiamoli, Ph.D.

Brno 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 20. 02. 2025

Nela Bartoníčková

Poděkování

Zde bych ráda poděkovala vedoucí mé práce **MUDr. Veronice Fiamoli, Ph.D.** za její neocenitelnou pomoc a rady při zpracování této práce. Nemalý dík pak patří také **Michaelu Kokeszové, Kláře Hančíkové, Barboře Dvořákové, Mgr. Magdaléně Jelínkové, Petře Blažkové a Tereze Potěšilové, DiS.** za úžasné tipy k mikroskopování a veškerou pomoc při zpracovávání praktické části mé práce. Zároveň moc děkuji **Ing. Olze Stehlíkové, Ph.D.** za skvělé vysvětlení a seznámení s principem flowcytometrie a její cenné připomínky při zpracování této práce.

Jsem vděčná za možnost tuto odbornou práci zpracovávat v **Dětské nemocnici FN Brno** na **Oddělení dětské hematologie a biochemie** a náleží jim ode mě velké poděkování.

Také moc děkuji své **rodině a přátelům** za veškerou podporu a za to, že po celou dobu stáli při mně. Bez nich by tato práce pravděpodobně nevznikla.

Anotace

Tato práce se zabývá důležitostí diagnostiky akutní lymfoblastické leukémie pomocí různých aktuálně používaných metod. Klade si za cíl porovnání efektivity stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů periferní krve a kostní dřeně pod mikroskopem a metody flowcytometrie, což by mohlo pomoci optimalizovat diagnostiku ALL, případně (po přezkoumání) dalších typů leukémie ve zdravotnictví. Sesbíraná data pochází celkem od 32 pacientů Dětské nemocnice FN Brno dříve diagnostikovaných s akutní lymfoblastickou leukémií v letech 2022 a 2023. Každý ze vzorků jednotlivých pacientů byl zkoumán standardizovaným způsobem, z něhož byla poté data zaznamenávána. Z analýzy nasbíraných dat vyplývá, že metoda flowcytometrie je přesnější, co se identifikace krevních buněk týče a také co se týče množství zanalyzovaného vzorku jako takového. Neumožňuje však pozorovat morfologii buněk, narozdíl od metody diferenciálního rozpočtu pod mikroskopem, což je pro diagnostiku nemoci s narušením trilineární hematopoézy mnohdy esenciální. Na základě práce tak lze konstatovat, že obě ze zkoumaných metod jsou pro diagnostiku ALL důležité a není možné jednu z nich nahradit druhou. Práce ukázala výhody a nevýhody zkoumaných metod, které je nezbytné při jejich využití zvážit, a přinesla tak nové poznatky v oblasti diagnostiky leukémií.

Klíčová slova

akutní lymfoblastická leukémie u dětí; diagnostika leukémie; diferenciální rozpočet leukocytů; flowcytometrie; periferní krev; kostní dřeň

Annotation

This study discusses the importance of diagnosing acute lymphoblastic leukaemia using the various current methods. It aims to compare the effectiveness of a differential leukocyte count of peripheral blood and bone marrow samples and flow cytometry, which could help to improve the diagnosis of ALL or (after review) other types of leukaemia in healthcare settings.

The data collected came from 32 patients cured in the Children's Hospital University Hospital Brno who were previously diagnosed with acute lymphoblastic leukaemia in 2022 and 2023. All patient samples were examined thoroughly and consistently, and the resulting data were recorded accurately. Analysis of the collected data shows that the flow cytometry method is more accurate in the blood cell identification and the amount of sample analysed per se. However, unlike the method of the differential leukocyte count, it does not allow us to observe the morphology of the cells, which is often essential for the diagnosis of disruption of trilinear haematopoiesis disease. Thus, based on this work, it can be concluded that both investigated methods are crucial for the diagnosis of ALL, and one method cannot be replaced with the other. This work has shown the advantages and disadvantages of the investigated methods, which must be considered when using them. It has thus provided new insights into the field of leukaemia diagnosis.

Keywords

acute lymphoblastic leukaemia in children; diagnosis of leukaemia; microscopic differentiation; flow cytometry; peripheral blood; bone marrow

Obsah

1	Úvod	12
2	Teoretická část.....	13
2.1	Hematopoéza	13
2.1.1	Krev	14
2.1.2	Periferní krev	14
2.1.3	Kostní dřeň.....	15
2.1.4	Krevní elementy	15
2.2	Leukémie	18
2.2.1	Typy leukémií	18
2.2.2	Příčiny vzniku leukémie	19
2.3	Diagnostika leukémií a používané metody	20
2.3.1	Hematologický analyzátor	20
2.3.2	Mikroskopování krevního vzorku	21
2.3.3	Cytochemická vyšetření	24
2.3.4	Flowcytometrie	26
2.3.5	Cytogenetická a molekulárně genetická vyšetření.....	28
2.4	Léčba leukémií	29
2.4.1	Chemoterapie	29
2.4.2	Cílená terapie	30
2.4.3	Radioterapie	30
2.4.4	Imunoterapie	30
2.4.5	Transplantace kostní dřeně	30
3	Cíle práce	32
4	Metodika	33
4.1	Krevní nátěr	33
4.2	Mikroskopování krevního vzorku.....	34
4.2.1	Barvení krevního vzorku	34
4.2.2	Mikroskopování krevních vzorků	36
4.2.3	Rozpoznávání krevních elementů dle morfologie	39
4.2.4	Stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů v periferní krvi	46
4.2.5	Stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů v kostní dřeni	49
4.3	Flowcytometrie	50

4.3.1	Příprava vzorků pro flowcytometrii	50
4.3.2	CD antigeny leukocytů zkoumané při diagnostice ALL	51
4.3.3	Další antigeny zkoumané při diagnostice ALL	52
4.3.4	Vyhodnocení flowcytometrické analýzy	53
5	Analýza dat a výsledky	55
5.1	Věk pacientů	56
5.2	Pohlaví pacientů	57
5.3	Vzorky periferní krve pod mikroskopem	58
5.3.1	Přítomnost jednotlivých typů leukocytů	58
5.3.2	Množství blastů	59
5.4	Vzorky kostní dřeně pod mikroskopem	60
5.4.1	Přítomnost jednotlivých typů leukocytů	60
5.4.2	Množství blastů	61
5.5	Porovnání diferenciálního rozpočtu leukocytů a hodnot z flowcytometrie u vzorků periferní krve	62
5.6	Porovnání diferenciálního rozpočtu leukocytů a hodnot z flowcytometrie u vzorků kostní dřeně	63
5.7	Porovnání získaných hodnot u vzorků periferní krve a kostní dřeně	64
5.7.1	Porovnání počtu blastů při diagnostice	64
5.7.2	Porovnání směrodatných odchylek hodnot z mikroskopu a z flowcytometrie	65
6	Diskuze	67
6.1	Získané výsledky	67
6.1.1	Množství blastů a dalších typů leukocytů při diagnostice	67
6.1.2	Rozdíly v získaných hodnotách z mikroskopu a z flowcytometru	67
6.1.3	Směrodatné odchylky počtu blastů v periferní krvi a v kostní dřeni	67
6.2	Porovnání s podobnými výzkumy	68
6.3	Omezení provedeného výzkumu	68
6.4	Možné důsledky výsledků práce a využití v klinické praxi	69
6.4.1	Optimalizace diagnostiky akutní lymfoblastické leukémie u dětí	69
6.4.2	Upřednostnění flowcytometrie při hodnocení počtu a mikroskopie při hodnocení morfologie	69
6.4.3	Základ pro další navazující výzkumy	69
6.5	Návrhy do budoucna	70

6.5.1	Další diagnostické metody.....	70
6.5.2	Vzorek pacientů	70
6.5.3	Typ onemocnění.....	70
7	Závěr.....	71
8	Seznam použité literatury a internetových zdrojů.....	73
9	Seznam obrázků, grafů a tabulek	77
10	Dodatečné materiály	79

Seznam použitých zkratek

ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
BCR-ABL	fúze sekvence Abelsonova genu (ABL = Abelson tyrosine-kinase gene) a sekvence pro protein klastrové oblasti zlomu (BCR = breakpoint cluster region gene)
cCD (antigeny)	cytoplasmic cluster of differentiation
CD (antigeny)	cluster of differentiation
CLL	chronická lymfatická leukémie
CML	chronická myeloidní leukémie
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
FSC	forward scatter (přímý rozptyl)
FN Brno	Fakultní nemocnice Brno
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
KD	kostní dřev
MHC	major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilitní komplex)
NK (buňky)	natural killers
ODHB	Oddělení dětské hematologie a biochemie
PAS (barvení)	Periodic acid Schiff
Ph	Filadelfský chromozom
PK	periferní krev
RNA	ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
SSC	side scatter (boční rozptyl)
TCR	T-cell receptor (T-buněčný receptor)

cTdT	cytoplasmic terminal deoxynucleotidyl transferase (cytoplazmatická terminální deoxynukleotidyl transferáza)
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

Autorská poznámka

Mimo kapitoly věnující se jednotlivým typům leukémie je označení blast bráno jako synonymum pro lymfoblast s ohledem na téma této práce. Je samozřejmostí, že v jiném méně specifikovaném kontextu by se jednalo o omyl, jelikož jako blasty jsou označovány obecně nedospělá stádia (prekurzory) různých typů leukocytů.

Zároveň jsou, pokud není uvedeno jinak, všechny obrázky a fotografie v této práci dílem autora této práce.

1 ÚVOD

Leukémie je nádorové onemocnění postihující krevetvorbu pacienta a fyziologickou funkci jeho krevních buněk. První zmínky o leukémii se objevují v roce 1845 od vědců Johna Hughese Benneta a Rudolfa Virchowa, kteří tuto nemoc popsali nezávisle na sobě. Příznaky podobné těm, jež se vyskytují u pacientů s leukémií však byly popsány i hlouběji v historii. (Krahulová a Vorlíček, 1998)

Leukémie je vážné onemocnění a ročně podle GLOBOCAN 2022 a WHO je celosvětově diagnostikováno kolem 487 000 tisíc lidí (GLOBOCAN 2022, 2022). V závislosti na konkrétním typu nebere ohled na pohlaví, věk, ani původ a výrazně omezuje kohokoliv s touto nemocí bojujícího. Podlehli na ni a podobná onemocnění různé známé osobnosti jako Marie Curie-Sklodovská, Irène Joliot-Curie, Charles Bukowski, či Alan Shepard. (On This Day, bez roku) Případ každého diagnostikovaného pacienta je však unikátní a cílem vědy je zajistit, aby lidské životy zůstaly touto nemocí nepoznamenány.

Diagnostika je založena na vyšetření krevního obrazu. Na základě morfologie buněk dochází ke stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů v periferní krvi a v kostní dřeni. Počet leukocytů na základě specifických antigenů pak určuje metoda flowcytometrie a neméně důležité je vyšetření cytogenetické a molekulárně genetické.

V současné době probíhají výzkumy zabývající se zařazením umělé inteligence a neuronových sítí do rozpoznávání buněk v krevních vzorcích za využití morfologie přítomných buněk. Toto probíhá ovšem pouze v oblasti výzkumných laboratoří. Vzhledem k obrovské specifitě projevů leukémie u jednotlivých pacientů, především co se morfologie buněk týče, není aktuálně možné něco takového do klinické praxe zavést (vlastní myšlenka po konzultaci s odborníky z FN Brno).

Diagnostika leukémie jako taková je esenciální pro další léčbu pacienta. Nejen pro to si tato práce klade za cíl srovnání metod využívaných pro diagnostiku, a to konkrétně u dětských pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií. Chce zjistit, jaký je rozdíl v analýze a výsledcích vzorků při stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů pod mikroskopem a při zpracování vzorku flowcytometrem. Zjištěné výsledky by pak následně mohly přinést nové poznatky v této oblasti a též by mohly pomoci při optimalizaci použití těchto metod při diagnostice.

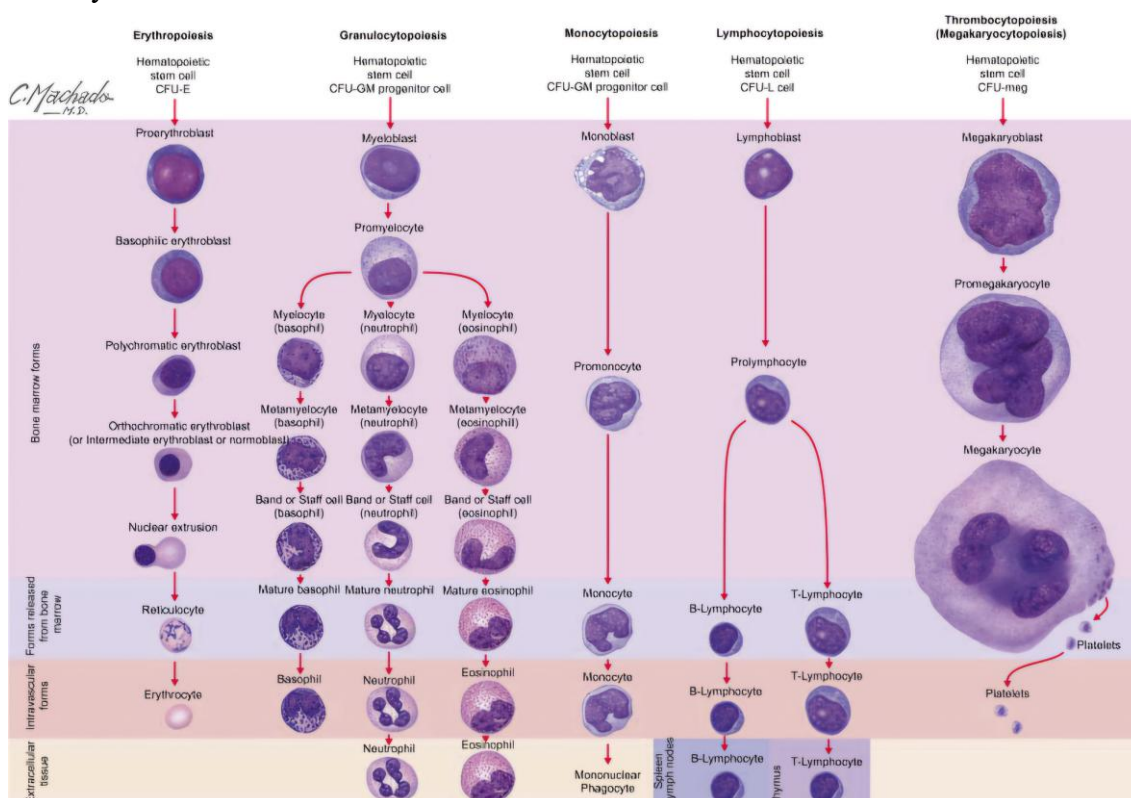
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hematopoéza

Samotný název pochází z řeckých slov haima- = krev a -poiesis = tvorba, v češtině tedy užívaný název krvetvorba. Jedná se o proces, při kterém dochází k diferenciaci krevních buněk. U lidí se často mluví o tzv. trilineární hematopoéze.

Před narozením probíhá v řadě tkání, od žloutkového vaku embrya po játra plodu, slezinu, lymfatické tkáně a nakonec červenou kostní dřeň. Po narození se hematopoéza většinou vyskytuje v červené kostní dřeni. Ta se u dětí může vyskytovat i v dlouhých kostech, v dospělosti je však přítomna pouze v kostech lebky, v pánevní kosti, v obratlích, v hrudní kosti a v proximálních epifýzách pažní a stehenní kosti.

Jednotlivé krevní elementy vznikají mitózou a následně cytokinezí z multipotentní hematopoetické kmenové buňky, neboli hemocytoblastu za působení hematopoetických růstových faktorů.



Obr. 1: Hematopoéza (zdroj: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/hematopoietic-tissue>)

2.1.1 Krev

Krev je tekutá tkáň tvořící významnou část našich organismů. Svými vlastnostmi umožňuje průběh neskutečného množství různých reakcí a dějů probíhajících v našich tělech.

Typické funkce krve v organismu jsou:

1. Transportní

Krev rozvádí dýchací plyny jako je kyslík a oxid uhličitý, různé živiny, minerální látky, či vitamíny.

2. Homeostatická

Krev zajišťuje stálou teplotu organismu, jež je esenciální pro obrovskou řadu procesů a udržuje biogenní molekuly v optimálním prostředí pro jejich fungování. Také se podílí na stabilizaci vnitřního objemu a onkotického tlaku (osmotický tlak způsobený bílkovinami) i pH prostředí, které je také důležité pro průběh různých reakcí.

3. Obranná

Krev vytváří prostředí pro imunitní reakce díky leukocytům, které zajišťují obranu vůči patogenům a jiným škodlivým faktorům.

Tekutost krve zajišťuje krevní plazma. Ta je asi z 91 % složena z vody, 7 % představují bílkoviny a zbylá 2 % tvoří různé anorganické (ionty) a organické látky (glukóza, cholesterol). Mimo to se v krvi nalézají tzv. krevní elementy. Sem se řadí erytrocyty neboli červené krvinky, leukocyty neboli bílé krvinky a trombocyty neboli krevní destičky.

2.1.2 Periferní krev

Jako periferní krev se označuje krev, která obíhá v cévách celého těla. Často se pojem periferní krev uvažuje jako protiklad ke kostní dřeni, v níž se také nachází krevní buňky. (ÚZIS ČR, bez roku) U pacientů s leukémií se tato nemoc často v periferní krvi promítne (u ALL je to například patologický výskyt nedospělých blastů) a její vyšetření je tak důležité pro diagnostiku pacienta.

Odběr periferní krve

Odběr periferní krve se zpravidla provádí z periferní žíly předloktí nebo předloketní jamky vzhledem k jejich lehké dostupnosti. Místo vpichu se vždy vydezinfikuje a odběr se provede za použití injekční jehly nasátím injekční stříkačkou nebo pomocí podtlaku do speciální odběrové zkumavky. (LF UPOL, bez roku) Ta je označena a dopravena na potřebné oddělení, či laboratoř k potřebným vyšetřením.

2.1.3 Kostní dřeň

Kostní dřeň je měkká houbovitá tkáň, kterou je možné nalézt uvnitř kostí. V kostní dřeni probíhá z hematopoetických kmenových buněk tvorba krevních elementů, leukocytů, erytrocytů a trombocytů, již se označuje jako hematopoéza. (ÚZIS ČR, bez roku) Vzhledem k tomu, že leukémie jsou poruchou hematopoézy, je analýza odebraných vzorků kostní dřeneš esenciální pro diagnostiku daného pacienta. Vyšetření kostní dřeneš obvykle navazuje na patologický nález v periferní krvi.

Odběr kostní dřeneš

Kostní dřeň pacientů je získávána při místním znecitlivění speciální jehlou, přičemž místo odběru se liší dle věku daného pacienta. Například odběr z pánevní kosti umožňuje jednak nasátí kostní dřeneš do stříkačky, jednak odběr válečku kostní dřeneš. U hrudní kosti je naopak možný pouze odběr kostní dřeneš do stříkačky. Místo odběru vždy volí lékař podle typu leukémie, na kterou má podezření. (Krahulová a Vorlíček, 1998)

2.1.4 Krevní elementy

Erytrocyty

Erytrocyty neboli červené krvinky jsou nejzastoupenější buňky naší krve. Vznikají z hematopoetické kmenové buňky procesem zvaným erytropoéza. Dospělé mají bikonkávní tvar, jsou bezjaderné a pružné. Ženy mají přibližně 4,5 milionů erytrocytů na mm^3 krve, muži více, a to asi 5,5 milionů na mm^3 . Průměr buněk se pohybuje kolem 7 až 8 μm . Jejich hlavním úkolem je přenášet molekuly kyslíku z plicních sklípků k ostatním buňkám daného organismu v podobě oxyhemoglobinu. Od těchto buněk také odnášejí část vzniklého oxidu uhličitého v podobě karbaminohemoglobinu zpět do plic. Jejich životnost je fyziologicky 100 až 120 dní a poté dochází k jejich rozpadu, hemolýze.

V erytrocytech jsou přítomny molekuly červeného krevního barviva hemoglobinu. Ten se skládá z celkem čtyř globulinových jednotek a hemu obsahujícího železo, jenž má zmiňovanou afinitu vázat molekuly kyslíku. (Betts et al., 2013) (SUNY OER Services, Anatomy & Physiology I & II – OLI, bez roku)

Trombocyty

Trombocyty neboli krevní destičky nejsou pravé buňky, ale pouze úlomky buněk megakaryocytů. Ty vznikají z hematopoetické kmenové buňky procesem megakaryocytopoézy a jejich průměr se pohybuje kolem 50–100 μm . Samotné krevní destičky pak vznikají tzv. trombocytopoézou. V jednom mm^3 krve se jich vyskytuje asi 200 až 300 tisíc a jejich životnost dosahuje deseti dní. Jejich průměr se pohybuje kolem 2–4 μm . Jejich primární funkcí je zástava krvácení, hemokoagulace. (Betts et al., 2013b) (SUNY OER Services, Anatomy & Physiology I & II – OLI, bez roku)

Leukocyty

Leukocyty neboli bílé krvinky jsou narození od ostatních zmíněných krevních elementů jaderné buňky. Tvar jejich jádra je navíc často poznávacím znakem pro určení jich typu. Nevyskytují se jen v krvi, ale i v míze, či v tkáňovém moku. Na jeden mm^3 krve je jich asi 5-8 tisíc. Vznikají z hematopoetické kmenové buňky procesem leukocytopoézy a jejich životnost se liší v závislosti na krevním typu. Jejich důležitou schopností je diapedeze neboli schopnost prostupovat do potřebných tkání mezi sousedními buňkami a také pozitivní chemotaxe, která zajišťuje to, že jsou leukocyty přitahovány do místa potřeby na základě chemického signálu. (Betts et al., 2013b) (SUNY OER Services, Anatomy & Physiology I & II – OLI, bez roku)

Leukocyty se dělí na dvě skupiny v závislosti na přítomnosti dobře pozorovatelných barvitelných granul v cytoplazmě:

a) Granulocyty (granulární leukocyty) s dobře pozorovatelnými granuly v cytoplazmě

Neutrofily jsou nejčastěji se vyskytující leukocyty v krvi a dosahují až 70 % celkového počtu leukocytů. Mají průměr 10-14 μm . Granula v jejich cytoplazmě jsou spíše světlá a na kyselá a bazická barviva reagují málo. Dospělé neutrofilní leukocyty mají segmentované jádro a označují se jako neutrofilní segmenty. Mimo to lze v krvi fyziologicky v minimálním množství nalézt i neutrofilní tyčky, které mají jádro ve tvaru rohlíčku. Neutrofily velmi rychle reagují na přítomnost infekce a mají schopnost fagocytózy. Ve svých granulích obsahují lysozym, enzym narušující buněčné stěny bakterií, peroxid vodíku, či proteiny zvané defenziny, které rozrušují plazmatické membrány bakterií a hub.

Eosinofily představují 2-4 % celkového počtu leukocytů. Jejich průměr se pohybuje okolo 10-16 μm . Jejich jádro je dvou až tří laločnaté. Jsou barvitelné kyselým barvivem a jejich granula se zbarvují do oranžovoružova. Zvýšený počet je typický při alergiích, nebo za přítomnosti parazitů v těle. Ve svých granulech obsahují látky jako je eosinofilní kationtový protein, eosinofilní peroxidáza, neurotoxin odvozený z eosinofilů, argininový a na zinek bohatý hlavní bazický protein, histamináza a aryl-sulfatáza.

Basofily jsou nejméně časté ze všech leukocytů a tvoří jich asi jen 1 %. Mají v průměru 10-12 μm . Jejich jádro je dvou laločné. Jsou barvitelné bazickými barvivy, přičemž jejich granula jsou poté tmavě modrofialová a překrývají téměř celou buňku. Obsahují protisrážlivý heparin a také histamin, jenž hraje roli při alergických reakcích.

b) Agranulocyty

Lymfocyty jsou druhým nejčastějším typem leukocytů a tvoří 20-30 % celkového počtu. Vznikají v kostní dřeni, ale velká část jejich vývoje probíhá v lymfatických tkáních. Často mají průměr okolo 8-12 μm , ale mohou být i větší. Mají jádro kulovitého tvaru. Obvykle se člení na tři typy. NK buňky jsou schopné detekovat látky na plazmatické membráně buněk a rozpoznat tak rakovinné buňky, buňky infikované virem, nebo další buňky s atypickými povrchovými proteiny. Představují tak nespecifickou imunitu organismu. Většinou se jedná o lymfocyty větších velikostí. Lymfocyty menších velikostí jsou pak B-lymfocyty a T-lymfocyty. B-lymfocyty zajišťují specifickou látkovou imunitu. Dospívají v kostní dřeni. T-lymfocyty zajišťují specifickou buněčnou imunitu a dospívají v brzlíku. B-lymfocyty i T-lymfocyty stojí za tvorbou tzv. paměťových buněk po setkání s určitým patogenem a zajišťují tak rychlou imunitní reakci. Větší množství jich bývá při virových infekcích.

Monocyty jsou největší z leukocytů a mají průměr asi 15-22 μm . Představují asi 2-8 % celkového počtu leukocytů. Mají zahnuté jádro s laloky. V jejich cytoplazmě se vyskytují jemná světlá granula obsahující lysozomální enzymy a peroxidázy. Makrofágové jsou potom ty monocyty, které se z krve dostaly do tkání, kde pohlcují různé zbytky, cizí patogeny, opotřebované erytrocyty a mnoho dalších buněk, které již neplní svou funkci.

2.2 Leukémie

Leukémie je onemocnění krvetvorby postihující kostní dřeň pacienta a jeho krevní buňky. Dochází k nadměrnému množení některých stádií bílých krvinek a v důsledku toho je potlačena tvorba jiných krevních elementů v kostní dřeni. U pacientů mohou nastat různé situace jako je například trombocytopenie, anémie, leukocytopenie, či leukocytóza. Průběh je u jednotlivých pacientů rozdílný a závisí nejen na typu leukémie, se kterou je diagnostikován, ale i na mnoha dalších faktorech včetně fyzického a psychického zdraví. (Krahulová a Vorlíček, 1998) (Chennamadhavuni et al., 2025)

2.2.1 Typy leukémií

Leukémie lze dělit nejprve dle rychlosti nástupu a délky trvání (průběhu) na akutní a chronické. Akutní onemocnění je obecně to, jenž má rychlý nástup a též poměrně rychlý průběh. Pacient pak často bez léčby nemoci rychle podléhá. Chronické onemocnění naopak nastupuje pomaleji a také déle trvá. Často je odhaleno mnohem později, než se v těle pacienta objeví.

U akutních forem leukémie se abnormálně množí tzv. blasty, tedy nedospělá stadia leukocytů, která se množí velmi rychle. U chronických leukémií se množí buňky zralejší, které proliferují pomaleji (než např. blasty) a i proto se u pacientů příznaky objevují později.

Dále je možné leukémie dělit podle toho, jaké z krevních buněk jsou postiženy. U myeloidních leukémií jsou zasaženy myeloidní buňky, z nichž poté diferenciací vznikají erytrocyty, trombocyty, či granulocyty a monocyty. Lymfatické leukémie se charakterizují změnou při diferenciaci lymfoidních buněk, ze kterých fyziologicky vznikají lymfocyty. Specifických typů a podtypů je teoreticky nespočet, mezi čtyři hlavní typy leukémií se však řadí tyto:

- I. Akutní myeloidní leukémie (AML)
- II. Chronická myeloidní leukémie (CML)
- III. Akutní lymfoblastická leukémie (ALL)
- IV. Chronická lymfatická či lymfocytární leukémie (CLL)

Akutní myeloidní leukémie (AML)

Jedná se o poruchu hematopoézy charakteristickou proliferací a hromaděním nezralých myeloidních prekurzorů, myeloblastů, v kostní dřeni i v periferní krvi, odkud se často šíří i dále do těla. Jedná se o nejčastější z akutních leukémií u dospělých pacientů. Postihuje

pacienty spíše ve vyšším věku, přičemž průměrný věk při diagnóze je asi 68 let. Častěji pak tento typ leukémie postihuje muže. (Yale Medicine, bez roku)

Chronická myeloidní leukémie (CML)

Jinak se také označuje jako chronická granulocytická či myelocytická leukémie. U pacientů dochází k tomu, že určitá změna v genomu vede k tvorbě abnormálního genu BCR-ABL¹. V tomto případě se začnou myeloidní prekursorové nekontrolovaně dělit, což vede k projevům CML. Diagnóza bývá zpravidla stanovena ve věku kolem 65 let, u pacientů dětského věku je vzácná. Častější je u mužů. (Yale Medicine, bez roku)

Akutní lymfoblastická leukémie (ALL)

U pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií nastává onemocnění hematopoézy, při němž buňky lymfoidní linie přicházejí o schopnost diferenciaci. Dochází tak k abnormálnímu dělení lymfoidních prekursorů, lymfoblastů. Existují dva hlavní podtypy ALL, které se rozlišují podle postiženého typu lymfocytů. U B-lymfocytů se jedná o B-ALL, u T-lymfocytů T-ALL. B-ALL představuje přibližně 85 % dětských případů ALL a 75 % případů dospělých. T-ALL pak tvoří asi 15 % případů u dětí a 25 % případů u dospělých. ALL může být také rozlišována podle přítomnosti nebo nepřítomnosti genetické změny, tzv. Filadelfského chromozomu, jenž může prognózu pacienta ovlivňovat. Podtypy vzhledem k tomuto hledisku se pak označují jako Ph⁺ a Ph⁻. Nejvíce se objevuje u dětských pacientů ve věku do 5 let, kdy mají pacienti i nejlepší prognózu. U dospělých je méně častá. V o něco větším množství se projevuje u mužů. (Yale Medicine, bez roku)

Chronická lymfatická či lymfocytární leukémie (CLL)

Tento typ chronické leukémie je typický abnormálním dělením a poruchou apoptózy zralých B lymfocytů. Tyto nemocné a poškozené buňky se poté hromadí v krvi pacientů, jejich kostní dřeni, lymfatických uzlinách, játrech a slezině, kde často způsobují různé komplikace. Jedná se o nejčastěji diagnostikovanou leukémii u dospělých a její výskyt je hojný u starších pacientů kolem 70 let a více. (Yale Medicine, bez roku)

2.2.2 Příčiny vzniku leukémie

Jasně příčiny vzniku leukémie nejsou známy, ale předpokládá se, že se ve většině případů jedná o kombinaci několika faktorů. Část je pravděpodobně dána geneticky, a tedy lidé s rodinnými příslušníky postiženými leukémií mají též pro vznik leukémie jistou

¹ Chromozomy 9 a 22 v průběhu hematopoézy navzájem vymění část svých genetických informací. Když u chromozomu 22 dochází k takovéto změně, označuje se jako Filadelfský chromozom. Jeho přítomnost potvrzuje výskyt CML. Zmíněná výměna pak vede k vytvoření nového genu, BCR-ABL. Tento gen produkuje tyrosin-kinázový protein, který indukuje nekontrolované dělení granulocytů.

predispozici. Nejedná se však o přímo prokázanou skutečnost. Výrazně vznik leukémie ovlivňují také vnější faktory, tedy okolní prostředí. Zvýšené riziko představuje především ionizující záření, styk s různými chemikáliemi, jako je typicky benzen, či podstoupení chemoterapie. Mimo to se ukázalo, že lidé mající určité genetické syndromy nebo chromozomální abnormality, jako je Downův syndrom a trisomie chromozomu 8, se s různými typy leukémie též léčí častěji. Jsou případy, kdy se leukémie objeví u pacienta, který byl již v minulosti léčen pro jiné nádorové onemocnění. (Pfizer, bez roku) Na vzniku některých případů CLL a ALL u dospělých pacientů se spolupodílejí onemocnění imunity a prodělané virové infekce. (Chennamadhavuni et al., 2025)

2.3 Diagnostika leukémií a používané metody

K diagnostice dochází v případě, že se u daného pacienta projeví některé z příznaků, které mohou být pro leukémii typické. Je třeba dávat si pozor především na bolest, horečky a zimnice, nevysvětlitelný úbytek na váze, noční pocení, nevolnost a také na snadné děláni jizev, či větší krvácení i z drobných ranek. Často je ale leukémie, především na začátku, asymptomatická.

Diagnóza se provádí nejprve analýzou krevního obrazu pomocí hematologického analyzátoru. Při objevení jakýchkoli nesrovnalostí či podezření na přítomnost patologií je nutné krevní vzorky pacienta dále přezkoumat. To probíhá za stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů pod mikroskopem, a to primárně v periferní krvi a v případě nefyziologického nálezu v odebrané kostní dřeni. Další z používaných metod pro diagnostiku je flowcytometrie, jejíž výhodou je ještě větší přesnost přezkoumání vzorků a možnost stanovení konkrétního typu leukémie podle různých stádií leukocytů zde přítomných. Velmi důležitou roli v diagnostice hrají i vyšetření cytogenetická a molekulárně genetická, která mnohonásobně zpřesňují diagnózu daného pacienta.

2.3.1 Hematologický analyzátor

Při zpracování práce hematologický analyzátor přímo využit nebyl, jelikož práce se věnuje až těm metodám, které se využívají k diagnostice leukémie přímo. Hematologický analyzátor je však prvním krokem při analýze krevních vzorků a dává tak primární informaci o tom, zdali je odebraný vzorek fyziologický.

Postup práce s hematologickým analyzátozem:

1. do analyzátoru se vkládají celé zkumavky (ty se před vložením musejí označit nálepkou s číslem a s čárovým kódem)
2. zkumavka zajede do analyzátoru a přístroj si přečte čárový kód (aby věděl, o jakého jde pacienta)

3. analyzátor zkumavku promíchá a začíná daný vzorek diferencovat (zaznamenává počty a roli pro něj hraje velikost buněk i jejich morfologie)
4. analyzátor kontroluje i množství hemoglobinu, nebo např. jestli nejsou ve vzorku přítomny shluky; některé části krve pak lze i barvit fluorescenčními barvami (typicky trombocyty)
5. nehlásí-li analyzátor problém, nebo není-li vzorek třeba překontrolovat pod mikroskopem, odesílá se výsledek na příslušné oddělení
6. pokud naopak hematologický analyzátor nahlásí problém, či nějakou patologii (monocytóza neboli zvýšené množství monocytů, trombocytopenie neboli snížené množství trombocytů apod.), krevní vzorek je třeba dále analyzovat, např. pod mikroskopem

Výhody použití hematologického analyzátoru:

- rychlost zpracování vzorků
- komplexnost zpracování
- spočítání a celková analýza většího množství buněk než u analýzy vzorku pod mikroskopem
- menší potřeba specializace pro práci s ním

Nevýhody použití hematologického analyzátoru:

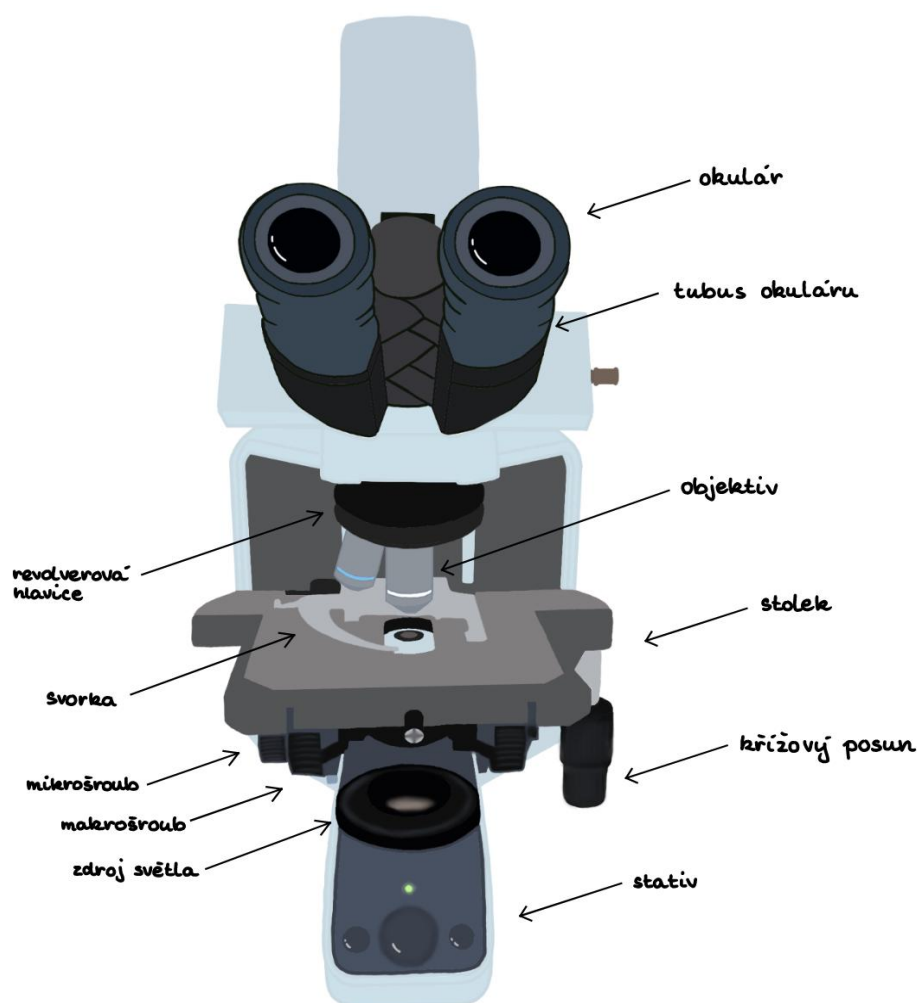
- není známá morfologie buněk
- může dojít k mylné diagnóze – typicky pseudotrombocytopenie, kdy analyzátor nepozná, jestli je ve vzorku malé množství trombocytů, nebo sraženiny

2.3.2 Mikroskopování krevního vzorku

Analýza krevního vzorku zpravidla následuje po analýze hematologickým analyzátozem. Tento krok je velmi důležitý, jelikož pohled na morfologii buněk ve vzorku přináší při diagnostice pacienta další informace o jeho zdravotním stavu. Zkušený morfologové často pouze z pohledu na buňky dokážou odvozovat obrovské množství užitečných informací, které hematologický analyzátor není schopen podat.

Princip světelné mikroskopie

Mikroskop je optický přístroj určený k pozorování velmi malých objektů, jejichž velikost se pohybuje pod rozlišitelností pouhým okem. Optická soustava mikroskopu se skládá z celkem dvou spojných čoček. První ze spojných čoček má malou ohniskovou vzdálenost, je blíže k pozorovanému objektu a nazývá se objektiv. Druhá ze spojek má větší ohniskovou vzdálenost, leží v blízkosti oka a označuje se jako okulár.



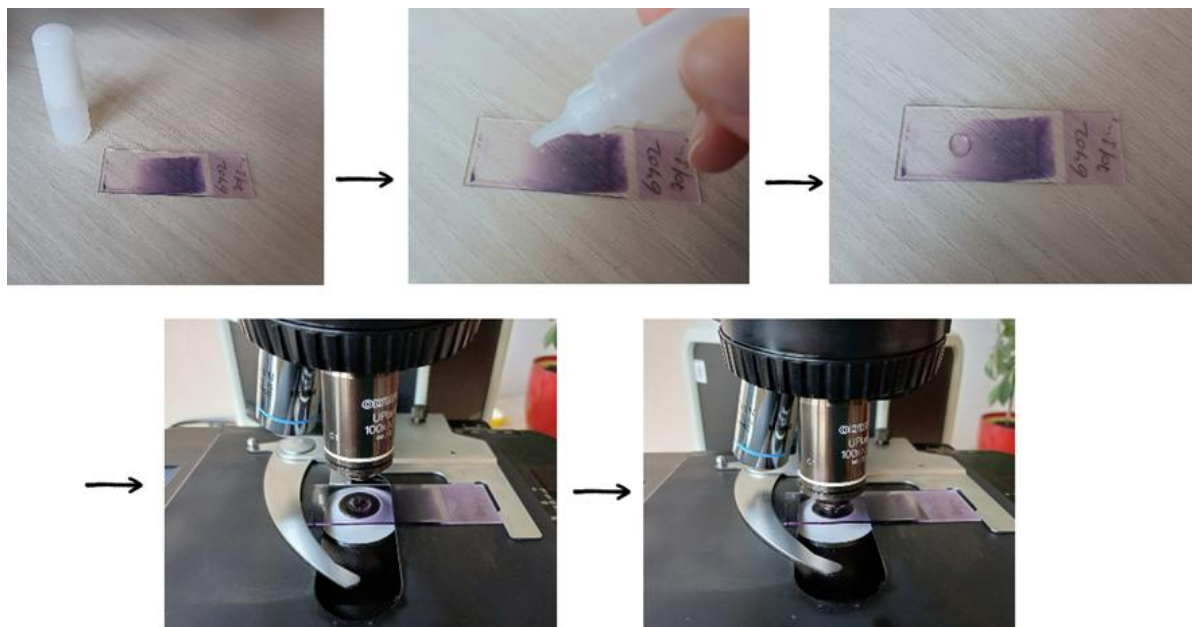
Obr. 2: Popis mikroskopu (zdroj: autor)

Pozorovaný předmět se umístí v blízkosti ohniska objektivu, přičemž objektiv poté vytvoří skutečný, převrácený a zvětšený obraz. Mikroskop je konstruován tak, aby se tento vzniklý obraz nacházel v oblasti ohniska okuláru. Okulár tak funguje jako lupa, kterou si pozorovatel může prohlížet obraz vytvořený objektivem. (Tarábek et al., 2006)

Světelná mikroskopie je jedním z nejjednodušších typů optické mikroskopie. Světlo ze světelného zdroje mikroskopu, který bývá zpravidla umístěn přímo pod vzorkem, prochází vzorkem a je zachyceno nad ním umístěným objektivem. Kontrast pozorovaného vzorku je poté generován absorpcí světla v hustějších oblastech vzorku. (Wang a Fang, 2012)

Princip mikroskopie s imerzním olejem

Imerzní olej se používá ve světelné mikroskopii k vylepšení zobrazení pozorovaného vzorku. Využití imerzního oleje jako součásti optického systému mikroskopu zajišťuje jasnější a ostřejší obraz, než kdyby imerzní olej při pozorování vzorku využit nebyl.



Obr. 3: Mikroskopování s imerzním olejem (zdroj: autor)

Důvodem je to, že imerzní olej odstraní všechny vzduchové bublinky a mezery mezi kondenzorem a spodní částí sklíčka a mezi horní částí sklíčka a čočkou objektivu médiem, jež má index lomu rovný nejnižšímu indexu lomu těchto komponentů mikroskopu ze skla. K mikroskopování s imerzním olejem je vždy třeba využít imerzní objektiv, který je k tomuto typu mikroskopie uzpůsoben. Ten je také potřeba od imerzního oleje pravidelně čistit, aby se na něj nezachytával prach a nesnižoval kvalitu zobrazení vzorku. (Sacher 2000)

Výhody mikroskopie při analýze krevních vzorků:

- pod mikroskopem lze vidět morfologii jednotlivých buněk (zda jsou reaktivní, mají granula, vakuoly či jak vypadá jejich jádro)
- je možné objevit i věci, které např. v diagnóze nebyly předpokládány – abnormální množství buněk apod.

Nevýhody mikroskopie při analýze krevních vzorků:

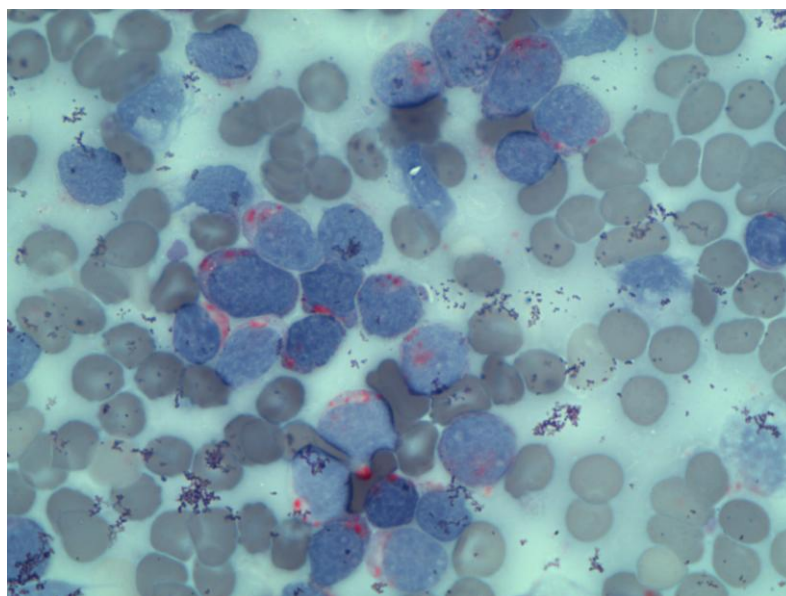
- relativně časově náročná metoda
- člověk musí být poměrně specializovaný a kvalifikovaný – pro vyhodnocení vzorků je třeba znát morfologii mnoha typů buněk
- roli zde hraje lidská chyba – ne vždy je jednoduché stanovit, o který typ leukocytu se jedná

2.3.3 Cytochemická vyšetření

Při cytochemickém vyšetření vzorku je možné použít různé typy chemikálií, které svou reakcí se vzorkem dokazují vlastnosti specifické pro určité druhy leukocytů. Výsledek daných chemických reakcí je pak viditelný pod světelným, nebo elektronovým mikroskopem podle použité látky. Velmi rozšířená byla tato vyšetření především dříve a v dnešní době jsou z velké části vytlačena metodou flowcytometrie, jež je v tomto ohledu velmi přesná a rychlá. Přesto se některá z následujících činidel používají doposud, a to konkrétně především myeloperoxidáza.

Kyselá fosfatáza

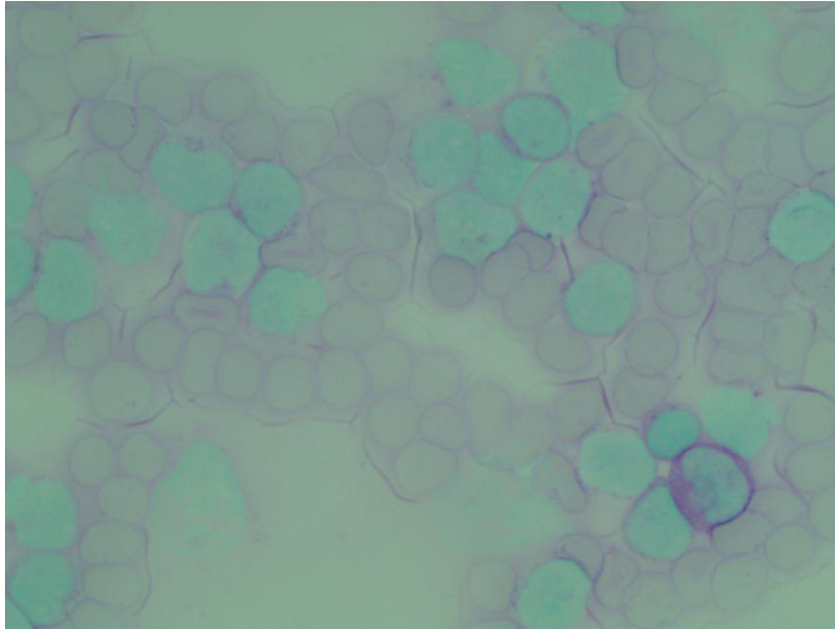
Jedná se o lysozomální enzym fyziologicky se nacházející v lymfocytech, monocytech, makrofázích a megakaryocytech. V klinické praxi je využívána k bližší klasifikaci lymfoproliferativních onemocnění. Významnější pozitivita je typická u T-lymfoblastických leukémií a při diagnostice ALL je tak používána k rozlišení mezi T-lymfoblastickou a B-lymfoblastickou leukémií.



Obr. 4: Vzorek s kyselou fosfatázou (zdroj: atlas ODHB FN Brno)

PAS

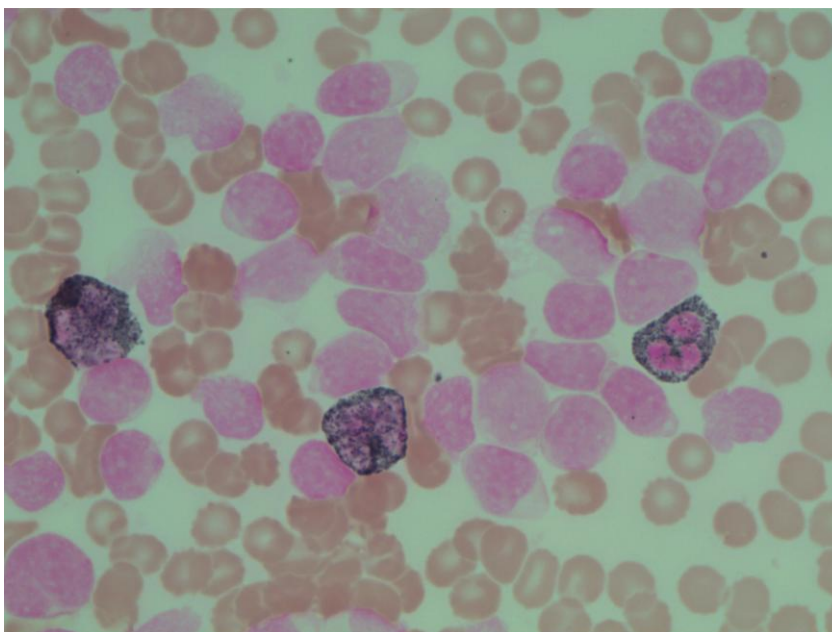
PAS reakce se využívají k cytochemickému průkazu látek jako je glykogen a jemu podobné v cytoplazmě krevních elementů. Při diagnostice ALL se využívají především k odlišení T-lymfoblastické a B-lymfoblastické leukémie – lymfoblasty vycházející z B-lymfocytů mají charakteristicky jemná až hrubá zrna.



Obr. 5: Vzorek s PAS (zdroj: atlas ODHB FN Brno)

Myeloperoxidáza

Myeloperoxidáza je lysozomálním enzymem, jenž je přítomný v primárních (azurofilních) granulích neutrofilů a monocytů. Pozitivní myeloperoxidázová reakce se ve vzorcích projevuje hnědým až černým zbarvením. V klinické praxi je důležitá pro podrobnější diagnostiku myeloidních leukémií a pomáhá rozlišit mezi ALL a AML – ALL má negativní nález, zatímco AML má nález pozitivní. (Pecka et al., 2010)



Obr. 6: Vzorek s myeloperoxidázou (zdroj: atlas ODHB FN Brno)

2.3.4 Flowcytometrie

Flowcytometrie je další z metod využívaných při analýze krevních vzorků. V oblasti hematologie se využívá zpravidla při podezření na vážnější patologické stavy pacientů, jako jsou například různé typy leukémií.

Princip flowcytometrie

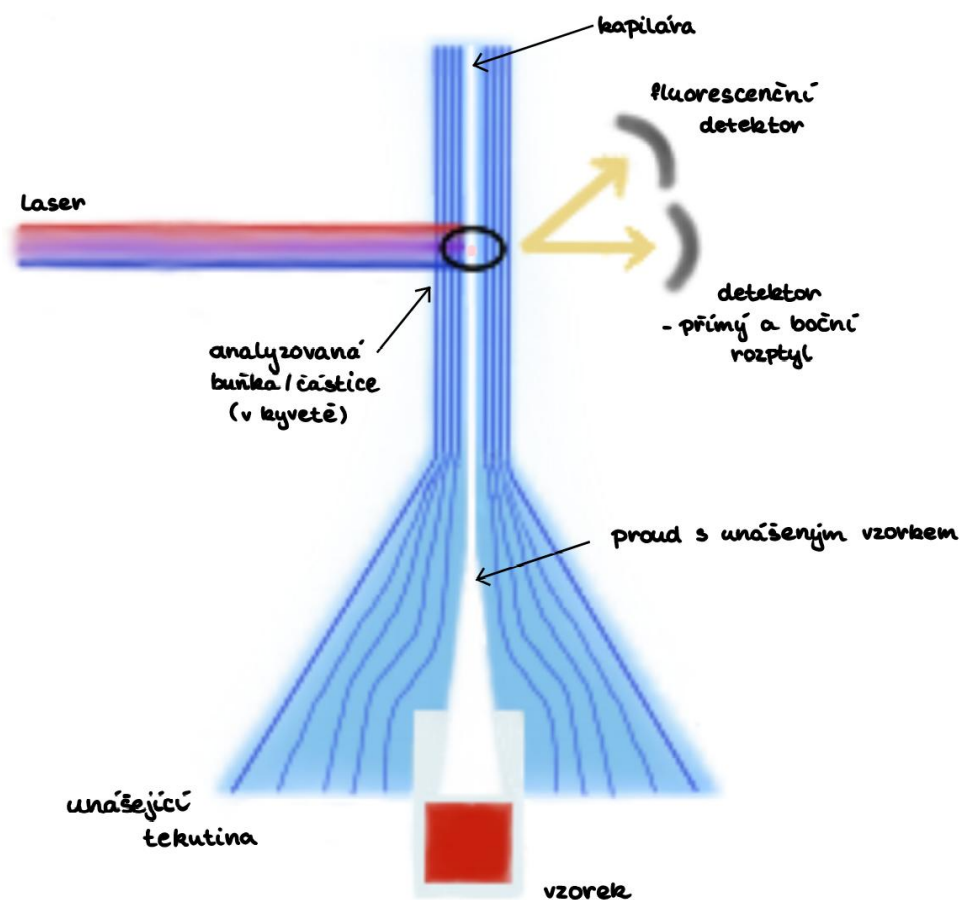
Na povrchu jednotlivých buněk jsou exprimovány různé molekuly, které se označují jako CD antigeny². Právě těmi se různé typy krevních buněk a jejich vývojová stadia liší. Přesně toho se pak využívá ve flowcytometrii po navázání příslušných monoklonálních protilátek³ s fluorochromy⁴ na tyto antigeny. Vložený vzorek je vháněn ústím do přístroje a je veden kapilárou do kyvety. Projití pouze jedné buňky v jednom časovém okamžiku je umožněno tzv. hydrodynamickou fokusací. Ta vzniká rozdílem tlaků ve vzorku (respektive kapiláře) a v tzv. unášející tekutině.

² Antigeny jsou molekuly exprimované na povrchu buněk.

³ Monoklonální protilátky jsou protilátky stejného typu („klony”); každý typ se specificky váže na jeden konkrétní typ antigenu.

⁴ Fluorochrom je fluorescenční barvivo schopné se vázat na určité látky.

Jakmile se buňka dostane do kyvety, může dojít k jeho analýze. Na úrovni kyvety se nachází zpravidla několik laserů. Ty jsou namířeny na procházející buňky a způsobují po jejich expozici emisi fotonů.



Obr. 7: Princip flowcytometrie (zdroj: autor)

Emitované fotony jsou poté zaznamenávány detektory, různými komplexy čoček, zrcadel a filtrů. Je tak možné zaznamenat jednak antigeny dané buňky (pomocí zachycené fluorescence), jednak i částečnou morfologii buňky. Tou je v případě flowcytometrie myšlena přítomnost granul v cytoplazmě, či tvar a fragmentace jádra dané buňky a její velikost. Flowcytometry totiž zaznamenávají i přímý (forward scatter, FSC) a boční rozptyl (side scatter, SSC), což jsou hodnoty vypovídající o lomu světla na daném „povrchu“ a intenzitě odražených paprsků. Pro uvedení příkladu jsou naměřené hodnoty vyšší právě u buněk s větší granulací, či u buněk s více fragmentovaným jádrem. (McKinnon 2018)

Výhody použití flowcytometrie:

- zanalyzuje až 50 000 buněk ve vzorku za zlomek času
- rychlost analýzy vzorku
- přesnost
- rozlišení i těch buněk, které morfologicky vypadají velmi podobně – B-lymfocyty a T-lymfocyty; lymfocyty a lymfoblasty

Nevýhody použití flowcytometrie:

- není známá morfologie buněk (např. jak vypadají jejich jádra)
- poměrně drahé (jedna analýza se pohybuje kolem 7 až 10 tisíc)
- záměna některých buněk (blasty za bazofily⁵; patologické klonální lymfocyty za nepatologické⁶), ale max. v 1 % případů

2.3.5 Cytogenetická a molekulárně genetická vyšetření

Cytogenetické vyšetření zahrnuje testování vzorků tkáně, krve nebo kostní dřeně v laboratoři, za účelem hledání změn v chromozomech, včetně jejich zlomených, chybějících, přeskupených nebo nadbytečných částí. Právě změny v určitých chromozomech mohou signalizovat výskyt rakovinného onemocnění. Cytogenetika může být použita k diagnostice onemocnění nebo stavu, plánování léčby nebo zjištění toho, jak dobře léčba funguje. (National Cancer Institute, 2011)

Molekulárně genetická vyšetření jsou též zásadní při hodnocení stavu pacienta. Genotypizace může poskytnout cennou diagnózu onemocnění, prognózu a ukazatele progresu, pomoci ke správnému výběru léčby a identifikovat genově specifické terapeutické cíle. Mnoho genetických testů může analyzovat změny genů, chromozomů a proteinů. Odborník při výběru vhodného testu často musí zvážit několik faktorů, včetně podezřelých stavů a jejich možných genetických variací. Molekulární testy se zaměřují na změny v jednom, nebo více genech. Tyto testy analyzují sekvenci nukleotidů v genetickém kódu jedince. (Ishida et al., 2025)

⁵ V tomto případě lze leukocyty dofenotypovat. Záměna tedy zpravidla nenastává.

⁶ Toto může nastat v případě, že jich je malé množství a vyskytují se ve vzorku i fyziologické lymfocyty.

Zkoumané genetické abnormality při diagnostice ALL (Hoffbrand et al., 2006)

Typ leukémie	Genetická abnormalita	Zapojené onkogeny
Prekurzorová ALL B-linie	t(12;21)	TEL, AML1
	t(4;11)	AF4, MLL (ALL1, HRX)
	t(9;22)	ABL, BCR
	t(1;19)	PBX-1, E2A
	hyperdiploidie	
	hypodiploidie	
B-ALL	t(8;14)	MYC na IgH lokus
	t(2;8)	MYC na IgK lokus
	t(8;22)	MYC na Igλ lokus
T-ALL	t(1;14)	TAL-1 na TCRδ lokus
	t(8;14)	MYC
	t(11;14)	RBTN-1 nebo RBTN-2
	t(7;9)	TAL-2 na TCRβ lokus

Tab. 1: Nejčastější genetické abnormality u ALL

2.4 Léčba leukemií

Leukémie je možné léčit několika typy léčeb či jejich kombinacemi. Vždy záleží na konkrétní diagnostice pacienta, jeho fyzickém stavu a mnoha dalších faktorech, které utváří unikátní přístup k léčbě. Níže jsou zmíněné nejčastěji využívané typy léčby leukemií.

2.4.1 Chemoterapie

Cytotoxická terapeutika, či cytostatika jsou látky, jejichž účelem je cílit na rychle se proliferující rakovinné buňky. Vzhledem k jejich nekontrolovatelnému dělení, účinkují chemoterapeutika často na buněčný cyklus daných buněk. Způsobují destabilizaci DNA, poškození struktury DNA, inhibují syntézu DNA a RNA, ovlivňují funkce tubulinu jakožto i správné fungování dělicího vřeténka, čímž dochází k zastavení dělení buňky. Mezi sekundární účinky patří i ovlivnění biogeneze mitochondrií, či produkce kyslíkových radikálů.

Cytostatika je nutné podávat ve speciálních kombinacích a předem stanovených časových rozestupech, aby byl maximalizován jejich účinek. Chemoterapeutika jsou většinou podávána intravenózně a někdy (u ALL) i intratekálně, tedy do mozkomíšního moku. Existují ale i ve formě tablet. Chemoterapie probíhá v opakujících se několikadenních cyklech podle stavu a diagnózy pacienta. (Krahulová a Vorlíček, 1998)

2.4.2 Cílená terapie

Cílená terapie je v dnešní době používána stále častěji vzhledem ke své specifické účinku na rakovinné buňky. Používaná terapeutika jsou vždy volena s ohledem na genetické vyšetření pacienta a jeho diagnózu. Existuje jich nepřeberné množství s různými účinky, nejčastěji těmi cytotoxickými na rakovinné buňky. U leukemických pacientů s Filadelfským chromozomem se například využívají terapeutika zvaná inhibitory tyrosinkinázy, které napadají protein vznikající při přepisu genetické informace z abnormálního genu BCR-ABL, viz výše. Cílená terapie může také cílit třeba na povrchové antigeny abnormálně se proliferujících buněk. (American Cancer Society, 2024b), (Salvaris a Fedele, 2021)

2.4.3 Radioterapie

Radioterapie využívá vysokoenergetické částice nebo vlny, jako jsou typicky rentgenové paprsky, gama paprsky, elektronové paprsky nebo protony, ke zničení nebo poškození rakovinných buněk. Použité záření funguje tím způsobem, že uvnitř rakovinných buněk dělá malé zlomy v DNA. Tyto zlomy pak znesnadňují rakovinným buňkám v růstu a dělení a často vedou i k jejich smrti. Radiační terapie je obvykle lokální léčba a ovlivňuje tak pouze tu část těla, na niž má být léčba cílená. Radiační léčba je plánována tak, aby poškodila rakovinné buňky s co nejmenším poškozením blízkých zdravých buněk. Určitý typ radioterapie může využívat i radioaktivní látky, které se podávají do žíly nebo ústy a opět cílí na rakovinné buňky pacienta. (American Cancer Society, 2024a)

2.4.4 Imunoterapie

Imunoterapie je léčba, která využívá určité části imunitního systému daného pacienta k boji s rakovinnými buňkami. Může fungovat několika různými způsoby. Imunoterapie často stimuluje nebo posiluje přirozenou obranyschopnost imunitního systému, což vede k efektivnějšímu vyhledávání abnormálních rakovinných buněk či k jejich silnějšímu napadení a poškození. Mimo to je možná i tvorba různých látek v laboratořích, které jsou následně využity k obnovení, nebo zlepšení fungování imunitního systému, opět při hledání a napadení rakovinných buněk. (American Cancer Society, 2019)

2.4.5 Transplantace kostní dřeně

Transplantace kmenových buněk se používají k náhradě buněk kostní dřeně, které byly zničeny rakovinou nebo chemoterapií či radioterapií v průběhu léčby pacienta. Existují různé druhy transplantací kmenových buněk. Všechny tyto druhy ovšem využívají velmi vysoké dávky terapeutik k zneškodnění rakovinných buněk. To často vede k poškození všech buněk kostní dřeně, což má za následek úplné zastavení krvetvorby. Transplantované kmenové buňky tak přinášejí možnost, jak krvetvorbu u pacienta obnovit. (American Cancer Society, 2020)

Transplantace se pak vždy liší podle dárce, přičemž se rozlišují tyto typy:

- syngenní – dárce kmenových buněk je jednovaječné dvojče pacienta
- alogenní – dárce kmenových buněk je jiná osoba
 - příbuzenská (dárce je příbuzný pacienta, nejčastěji sourozenec)
 - nepříbuzenská (dárce je vyhledáván v registru dárců kostní dřeně)
- autologní – pacientovi jsou transplantovány vlastní krvetvorné buňky, které od něj byly získány před podáním vysokodávkové terapie a do doby použití byly zamraženy (Krahulová a Vorlíček, 1998)

3 CÍLE PRÁCE

V současné době se k diagnostice leukémií u dětí využívá hned několik různých metod, z nichž každá má své výhody a nevýhody. Jmenovitě lze zmínit stanovení diferenciálního rozpočtu pod mikroskopem a metodu flowcytometrie, které byly porovnávány v této práci. Diagnostika všech nemocí se stále posouvá dopředu, a to především s rozvojem přístrojové techniky. Mnohdy se tak některé metody využívají nadbytečně, jelikož z jejich použití neplynou rozšiřující poznatky a jen zbytečně snižují kapacitu laboratoří a zdravotnických pracovníků. Nejen tomuto tématu se ale chce práce věnovat.

Tato práce si stanovuje:

1. hlavní cíl

- porovnat metody analýzy krevních vzorků využívaných při diagnostice ALL za pomoci srovnání počtu lymfoblastů ve vstupních vzorcích periferní krve a kostní dřeně za využití stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů pod mikroskopem a metody flowcytometrie

2. vedlejší cíle

- naučit se mikroskopovat s imerzním olejem vzorky periferní krve a kostní dřeně
- osvojit si schopnost rozpoznat jednotlivé typy krevních buněk fyziologicky přítomné v periferní krvi pod mikroskopem (u zdravých pacientů)
- naučit se rozpoznat lymfoblasty ve vzorcích periferní krve a kostní dřeně
- naučit se stanovovat diferenciální rozpočet leukocytů ve vzorcích periferní krve a kostní dřeně
- vytvořit brožurku/bulletin pro pozorování periferní krve pod mikroskopem (pro studenty lékařských fakult)

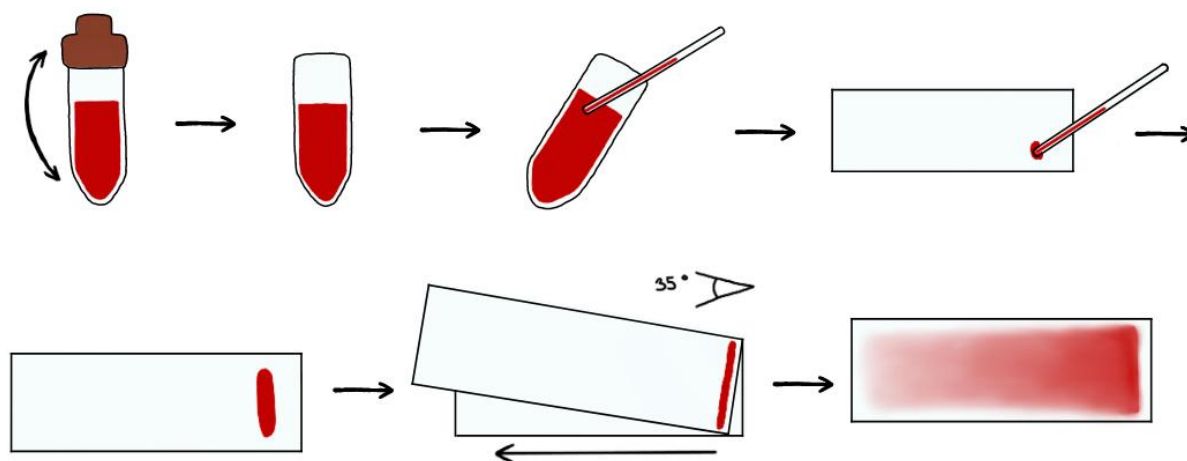
4 METODIKA

4.1 Krevní nátěr

Krevní nátěry vznikají za účelem možnosti daný krevní vzorek zanalyzovat pod mikroskopem. Po jeho zhotovení následuje barvení vzorku. Krevní nátěr lze zhotovit buď ručně (postup viz níže), nebo pomocí automatu.

Postup

1. nejprve zamíchat krev ve zkumavce (ne protřepat, zkumavka se obrací, aby nedošlo k poškození buněk)
2. otevřít zkumavku
3. do skleněné trubičky nabrat krev (musí se mírně naklonit, nateče tam sama)
4. kapku krve umístit na sklíčko (tyčinkou na sklo netlačit moc, aby se nepoškodily buňky ve vzorku)
5. přiložit hranu roztíracího sklíčka ke kapce krve, počkat, až se rozprostře
6. pod úhlem asi 35° krev rozetřít po podložním sklíčku (je třeba mírně zatlačit)
7. je-li krev správně rozprostřena od nejhustší části po tu nejřidší, je vzorek hotový



Obr. 8: Krevní nátěr (zdroj: autor)

4.2 Mikroskopování krevního vzorku

4.2.1 Barvení krevního vzorku

K barvení sklíček se vzorky se využívá tzv. panoptická Pappenheimova metoda. Ta umožňuje stanovit rozpočet buněk, konkrétně leukocytů, periferní krve a kostní dřeně daného pacienta. Jedná se o proces, v němž se k barvení využívá celkem dvou odlišných barviv. Prvním z nich je May-Grünwald, druhým Giemsa – ta se také před použitím narozdíl od prvního barviva zpravidla musí ředit (v poměru asi 1: 29).

Barvivo May-Grünwald barví acidofilní buňky a neutrofilní granulaci leukocytů. Barvivo Giemsa oproti tomu charakteristicky zabarvuje cytoplazmu lymfocytů a monocytů a také chromatin jádra.

V laboratořích se nyní nejčastěji využívá automatizovaná metoda barvení, a to za pomoci „samobarvicího přístroje“ (HEMA AUTO STAINER).



Obr. 9: HEMA AUTO STAINER ~ přístroj pro barvení krevních vzorků (zdroj: autor)

Tento přístroj má uvnitř hned několik pozic na otočné ploše a dokáže tak efektivně obarvit více vzorků najednou. K přístroji jsou pomocí plastových hadiček připojené lahve s barvivem či pufrem. Každý přístroj musí pro zaručení správného fungování podstupovat různé týdenní a měsíční údržby. Hádčky se například vyplachují liho benzínem a samotné

lahve 70% ethanolem. K mnohému splachování či oplachování je zde také využívána tzv. demi neboli demineralizovaná voda.

Celé barvení pak probíhá v těchto krocích:

1. barvení barvivem May-Grünwald
2. spláchnutí (otáčivým pohybem přístroje)
3. nanesení pufru
4. barvení barvivem Giemsa
5. spláchnutí (otáčivým pohybem přístroje)
6. sušení

Po vytažení sklíček z přístroje je třeba je ze spodní strany očistit pomocí tzv. kyselého alkoholu (zkoumadlo Ziehl-Neelsen = směs cca. 96% ethanolu a 4% kyseliny chlorovodíkové).

Mnohdy je také potřeba vzorek zanalyzovat co nejrychleji při podezření na nějakou patologii. V takovém případě se využívá rychlejší barvení – Diff Quick (nebo někdy také Diff Quik).

4.2.2 Mikroskopování krevních vzorků

Při této práci byl použit světelný binokulární mikroskop a k mikroskopování samotnému objektiv se zvětšením $100\times$ určený k mikroskopování s imerzním olejem.



Obr. 10: Použitý světelný mikroskop
~ pohled zepředu (zdroj: autor)

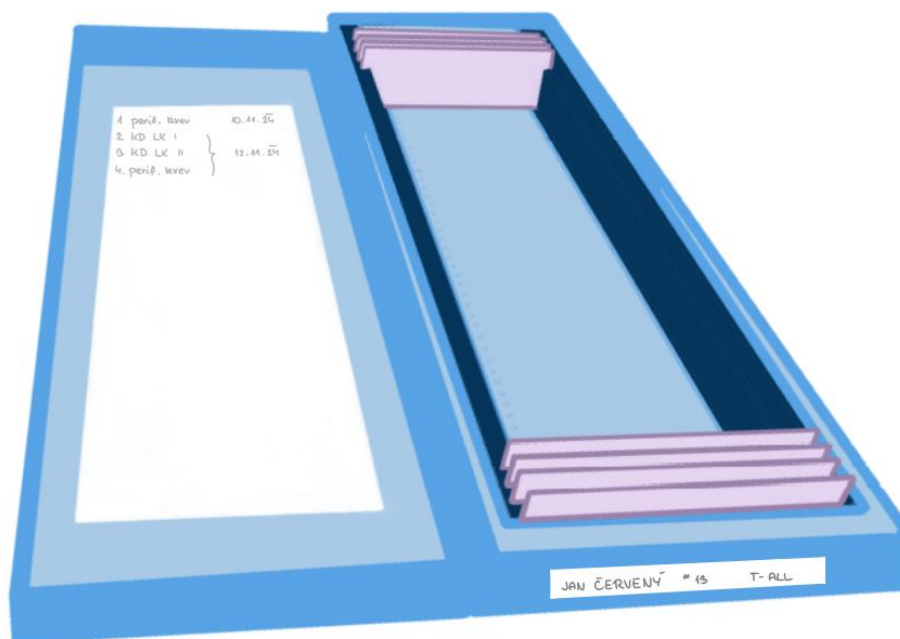


Obr. 11: Použitý světelný mikroskop ~ pohled z boku (zdroj: autor)



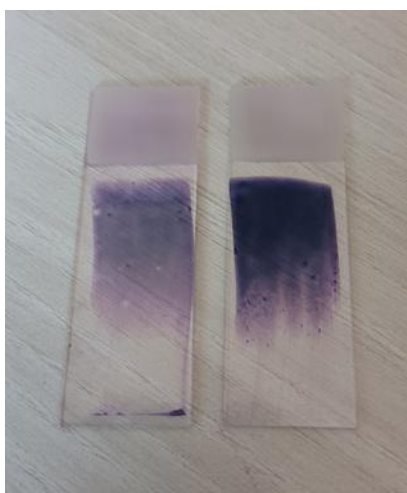
Obr. 12: Použitý objektiv se zvětšením $100\times$
(zdroj: autor)

Vzorky, respektive podložní sklíčka s periferní krví, kostní dřeně, či likvory každého leukemického pacienta jsou na ODHB ve FN Brno uloženy v krabičkách. Každá krabička má pak na sobě jméno a příjmení pacienta, datum narození a typ leukémie, se kterým byl pacient diagnostikován. Sklíčka jsou uspořádána v číslovaných kolonkách, ke kterým je

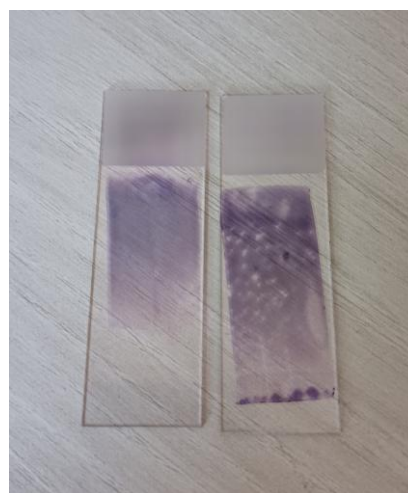


Obr. 13: Krabička se vzorky pacienta ~ ilustrativní, smyšlený pacient (zdroj: autor)

v krabičce přiložen papír s popisy, o jaký vzorek se jedná a také datum jeho odběru. Při vypracovávání praktické části práce byly vždy využity pouze první odebraný vzorek periferní krve a první odebraný vzorek kostní dřeně.



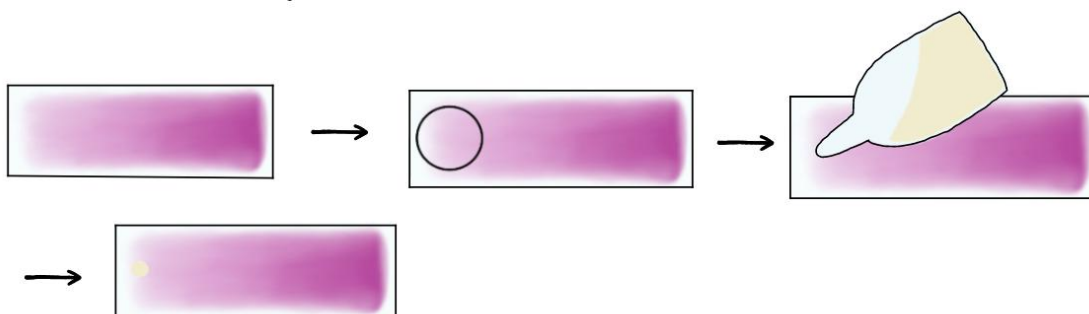
Obr. 14: Vzorek periferní krve (vlevo) a kostní dřeně (vpravo) (zdroj: autor)



Obr. 15: Vzorek periferní krve (vlevo) a kostní dřeně (vpravo) (zdroj: autor)

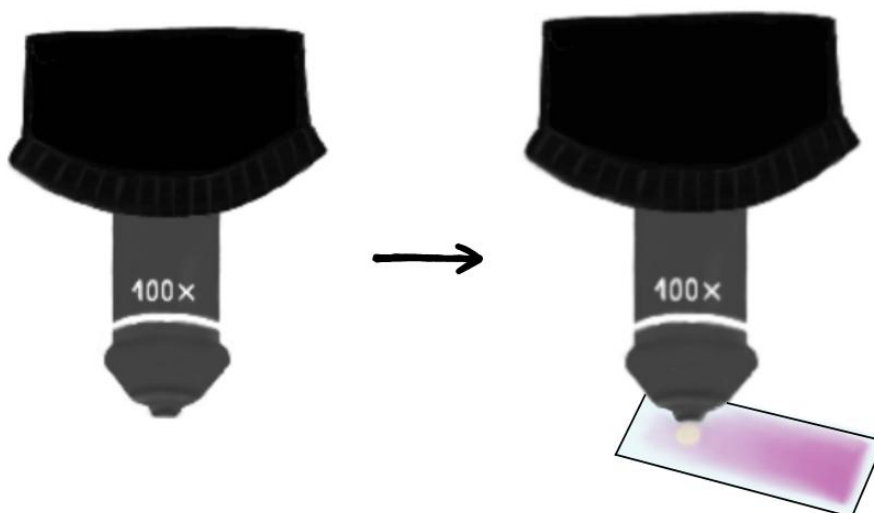
Postup

1. na sklíčko nanést malou kapku imerzního oleje (malá kapka bohatě stačí) na nejsvětlejší část vzorku (tam je totiž nejřidší a jde zde dobře mikroskopovat)



Obr. 16: Nanesení imerzního oleje na sklíčko (zdroj: autor)

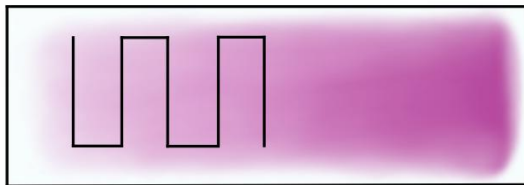
2. na mikroskopu si nastavit objektiv se zvětšením $100\times$ a umístit sklíčko na stolek mikroskopu
3. najet objektivem těsně na sklíčko („nadoraz“)



Obr. 17: Pozice objektivu při mikroskopování (zdroj: autor)

4. vyjet makrošroubem pomalu nahoru, dokud se v mikroskopu neobjeví buňky
5. ve vzorku si přejet na místo, kde je řidký (buňky mají mezi sebou mezery a nepřekrývají se)

6. začít počítat dané buňky, pohybovat se přitom po vzorku tzv. meandrovitým pohybem



Obr. 18: Meandrovitý pohyb při mikroskopování
(zdroj: autor)

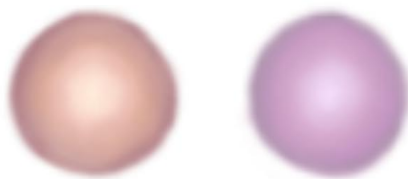
Je důležité si před mikroskopováním stanovit, jaké buňky je třeba počítat. Standardně se stanovuje tzv. diferenciální rozpočet leukocytů, při němž se počítají pouze zdravé nepoškozené leukocyty. Naopak se nepočítají holá jádra či jaderné stíny⁷, jinak rozbité (deformované buňky) a buňky s apoptotickými tělísky⁸. Stejně tak se nepočítají ani trombocyty a erytrocyty, jejich změny v morfologiích však mohou morfologům, tedy lidem, kteří krevní vzorek analyzují, o zdraví pacienta mnoho napovědět.

4.2.3 Rozpoznávání krevních elementů dle morfologie

V odebraných vzorcích periferní krve a kostní dřeně jsou vždy přítomná tzv. krevní tělíska (či elementy), která jsou specifická svou morfologií. Stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů je založeno pouze na morfolologii leukocytů, tedy bílých krvinek. I morfologie dalších krevních elementů nám toho však může říct mnoho o zdravotním stavu pacienta. (Blood Smears Lab, bez roku)

Erytrocyty

Erytrocyty mají průměr asi 7-8 μm . Při barvení by správně měly být zbarvené do růžova. Jsou bikonkávního tvaru a jsou zploštělé.



Obr. 19: Erytrocyty (zdroj: autor)

⁷ Holá jádra či jaderné stíny jsou již rozbité leukocyty, nejedná se celistvé buňky s cytoplazmou.

⁸ Buňky (leukocyty) s apoptotickými tělísky jsou již staré a podstupují řízenou buněčnou smrt, aby organismu nemohly nijak škodit.

Patologie erytrocytů

Retikulocyty jsou nedospělé červené krvinky. Je pro ně typická tzv. polychromázie, tedy přítomnost zbytkového množství RNA v buňkách, které způsobuje šeríkové zbarvení.



Obr. 20: Retikulocyt (zdroj: autor)

Hypochromické erytrocyty mají v sobě menší množství hemoglobinu a jsou tak bledé.



Obr. 21: Hypochromický erytrocyt (zdroj: autor)

Terčové erytrocyty se vyznačují skvrnou uprostřed buněk.



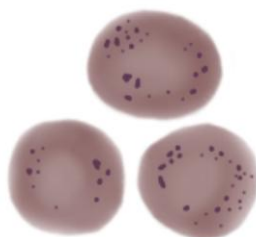
Obr. 22: Terčovitý erytrocyt (zdroj: autor)

Anizocytóza se vyznačuje přítomností erytrocytů, které mají výrazně odlišné velikosti.



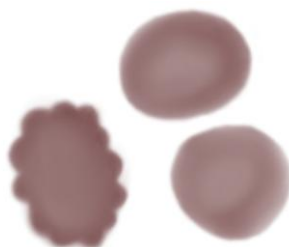
Obr. 23: Anizocytóza (zdroj: autor)

Bazofilní tečkování se projevuje fialovomodrými skvrnkami na erytrocytech.



Obr. 24: Bazofilní
tečkování (zdroj: autor)

Echinocyty jsou erytrocyty s oblými výběžky. Často se jedná o artefakt barvení či sušení a nemusejí nutně signalizovat nějakou patologii.



Obr. 25: Echinocyt (zdroj:
autor)

Trombocyty

Trombocyty mají průměr 2-4 μm a vypadají jako malé fialové úlomky. V krevním vzorku jsou poměrně časté. Někdy mohou být i větší, až jako erytrocyt, to už pak ale není fyziologické.



Obr. 26: Trombocyty (zdroj: autor)

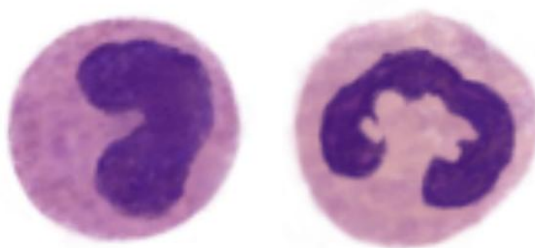
Leukocyty

Neutrofilní segmenty mají průměr 10-14 μm . Mají světle růžovou cytoplazmu. Jejich jádro je fialovomodré a členěné na tři až pět segmentů spojených tenkými vlákny mezi sebou. Má-li neutrofilní segment více než pět segmentů, je označován jako hypersegmentovaný, má-li jich méně než tři, označuje se jako hyposegmentovaný. Typický je pro neutrofilní segmenty také výskyt granul v cytoplazmě. Primární granula obsahují kyselé hydrolázy a kationtové proteiny, sekundární granula potom obsahují různé antimikrobiální látky. Někdy je možné neutrofilní segment zaměnit za neutrofilní tyč. Nejlépe pozorovatelný rozdíl mezi nimi je ten, že neutrofilní segment musí mít nejužší část jádra menší, než je jedna polovina nejširší části jádra.



Obr. 27: Neutrofilní segmenty (zdroj: autor)

Neutrofilní tyče mají průměr 10-16 μm a světle růžovou cytoplazmu. Jejich jádro je fialovomodré, často ve tvaru rohličku. U dospělých nebývají moc časté, u dětí jsou trochu častější. Jedná se o nedospělé stádium, vývojově před neutrofilními segmenty.



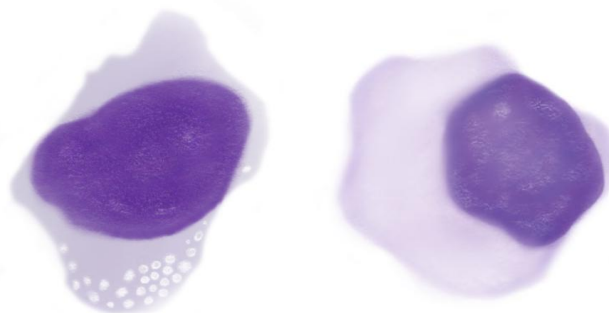
Obr. 28: Neutrofilní tyče (zdroj: autor)

Lymfocyty jsou leukocyty o průměru 8-12 μm , většinou stejné velikosti jako erytrocyty – můžou být ale i větší. Mají tmavé modrofialové jádro kulovitého tvaru. Typický je úzký pruh světlé cytoplazmy kolem jádra. Větší množství se jich obvykle objevuje při infekcích.



Obr. 29: Lymfocyty (zdroj: autor)

Reaktivní lymfocyty jsou zpravidla větší, mívají hodně cytoplazmy, a často i různé výběžky, kterými se ve vzorku dotýkají erytrocytů. Objevují se u nich i bazofilní okraje cytoplazmy. Častý je také méně kondenzovaný chromatin v jádře.



Obr. 30: Reaktivní lymfocyty (zdroj: autor)

Monocyty mají průměr okolo 15-22 μm a šedomodrofialovou až kouřově zbarvenou cytoplazmu, někdy i s výběžky (reaktivní monocyty). Mají také decentralizované světlé modrofialové jádro, které je zahnuté a s laloky. Jádro je světlejší než u lymfocytů, chromatin je méně kondenzovaný (charakterizuje se jako vzhled leopardí kůže). V cytoplazmě bývají přítomna jemná granula. Ta obsahují různé lysozomální enzymy a peroxidázy. Monocyty jsou zpravidla větší než běžné lymfocyty, mohou se ale plést s reaktivními lymfocyty. Typická je i vakuolizace, která se značí přítomností bílých skvrnek či bublinek.



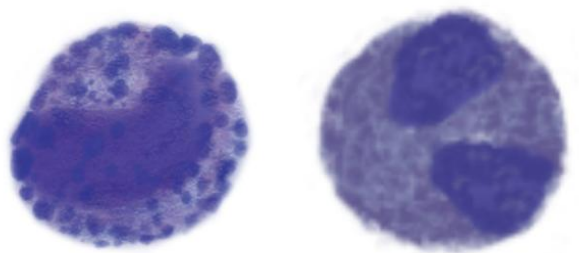
Obr. 31: Monocyty (zdroj: autor)

Eosinofily jsou leukocyty o průměru 10-16 μm . Mají fialovomodré jádro s dvěma až třemi laloky a typická stejně velká oranžovorůžová granula. Ta obsahují eosinofilní kationtový protein, eosinofilní peroxidázu, neurotoxin odvozený z eosinofilů, argininový a na zinek bohatý hlavní bazický protein, histaminázu a aryl-sulfatázu. Velikostně jsou větší než neutrofily.



Obr. 32: Eosinofily (zdroj: autor)

Basofily mají průměr 10-12 μm a fialovomodré jádro se dvěma laloky. Velmi typická jsou tmavě modrofialová granula rozprostřená přes celou buňku. Granula obsahují histamin a heparin. Velikostně se pohybují mezi neutrofily a eozinofily.



Obr. 33: Basofily (zdroj: autor)

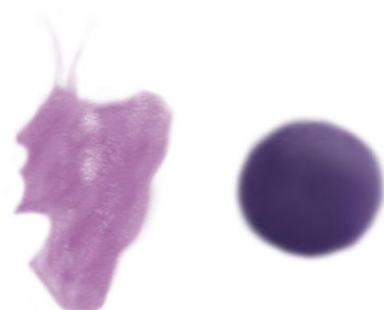
Blasty (lymfoblasty) jsou nedospělá stádia leukocytů o průměru 10-20 μm . Fyziologicky se v periferní krvi nevyskytují, v kostní dřeni pak jen v určitém množství. Na jednom krevním nátěru bývají všechny velmi podobné. Mohou mít také vakuoly. Jejich jádro není tak zahuštěné jako u lymfocytů, má poměrně napěněný chromatin a jako takové bývá zpravidla přes téměř celou buňku. Velikostně jsou zpravidla větší než lymfocyty, dosahují asi velikosti monocytů. Jejich významným poznávacím znakem je jadérko (pod mikroskopem jako zesvětlení uvnitř jádra). Nebývají reaktivní, ale mohou u nich být patrné výběžky cytoplazmy.



Obr. 34: Blasty (zdroj: autor)

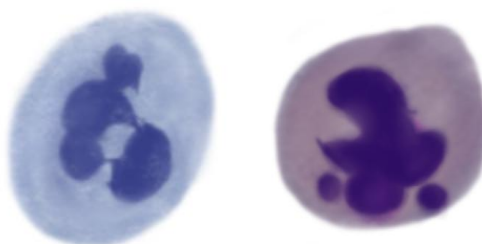
Další možná krevní tělíska, podoby leukocytů, jejich patologie apod.

Holá jádra (jaderné stíny) jsou rozbité leukocyty, osamocená jádra, která již nejsou obklopená cytoplazmou. Nepočítají se, ale pro diagnostiku mohou být mnohdy důležitá (například reaktivní lymfocyty jsou velmi křehké).



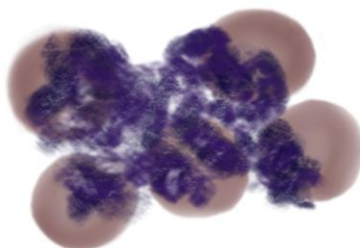
Obr. 35: Holá jádra ~ jaderné stíny (zdroj: autor)

Apoptotické buňky (leukocyty) jsou leukocyty, které mají ve své cytoplazmě apoptotické váčky. Občas vypadají trošku jako neutrofilní segmenty.



Obr. 36: Apoptotické buňky (zdroj: autor)

Chyby v barvení se projevují například přebytečným barvivem na buňkách.



Obr. 37: Přebytečné barvivo (zdroj: autor)

4.2.4 Stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů v periferní krvi

Stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů v periferní krvi se provádí tak, že se pomalu, za splnění všech zásad mikroskopie krevních vzorků popsaných výše, přejíždí po vzorku a hledají se zde přítomné leukocyty. Každý zpozorovaný leukocyt je třeba určit, tedy určit jeho typ, a zaznamenat. To se provádí pomocí speciálních počítadel, která mají

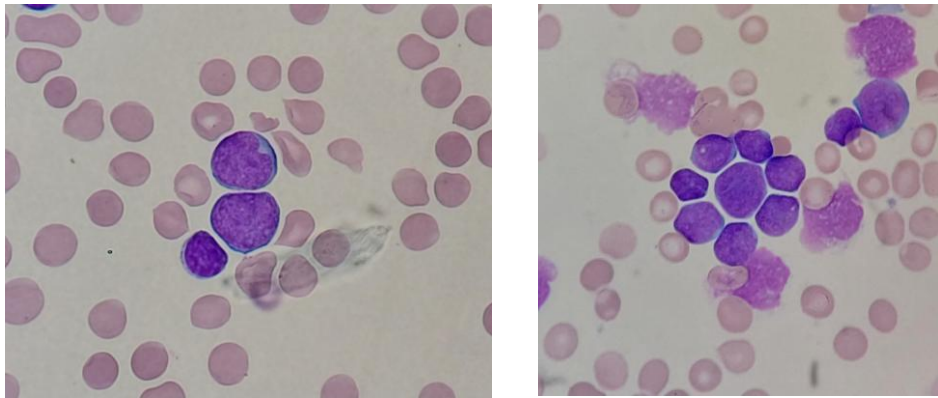


Obr. 38: Počítadlo (zdroj: autor)

pro jednotlivé typy leukocytů vlastní klávesu. Po dosažení předem stanoveného počtu (zde 100 buněk) je třeba si na počítadle zobrazit procentní zastoupení přítomných leukocytů (pomocí klávesy FUNC, viz Obr. 35) a získaná data si zapsat k danému pacientovi. Je třeba dodat, že leukocyty periferní krve u kraje vzorku se nepočítají, jelikož krevní nátěr zde může způsobit různé nepřírozené hromadění buněk.

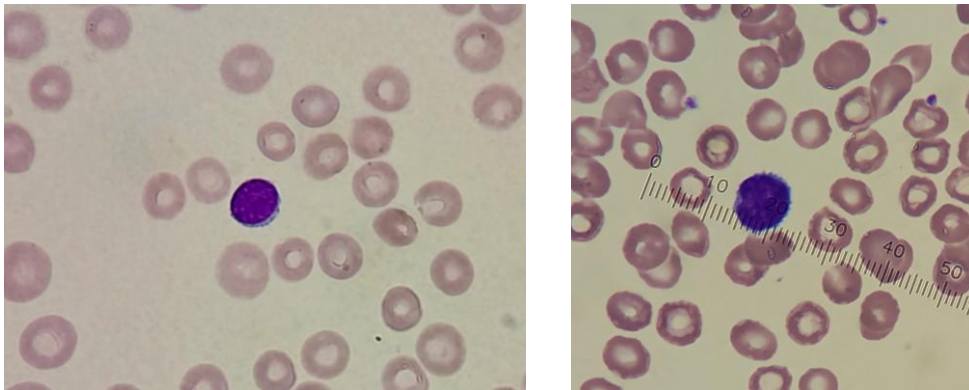
Při provádění praktické části práce byly ve vzorku započítávány všechny nalezené typy leukocytů. Ty byly následující:

Blasty



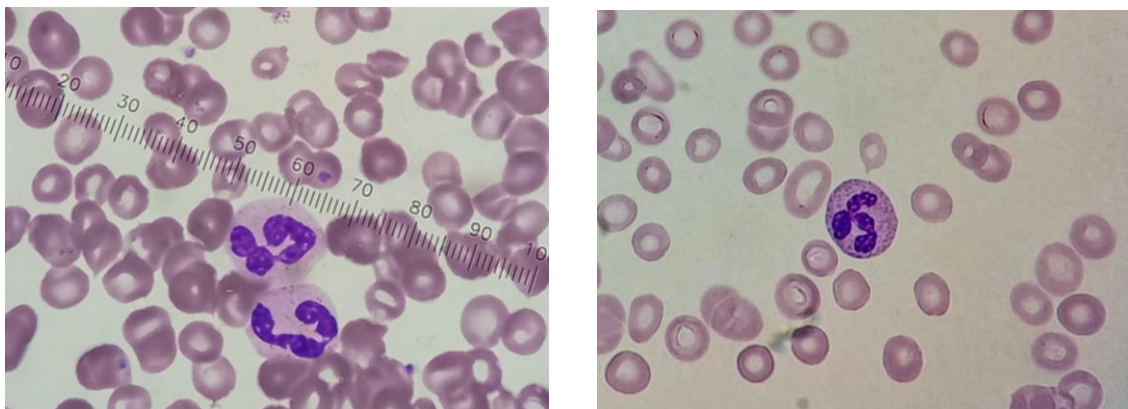
Obr. 39: Blasty (hodnocený pacient, zdroj: ODHB FN Brno)

Lymfocyty



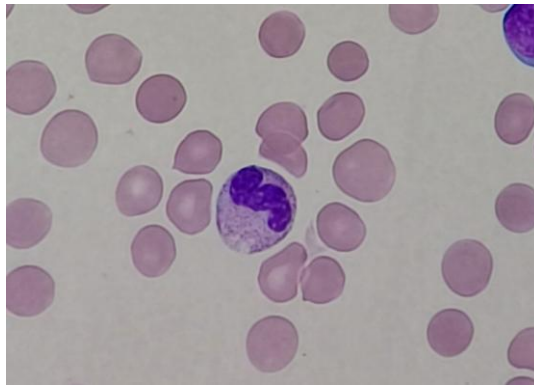
Obr. 40: Lymfocyty (hodnocený pacient, zdroj: ODHB FN Brno)

Neutrofilní segmenty



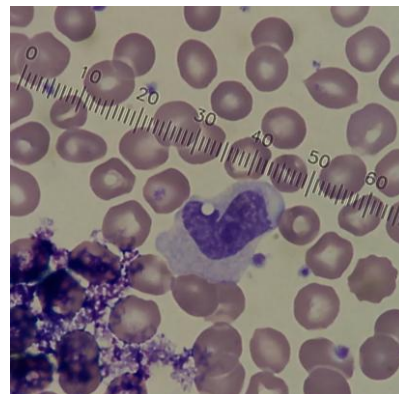
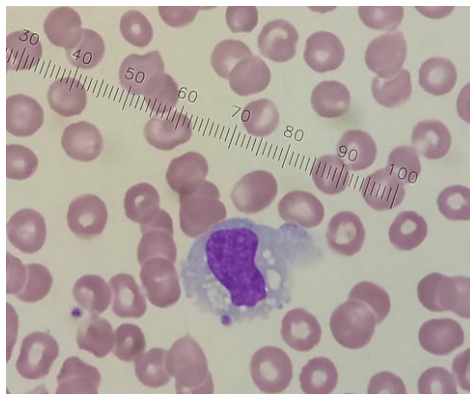
Obr. 41: Neutrofilní segmenty (hodnocený pacient, zdroj: ODHB FN Brno)

Neutrofilní tyče



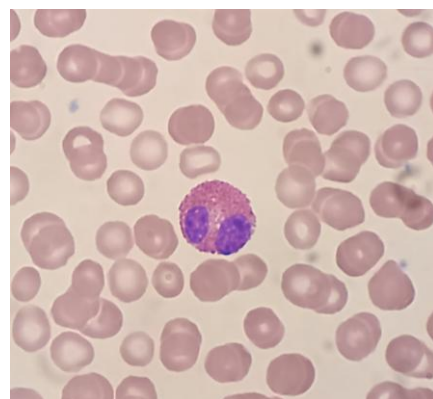
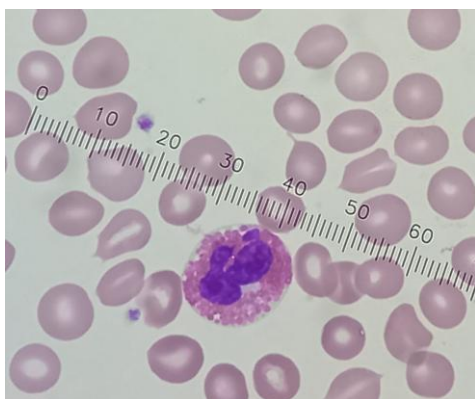
Obr. 42: Neutrofilní tyč (hodnocený pacient, zdroj: ODHB FN Brno)

Monocyty



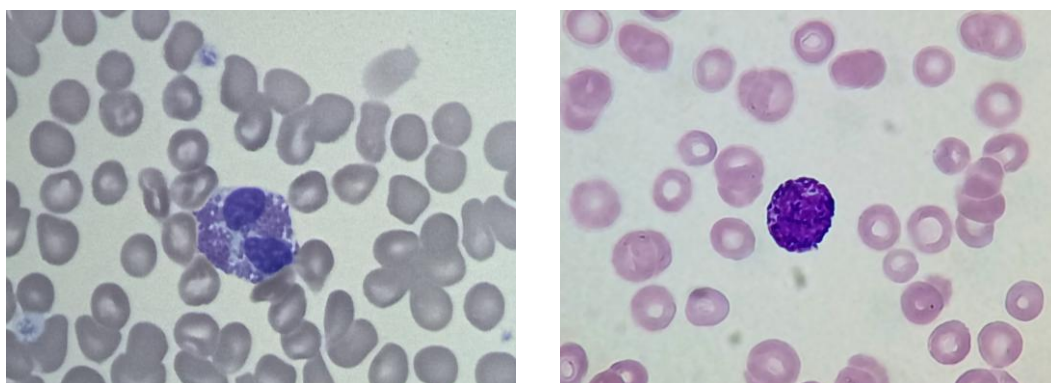
Obr. 43: Monocyty (hodnocený pacient, zdroj: ODHB FN Brno)

Eosinofily



Obr. 44: Eosinofily (hodnocený pacient, zdroj: ODHB FN Brno)

Basofily



Obr. 45: Basofily (hodnocený pacient, zdroj: ODHB FN Brno)

V laboratoři se běžně diferenciální rozpočet leukocytů v periferní krvi stanovuje na 100 buněk, nebo na 200 buněk. V práci byl diferenciální rozpočet leukocytů stanovován na 100 buněk.

4.2.5 Stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů v kostní dřeni

Stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů v kostní dřeni probíhá obdobně jako je tomu u periferní krve. Nalezené leukocyty se opět zaznamenávají na počítadle a po

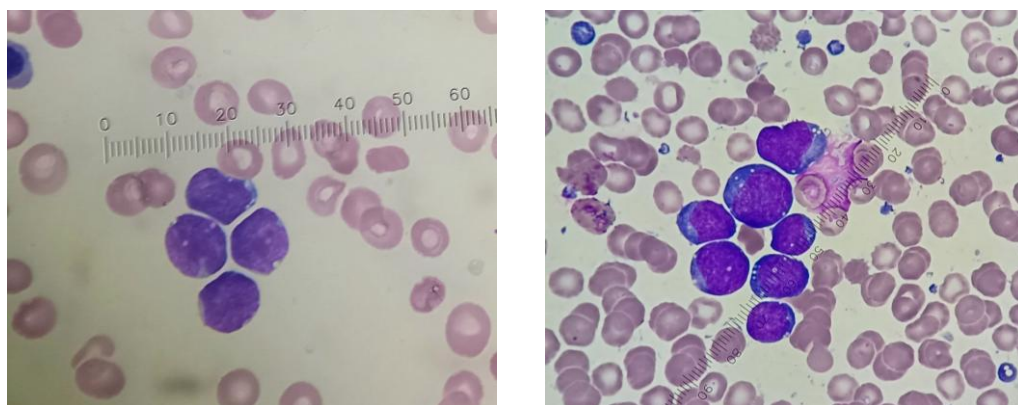


Obr. 46: Počítadlo (zdroj: autor)

dosažení stanoveného počtu (zde 250 buněk) je nutné zaznamenání typů leukocytů ve zkoumaném vzorku k danému pacientovi. Na rozdíl od periferní krve se leukocyty kostní dřene počítají i u okrajů vzorku.

V rámci vypracování praktické části této práce se vyhodnocovalo pouze množství blastů a všechny ostatní typy leukocytů byly, vzhledem k jejich obrovské rozmanitosti a složitosti v morfologii, počítány dohromady.

Blasty



Obr. 47: Blasty (hodnocený pacient, zdroj: ODHB FN Brno)

V laboratoři se běžně diferenciální rozpočet leukocytů v kostní dřeni stanovuje na 500 buněk. V práci byl diferenciální rozpočet leukocytů kostní dřene stanovován na polovinu, a to 250 buněk.

4.3 Flowcytometrie

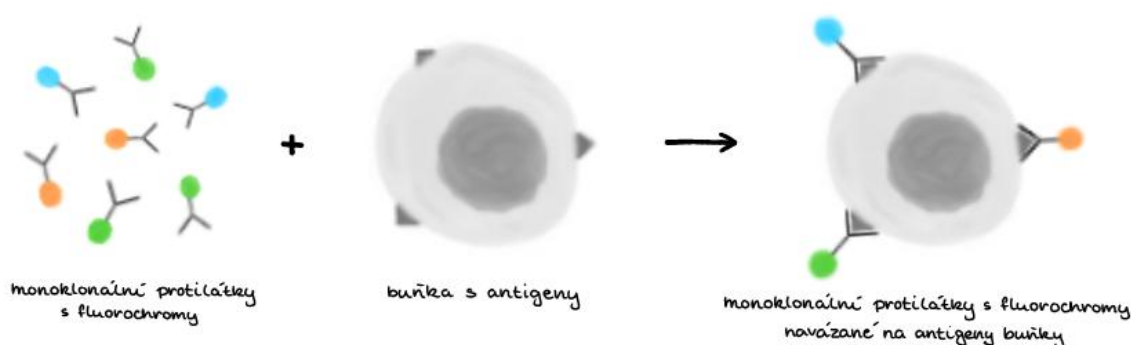
Flowcytometr dokáže vyhodnocovat velké množství různých typů vzorků – periferní krev, kostní dřeň, likvory (vzorky mozkomíšního moku), výpotky (vzorky tekutiny nahromaděné v nějaké dutině) a jiné. Referenční laboratoř pro dětské leukemické pacienty je v Praze, referenční laboratoř pro dospělé pak není a jejich vzorky zpracovávají laboratoře příslušné nemocnice. Celkově může za rok flowcytometrickou laboratoří projít až na 7000 vzorků.

4.3.1 Příprava vzorků pro flowcytometrii

Flowcytometrie jako taková je poměrně komplexní analýzou a před jejím samotným provedením je třeba daný vzorek řádně připravit. Celkově vzato je možné využít více typů postupů, ten zmíněný níže je využíván konkrétně v Dětské nemocnici FN Brno. Přesto se jedná o postup jistým způsobem zobecněný, konkrétní postup se specifickými látkami se typicky volí na základě klinického obrazu pacienta apod.

Postup přípravy vzorku pro flowcytometrii:

1. zhomogenizovat vzorek
2. ke vzorku přidat monoklonální protilátky konjugované s fluorochromy tak, aby byly ve vzorku v nadbytku – inkubovat ve tmě



Obr. 48: Navázání monoklonálních protilátek s fluorochromy na antigeny buňky (zdroj: autor)

3. ke vzorku přidat lyzační roztok na erytrocyty (ty totiž zabírají většinovou část vzorku a při analýze leukocytů by zbytečně překážely)
4. počkat (inkubovat) a vzorek promýt
5. vzorek vložit do flowcytometru

4.3.2 CD antigeny leukocytů zkoumané při diagnostice ALL

Všechny typy leukocytů mají své specifické CD antigeny, podle jejichž přítomnosti je možné zkoumané leukocyty ve vzorku zařazovat do různých skupin – zda jsou zralé, do jaké patří linie apod. U ALL se zpravidla zkoumá především to, jestli jsou majoritní T-lymfocyty, nebo B-lymfocyty a zda jsou dané buňky zralé, nebo nezralé.

V praxi se ve vzorcích pro diagnostiku nejčastěji detekují tyto CD antigeny (Sino Biological, bez roku):

CD antigen	Funkce
CD1a	protein prezentující antigen
CD2	aktivace T-buněk, adheze mezi T-buňkami a ostatními
CD3	signalizace aktivace T-buněk, regulace exprese TCR
CD4	aktivace T-buněk
CD5	regulace signalizace T-receptorů
CD7	interakce T-buněk
CD8	koreceptor pro molekuly MHC 1. třídy
CD10	peptidáza (regulace růstu B-buněk)
CD19	regulace vývoje, aktivace a diferenciaci B-buněk, převod signálů
CD20	aktivace a proliferace B-buněk
CD22	adheze B-buněk a přenos signálů
CD33	buněčná adheze, signalizace mezi buňkami, inhibiční receptor a apoptóza
CD34	buněčná adheze
CD45	regulace buněčného růstu a diferenciaci, aktivace B- a T-buněčnými receptory
CD79a	podjednotka B-buněčného antigenního receptoru, transdukce signálů
CD99	migrace leukocytů, aktivace T-buněk a buněčná adheze

Tab. 2: Zkoumané CD antigeny u ALL a jejich funkce

Kombinace přítomnosti a nepřítomnosti jednotlivých CD antigenů pak dává celkový obraz stavu pacienta a je esenciální pro jeho diagnostiku.

4.3.3 Další antigeny zkoumané při diagnostice ALL

Mimo výše zmíněné CD antigeny se při diagnóze akutní lymfoblastické leukémie využívá i zjišťování dalších antigenů buněk, např. cytoplazmatických. Tyto údaje společně s CD antigeny umožňují komplexnější analýzu vzorku a napomáhají identifikovat podtyp ALL daného pacienta.

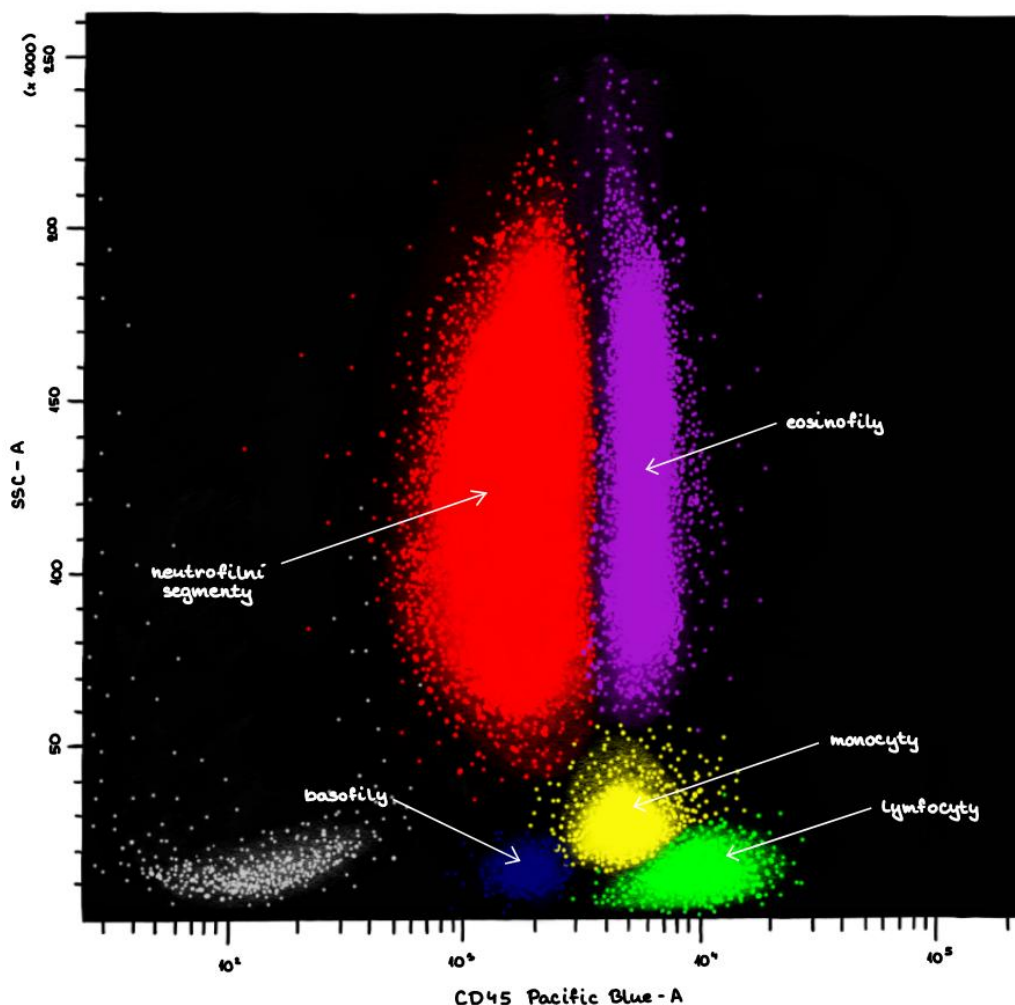
Mezi často analyzované cytoplazmatické antigeny buněk se řadí (Hoffbrand et al., 2006b):

Antigen (cytoplazmatický znak)	Podtyp ALL
cCD79a	B-ALL
cCD22	B-ALL
cCD3	T-ALL
cTdT	T-ALL; B-ALL

Tab. 3: Zkoumané cytoplazmatické antigeny u ALL a jejich výskyt u určitého podtypu ALL

4.3.4 Vyhodnocení flowcytometrické analýzy

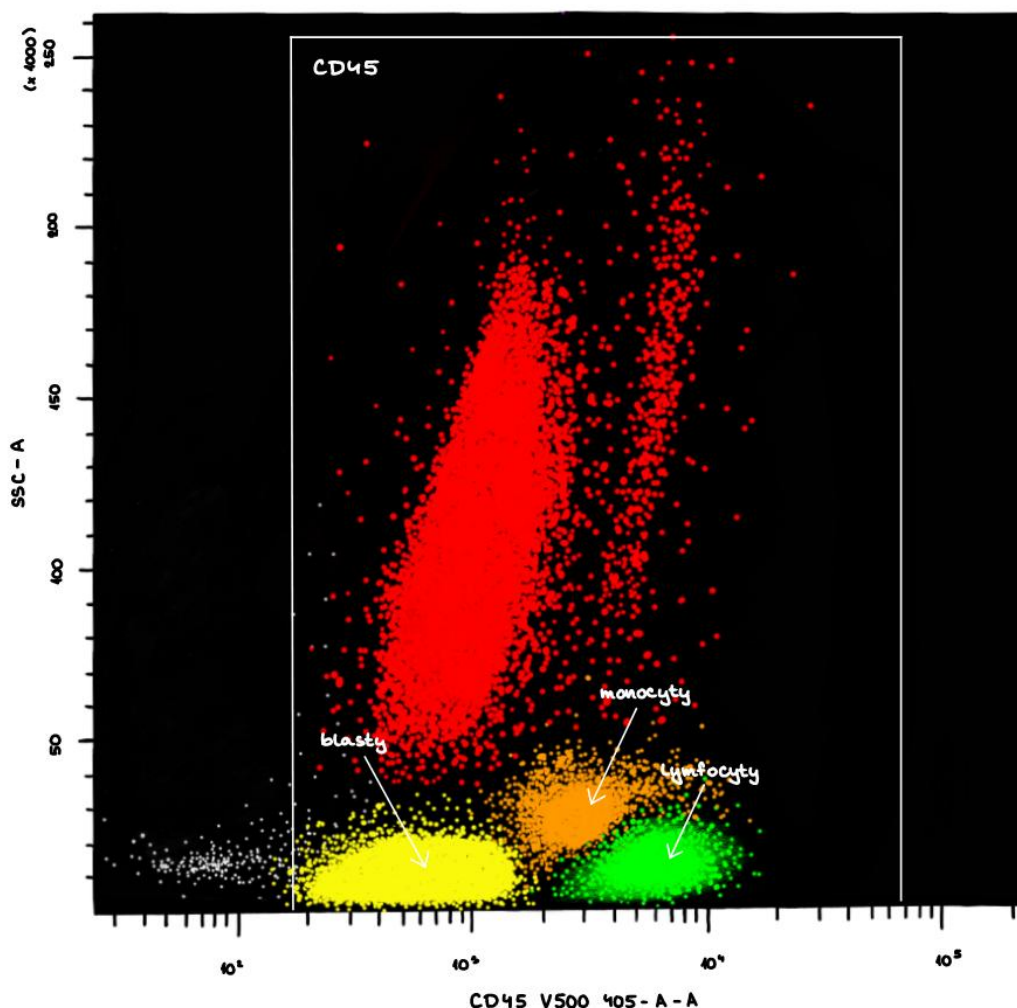
Flowcytometr je schopný získaný optický signál převést na signál elektrický, jenž dále digitalizuje pro počítačovou analýzu. Zobrazení dat může být provedeno několika způsoby a vždy záleží, co je konkrétně třeba z dat vyčíst. Nejčastějším způsobem zobrazení je tzv. „dot plot” histogram, tedy dvourozměrný graf, v němž je každá buňka



Obr. 49: Zobrazení dat z flowcytometru („dot plot” histogram; podle dat zpracovaných ve FN Brno) – fyziologický vzorek (zdroj: autor)

z původního vzorku zobrazena jako tečka. Mimo to mohou být data zobrazena i v trojrozměrném izometrickém grafu nebo ve formě histogramu pro každý jednotlivý parametr. (MZČR, bez roku)

Při diagnostice leukémií se často využívají histogramy, v nichž jsou na obou osách vyneseny nějaké hledané znaky, typicky přítomnost daných CD antigenů. Z těchto grafů lze poté vyčíst například jaké konkrétní typy buněk (leukocytů) byly ve vzorku přítomny (různé typy leukocytů mají na svém povrchu rozdílnou kombinaci CD antigenů a dalších proteinů, či struktur) a následně například podtyp leukémie, kterou daný pacient má.



Obr. 50: Zobrazení dat z flowcytometru („dot plot” histogram; podle dat zpracovaných ve FN Brno)
– patologický vzorek T-ALL (zdroj: autor)

V rámci zpracování této práce byla využita pouze číselná data z flowcytometrické analýzy, a to v podobě procentního zastoupení blastů v analyzovaných vzorcích periferní krve a kostní dřeně u pacientů diagnostikovaných s ALL v letech 2022 a 2023. Samotná flowcytometrická analýza nebyla autorem této práce prováděna, jelikož ji nelze, vzhledem k rokům diagnózy pacientů, opakovat.

5 ANALÝZA DAT A VÝSLEDKY

Tato práce se zaměřuje na problematiku akutní lymfoblastické leukémie u dětí a na dvě různé metody její diagnostiky a klade si především za cíl je porovnat. Věnuje se ale i jiným aspektům ALL. Výzkum byl prováděn na vzorcích periferní krve a kostní dřeně pacientů diagnostikovaných ve FN Brno v letech 2022 a 2023 různého věku a pohlaví.

Následující podkapitoly s daty až po ty zahrnující srovnání mikroskopie a flowcytometrie (bez nich) se zabývají analýzou hodnot získaných pouze stanovením diferenciálního rozpočtu leukocytů pod mikroskopem.

2023	Pohlaví	Rok narození	Věk při diagnostice
Pacient 1	muž	2020	3
Pacient 2	muž	2016	7
Pacient 3	muž	2014	9
Pacient 4	muž	2018	5
Pacient 5	žena	2018	5
Pacient 6	žena	2018	5
Pacient 7	muž	2020	3
Pacient 8	žena	2019	4
Pacient 9	muž	2014	9
Pacient 10	žena	2013	10
Pacient 11	muž	2021	2
Pacient 12	muž	2017	6
2022			
Pacient 13	žena	2017	5
Pacient 14	muž	2013	9
Pacient 15	muž	2018	4
Pacient 16	žena	2014	8
Pacient 17	žena	2001	21
Pacient 18	žena	2020	2
Pacient 19	muž	2018	4
Pacient 20	žena	2018	4
Pacient 21	muž	2005	17
Pacient 22	muž	2014	8
Pacient 23	žena	2018	4
Pacient 24	muž	2005	17
Pacient 25	žena	2017	5
Pacient 26	muž	2016	6
Pacient 27	muž	2021	1
Pacient 28	muž	2018	4
Pacient 29	muž	2014	8
Pacient 30	muž	2020	2
Pacient 31	žena	2020	2
Pacient 32	žena	2019	3

Tab. 4: Pohlaví, rok narození a věk diagnostikovaných pacientů

V tabulce výše jsou uvedeni všichni ze zkoumaných pacientů – vždy se svým biologickým pohlavím, rokem narození a věkem v době diagnostiky. Pořadí je dáno čistě tím, v jakém pořadí byly jejich vzorky mikroskopovány. Toto pořadí nekoresponduje s pořadím pacientů v později popisovaných grafech. V těchto grafech jsou pacienti seřazeni podle průměrných hodnot počtu leukocytů apod. (záleží na konkrétním grafu) tak, aby byla usnadněna orientace v grafu a následná interpretace získaných dat.

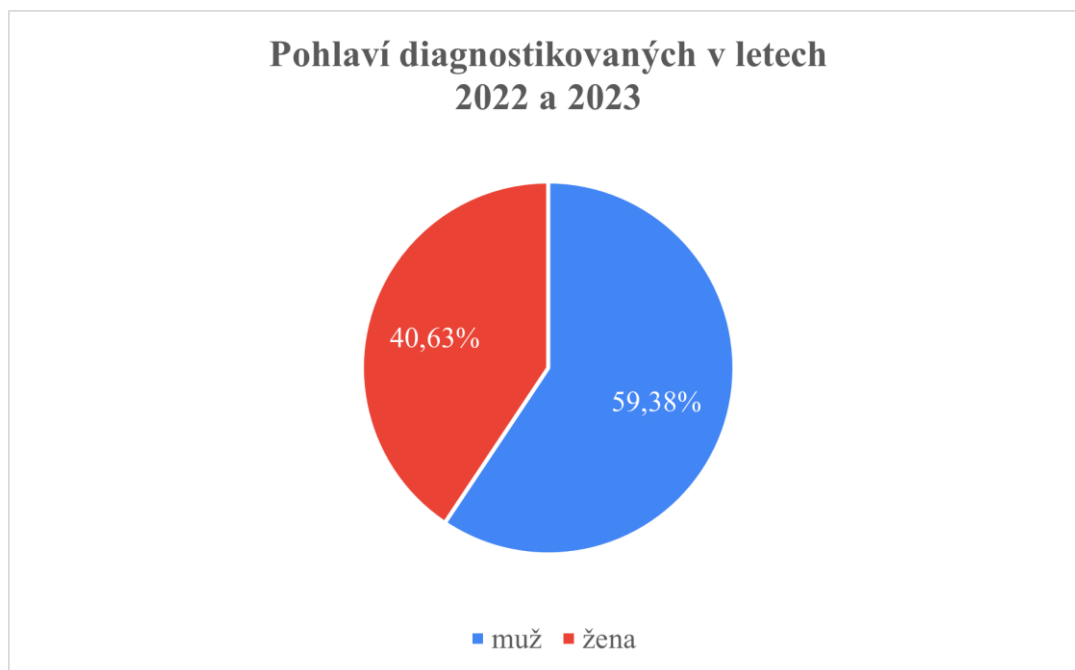
5.1 Věk pacientů



Graf 1: Věk pacientů při diagnostice

Věk pacientů při diagnostice ALL se často liší a nelze nějaký rok života označit jako přímo rizikový. Nejčastější je však propuknutí ALL u dětí v předškolním věku. Zde ale mají většinou lepší prognózu.

5.2 Pohlaví pacientů



Graf 2: Pohlaví diagnostikovaných

Pohlaví pacientů se také často liší, ale dle získaných dat lze říci, že rizikovější skupinou pro výskyt ALL jsou pacienti mužského pohlaví. Vzhledem k poměrně malému rozdílu však nelze uvažovat o nějakém důležitém faktoru, na který by bylo při diagnostice třeba brát ohled.

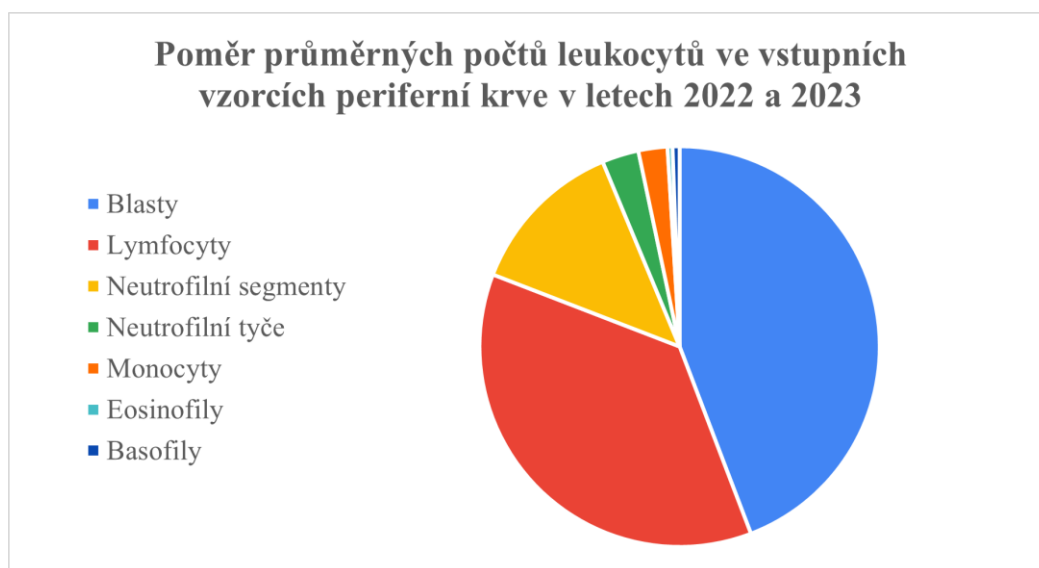
5.3 Vzorky periferní krve pod mikroskopem

5.3.1 Přítomnost jednotlivých typů leukocytů



Graf 3: Průměrný počet jednotlivých typů leukocytů v periferní krvi diagnostikovaných pacientů

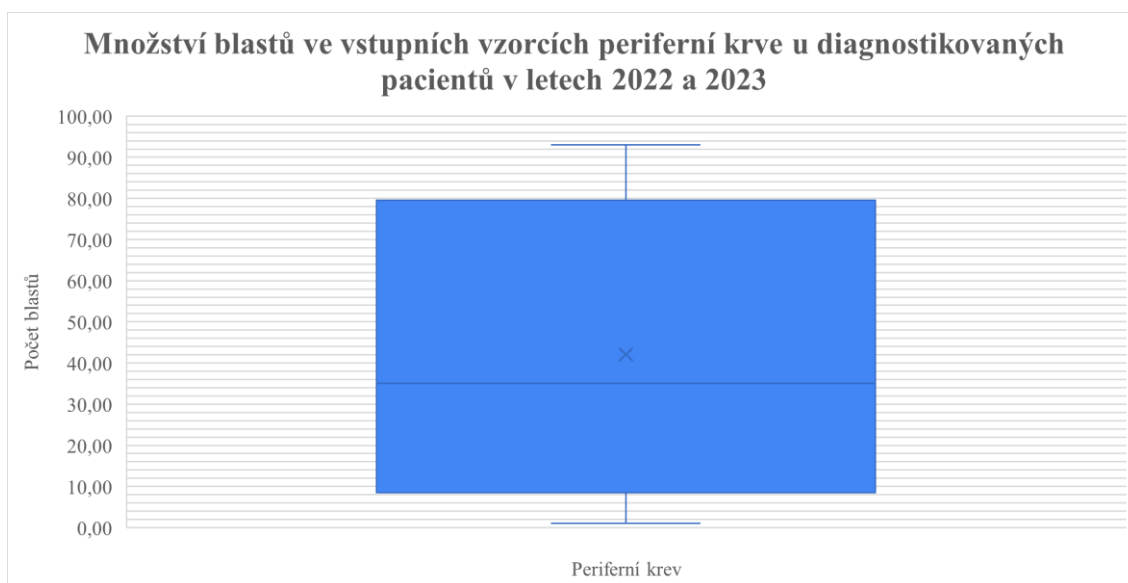
Z dat jasně vyplývá, že průměrně měli diagnostikovaní pacienti v periferní krvi nejvíce blastů, tedy právě onoho patologického stádia. V krvi by správně neměli být blasty žádné, za fyziologické je možné u dětí brát do jednoho až dvou blastů na 100 buněk. U diagnostikovaných je to průměrně až kolem 45, u jednotlivých pacientů se to ovšem liší. Druhým nejzastoupenějším typem leukocytů byly v průměru lymfocyty. I to může ukazovat na nějaký problém, jelikož u zdravých lidí jsou typicky v krvi nejvíce zastoupené neutrofilní segmenty.



Graf 4: Poměr jednotlivých typů leukocytů v periferní krvi diagnostikovaných pacientů

Stejně jako na grafu předchozím i zde lze vidět, že průměrně tvoří blasty v periferní krvi téměř polovinu všech přítomných leukocytů.

5.3.2 Množství blastů



Graf 5: Množství blastů v periferní krvi diagnostikovaných pacientů

Množství blastů se při diagnostice u jednotlivých pacientů může značně lišit, a to především v závislosti na tom, jak moc rozvinutá ALL už v daném organismu je. Průměrný počet blastů při diagnostice se pohybuje téměř kolem 50 blastů na 100 buněk. Mnohdy ale pro pojmutí podezření na nějakou patologii stačí blast na 100 buněk jen jeden. U některých pacientů mohou blasty tvořit až přes 90 % všech zde přítomných leukocytů.

5.4 Vzorky kostní dřeně pod mikroskopem

5.4.1 Přítomnost jednotlivých typů leukocytů



Graf 6: Průměrný počet jednotlivých typů leukocytů v kostní dřeni diagnostikovaných pacientů

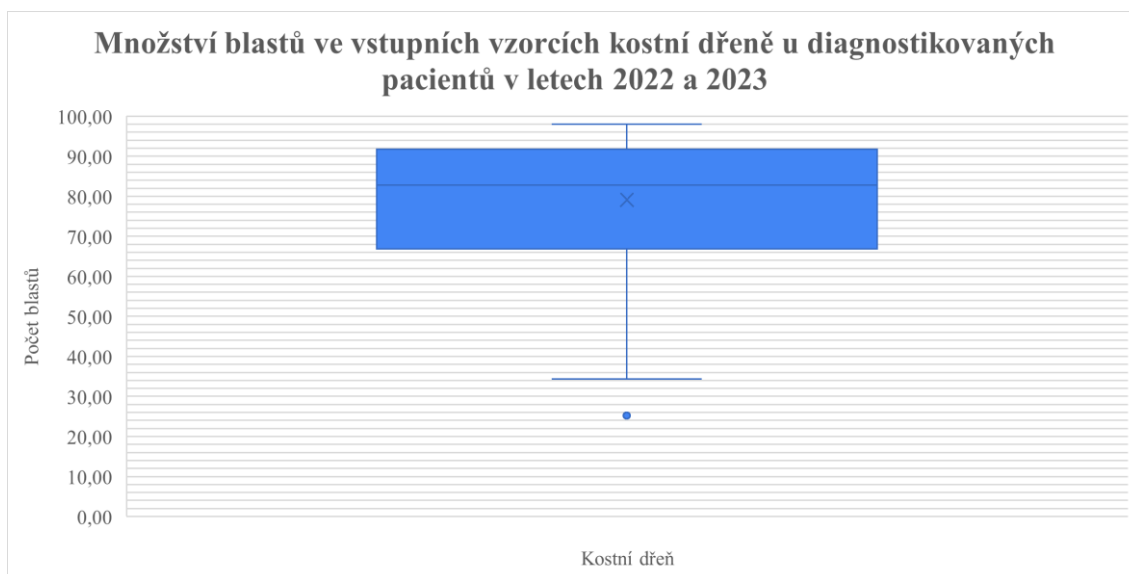
U diagnostikovaných pacientů se průměrný počet blastů v periferní krvi pohyboval kolem 80 % všech zde přítomných leukocytů. Fyziologické množství v kostní dřeni je ovšem maximálně jedna pětina všech zde přítomných leukocytů. (Puckett a Chan, 2025) Pouhých zbylých 20 % pak tvořily ostatní typy leukocytů.



Graf 7: Poměr jednotlivých typů leukocytů v kostní dřeni diagnostikovaných pacientů

I v tomto grafu je patrný velký rozdíl mezi patologickým množstvím blastů a množstvím ostatních leukocytů v kostní dřeni.

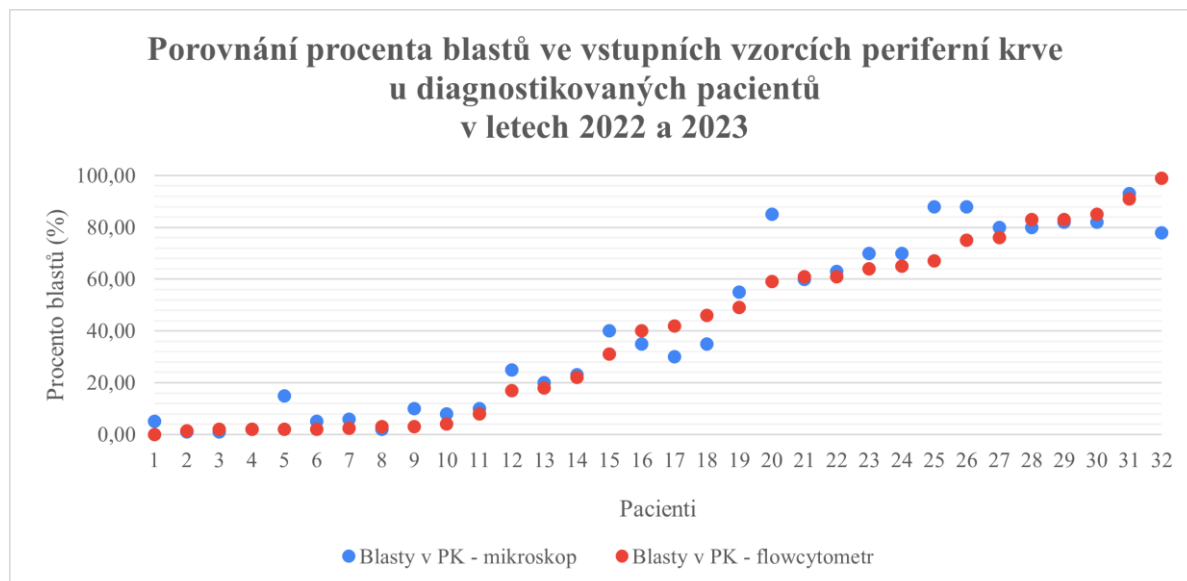
5.4.2 Množství blastů



Graf 8: Množství blastů v kostní dřeni diagnostikovaných pacientů

Zjištěné množství blastů se při diagnostice u jednotlivých pacientů často velmi liší, a to především v závislosti na tom, jak moc rozvinutá ALL už u daného pacienta je. Průměrný počet blastů v kostní dřeni při diagnostice se pohybuje asi kolem 80 %. Za patologické množství blastů v kostní dřeni se považuje více než 20 % všech zde přítomných leukocytů. S tím se shoduje i získaná minimální hodnota u hodnocených pacientů, která dosahuje asi 25 %. (Puckett a Chan, 2025) U některých pacientů se ale množství blastů při diagnostice pohybuje těsně pod hranicí 100 %.

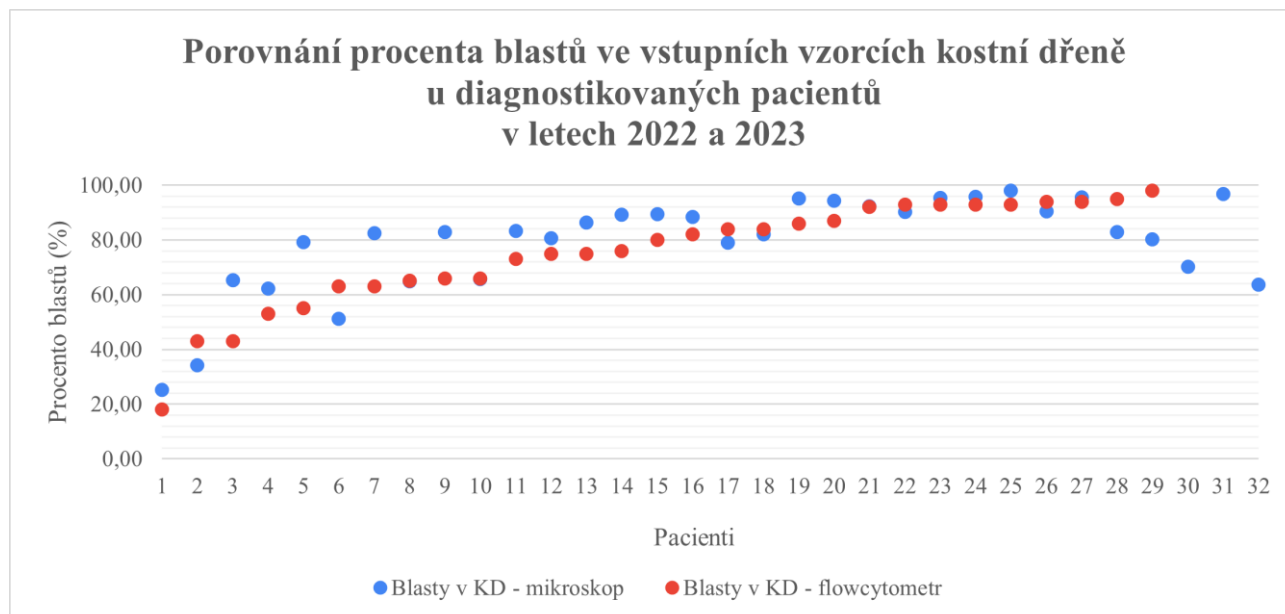
5.5 Porovnání diferenciálního rozpočtu leukocytů a hodnot z flowcytometrie u vzorků periferní krve



Graf 9: Porovnání množství blastů v periferní krvi získaných z mikroskopování a z flowcytometrie

Z grafu výše vyplývá, že výsledky ze stanoveného diferenciálního rozpočtu leukocytů a výsledky z flowcytometrie se u jednotlivých pacientů více, či méně liší. Tento graf si stanovuje flowcytometrická data jako základní, respektive podle nich jsou pacienti seřazeni – a to na základě předpokladu, že flowcytometr se při identifikaci antigenů na povrchu buněk a následné identifikaci leukocytů spíše nemýlí. Graf ukazuje, jak moc se hodnoty z mikroskopování od těch flowcytometrických lišily. Je patrné, že nejmenší rozdíly hodnot byly u pacientů, u nichž bylo množství blastů minoritní. Největší rozdíly mezi hodnotami pak byly v oblasti středního počtu blastů. Tento trend však není stoprocentní.

5.6 Porovnání diferenciálního rozpočtu leukocytů a hodnot z flowcytometrie u vzorků kostní dřeně



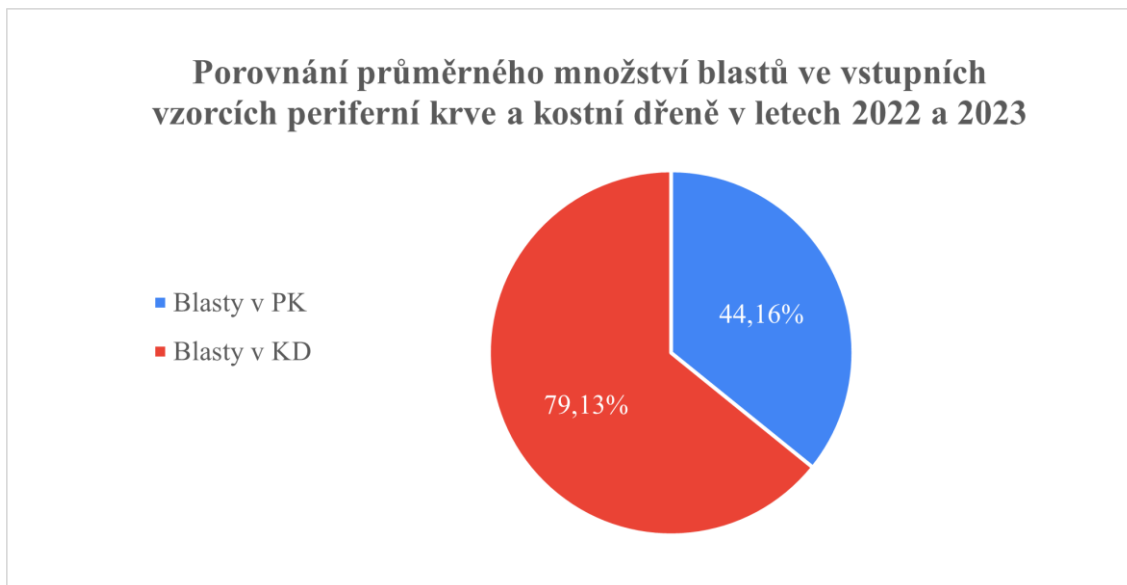
Graf 10: Porovnání množství blastů v kostní dřeni získaných z mikroskopování a z flowcytometrie

Z grafu výše vyplývá, že výsledky ze stanoveného diferenciálního rozpočtu leukocytů a výsledky z flowcytometrie se u jednotlivých pacientů alespoň částečně liší. Tento graf si stanovuje flowcytometrická data jako základní, respektive podle nich jsou pacienti seřazeni – a to na základě předpokladu, že flowcytometr se při identifikaci antigenů na povrchu buněk a následné identifikaci leukocytů spíše nemýlí. Graf ukazuje, jak moc se hodnoty z mikroskopování od těch flowcytometrických lišily. Lze zde vidět, že o něco menší rozdíly hodnot byly u těch pacientů, u nichž bylo množství blastů v kostní dřeni majoritní.

U některých pacientů nejsou v grafu uvedeny počty blastů z flowcytometrie, a to proto, že buď analýza daného vzorku nebyla provedena, nebo bylo v analyzovaném vzorku přítomno mnoho sraženin a výsledky by tak nebyly vypovídající.

5.7 Porovnání získaných hodnot u vzorků periferní krve a kostní dřeně

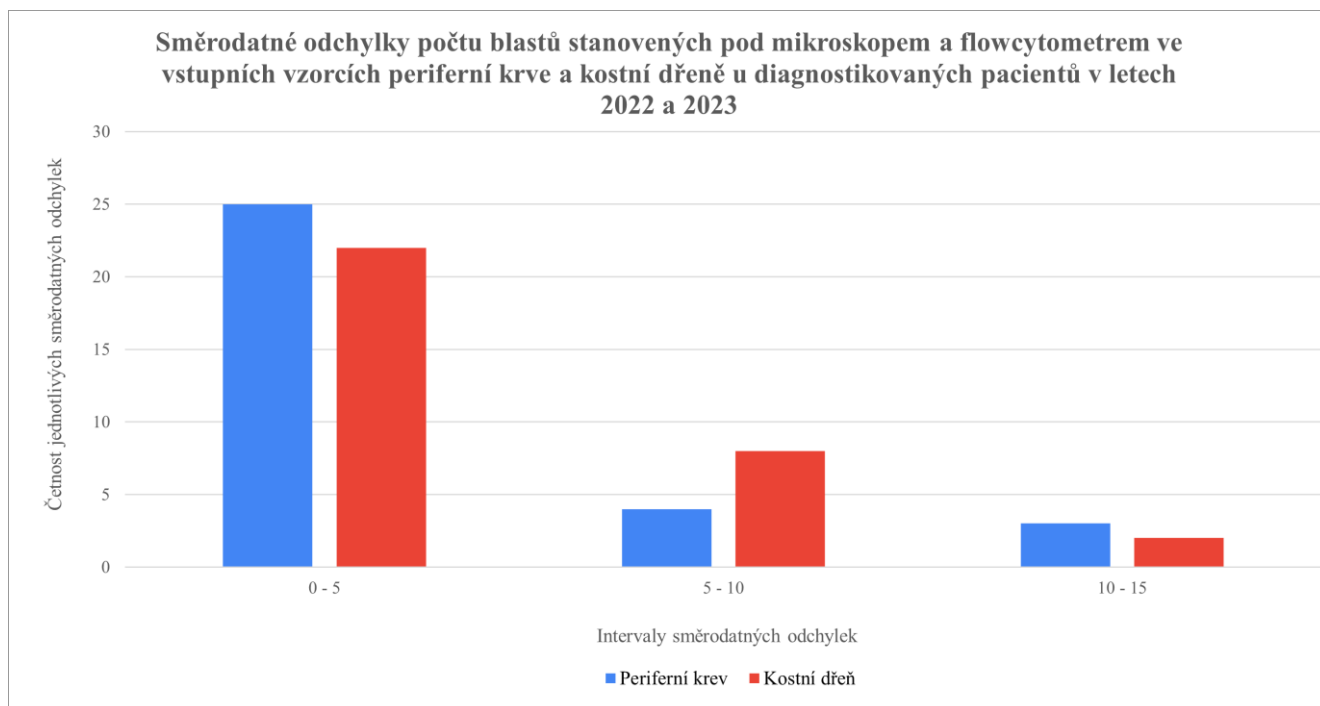
5.7.1 Porovnání počtu blastů při diagnostice



Graf 11: Porovnání množství blastů při diagnostice v periferní krvi a v kostní dřeni

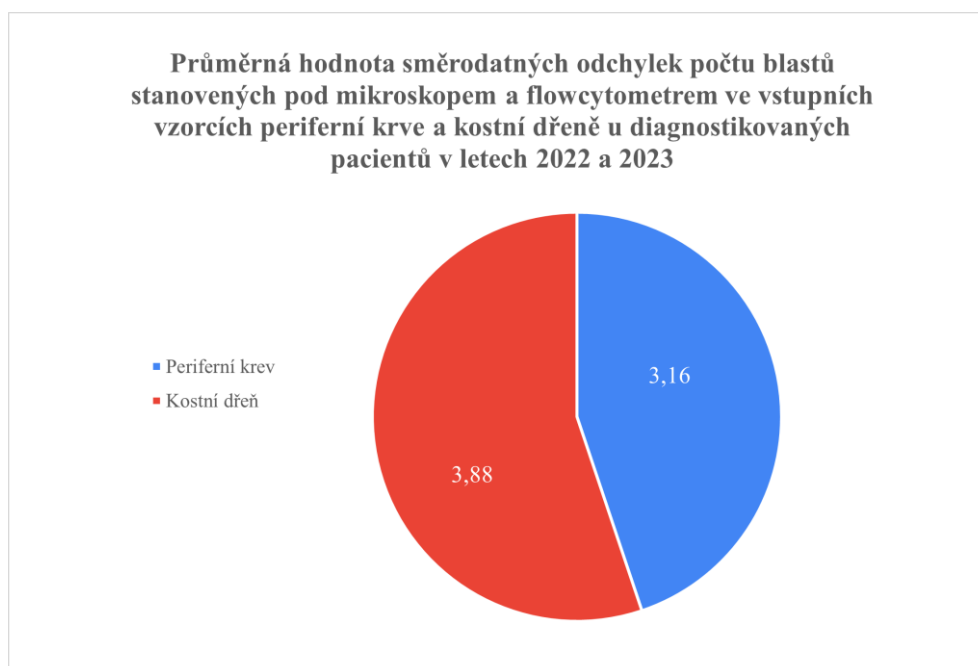
Množství blastů ve vstupních vzorcích periferní krve a kostní dřeně se zpravidla liší. V kostní dřeni se jich nachází, jak vyplývá ze získaných dat, více než v periferní krvi. To jasně koresponduje s tím, že ALL začíná právě v kostní dřeni, ze které se až poté blasty dostávají do periferní krve.

5.7.2 Porovnání směrodatných odchylek hodnot z mikroskopu a z flowcytometrie



Graf 12: Porovnání směrodatných odchylek periferní krve a kostní dřeně

Jak již bylo uvedeno výše, získané hodnoty z mikroskopu a z flowcytometru se v některých případech lišily. Z četností vypočítaných směrodatných odchylek však vyplývá, že u většiny pacientů byla směrodatná odchylka spíše menší.



Graf 13: Porovnání průměru směrodatných odchylek u periferní krve a kostní dřeně

Z obou uvedených grafů vyplývá také to, že chybovost, respektive rozdílnost hodnot získaných mikroskopií a flowcytometrií je nepatrně větší u vzorků kostní dřeně než u vzorků periferní krve. V prvním grafu je vidět pouhé porovnání četností daných intervalů směrodatných odchylek, zatímco v druhém grafu je znázorněno porovnání průměrů stanovených směrodatných odchylek u periferní krve a kostní dřeně. Samotné směrodatné odchylky byly stanoveny tak, že se vždy zvlášť u vzorku periferní krve a zvlášť u vzorku kostní dřeně určila odchylka hodnoty z imerzní mikroskopie od hodnoty z flowcytometrie a následné zjištěné odchylky byly poté rozřazeny do stanovených intervalů u zmíněných dvou skupin vzorků (imerzní mikroskopie a flowcytometrie).

6 DISKUZE

6.1 Získané výsledky

6.1.1 Množství blastů a dalších typů leukocytů při diagnostice

Při diagnostice různých onemocnění, leukémie nevyjímaje, je třeba brát ohled na celkový stav pacienta, nikoli pouze na jeden konkrétní znak, jímž je dané onemocnění charakteristické. Při hodnocení periferní krve a kostní dřeně pacienta je samozřejmě důležité hledat přítomnost blastů, které ALL charakterizují. O zdravotním stavu pacienta však mnohé vypovídá i přítomnost dalších krevních elementů a jejich množství. U ALL je například v periferní krvi typický zvýšený počet lymfocytů oproti fyziologickému stavu, kdy jsou početnější neutrofilní segmenty.

6.1.2 Rozdíly v získaných hodnotách z mikroskopu a z flowcytometru

Při diagnostice leukémií je mnohdy důležitá i morfologie buněk přítomných ve vzorku. Zatímco flowcytometrie umožňuje přesnou identifikaci typů leukocytů i přítomnost trombocytů, u mikroskopické analýzy je důležitá především morfologie těchto elementů. Zkušenosti morfologové v diagnostických laboratořích jsou mnohdy schopní nějaký problém odhalit už jen z toho, že se jim vzhled některých buněk úplně nezdá. Zároveň je pod mikroskopem možné zkoumat i vzhled erytrocytů, které se ve flowcytometrii nijak neřeší, protože by vzhledem ke svému obrovskému množství při analýze překážely. Přitom toho o zdravotním stavu pacienta také dokážou mnoho říct.

Nevýhodou při stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů je pak možnost záměny jednotlivých buněk. U ALL mají lymfocyty mnohdy podobnou morfologii jako nedospělé blasty a mohou se tedy objevit komplikace s přesným stanovením počtu daných typů leukocytů. Ze získaných dat od určitých pacientů tyto odchylky navíc přesně vyplývají – i v porovnání s výsledky zkušených morfologů se data z mikroskopie a data z flowcytometrie lišila.

6.1.3 Směrodatné odchylky počtu blastů v periferní krvi a v kostní dřeni

Větší rozdílnost výsledků mezi mikroskopií a flowcytometrií byla u kostní dřeně. To si lze vysvětlit přítomností leukocytů různého stáří, která je typická právě pro kostní dřeň. Tato skutečnost může v některých případech diagnostiku znesnadnit. U většího vzorku pacientů by však tento rozdíl v odchylkách u periferní krve a kostní dřeně mohl být i menší. Obecně však lze říct, na základě dat vycházejících z práce, že čím častěji je určitý typ leukocytu ve vzorku vidět, tím větší je pravděpodobnost, že bude určen správně – vzhled buněk konkrétního typu se totiž u jednoho pacienta liší spíše minimálně.

Ze získaných dat pak také vyplývá to, že odchylky byly přítomné u různých pacientů nehledě na množství u nich zjištěných blastů. To je cenný poznatek, jenž potvrzuje to, že metody mikroskopie a flowcytometrie jsou podobně přesné v jakémkoli případě. Co se týče odchylek samotných, mohly být způsobeny různými faktory. Jedním z nich je například samotný typ ALL – u T-ALL je mnohem těžší patologické blasty ve vzorcích pod mikroskopem poznat. Obtížnost u zjišťování typu leukocytu podle jeho morfologie může ale nastat i jinak. Další problém mohou tvořit i užívaná léčiva, která mohou leukocyty různě měnit. Mimo to nastávají komplikace v případě, že je vzorek, typicky pro flowcytometrii, vysrážený – v tomto případě totiž získané výsledky nejsou relevantní. Obecně pak lze také poznamenat, že rozdíly v počtech blastů mezi mikroskopováním a flowcytometrií mohou být dány i samotným množstvím hodnocených buněk, jak již bylo zmíněno výše – u flowcytometrie je to mnohonásobně více.

6.2 Porovnání s podobnými výzkumy

Na toto téma bylo zatím uskutečněno poměrně málo výzkumů (alespoň těch veřejně dostupných), které navíc zároveň zkoumaly akutní leukémie obou typů, tedy jak ALL, tak AML. (Belurkar et al., 2013), (Pandey, 2021), (Gupta et al., 2016) Hodnotily často to, jak přesné bylo hodnocení morfologie a flowcytometrie v odhalení těchto leukémií a poté též v jejich rozpoznání od sebe. Tyto výzkumy se současně zabývaly především tím, jak může flowcytometrie při diagnostice přispět a do jaké míry morfologickou analýzu doplňuje.

Zpracovaný výzkum je unikátní svým zaměřením pouze na ALL. Tato práce se také zaměřuje, v porovnání s ostatními provedenými, spíše na výhody a nevýhody těchto dvou typů diagnostiky a na to, zda lze jednu z těchto metod nahradit tou druhou. Jejich výhody také vyzdvihuje a poukazuje na to, jakým způsobem se dají v diagnostice zkombinovat a jejich potenciál využít co nejefektivněji, čímž do této problematiky přináší nový pohled.

6.3 Omezení provedeného výzkumu

Jako u každého provedeného výzkumu je třeba zvážit určitá omezení, která se v jeho průběhu mohla naskytnout.

Prvním z omezení, především do budoucna, je srovnání pouze dvou používaných metod diagnostiky ALL. Pro větší komplexnost a širší pohled na toto téma by bylo třeba výzkum obohatit i o metody další. Další z omezení je to, že hodnocené vzorky pocházely pouze od pacientů diagnostikovaných s ALL – to poměrně zužuje aplikovatelnost získaných výsledků. Je ovšem pravda, že ne vždy je větší specifita na škodu a může mnohdy přinést naopak více užitku. Mezi omezení patří také skutečnost, že zkoumaní pacienti byli pouze dětského věku (do 21 let), jen z intervalu dvou let (kdy byli diagnostikováni) a pouze z malého geografického území. To též jistým způsobem snižuje komplexnost celého výzkumu a v navazujících studiích to představuje prostor pro zlepšení.

6.4 Možné důsledky výsledků práce a využití v klinické praxi

6.4.1 Optimalizace diagnostiky akutní lymfoblastické leukémie u dětí

Zjištěné výsledky mohou vést k optimalizaci používaných metod pro diagnostiku akutní lymfoblastické leukémie u dětí. Práce přinesla porovnání stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů pod mikroskopem a využití flowcytometrie.

Flowcytometrie je velmi přesnou metodou co se týče rozpoznání různých buněčných typů a také co se týče přesné analýzy velkého množství krevních elementů a stanovení podtypu ALL daného pacienta. Je však nákladná a méně dostupná. Imerzní mikroskopie je oproti tomu mnohem dostupnější, ale ne tak přesná kvůli lidské chybě způsobené nerozpoznáním přesné morfologie dané buňky. Je vhodné ji použít na počátku analýzy zdravotního stavu pacienta, jelikož umožňuje poměrně rychlé zjištění přítomného problému. Mikroskopická analýza tak následně může získat větší prostor pro rozvoj svého potenciálu a zabývat se morfologií buněk daného pacienta ve větší míře a sbírat o vzorku pacienta další poznatky, které by se následně mohly využít například ve stádiu léčby pacienta.

6.4.2 Upřednostnění flowcytometrie při hodnocení počtu a mikroskopie při hodnocení morfologie

Jak již bylo zmíněno výše, flowcytometrie je ideální diagnostickou metodou ke zjištění počtů leukocytů přítomných v daných vzorcích periferní krve a kostní dřeně a jejich identifikaci. Dosahuje též přesnějších výsledků, než je tomu u stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů pod mikroskopem.

Na základě těchto poznatků a provedeného výzkumu si práce tedy klade otázku, zda by nebylo možné využít kapacitu laborantů a morfologů v laboratořích spíše k hlubšímu zkoumání morfologie krevních elementů přítomných ve vzorcích na úkor toho, že by se majoritní část počítání a určování elementů uskutečňovala za pomoci flowcytometru. Tento návrh by samozřejmě musel být podroben mnoha dalším studiím se zaměřením hlavně na to, jestli může mít specializace se na konkrétnější morfologii krevních elementů vzorku nějaké výraznější výhody například pro následnou léčbu pacienta. To tak prozatím zůstává otázkou pro další výzkum. Výsledkem prozatím zůstává, že ideální pro diagnostiku pacienta je kombinace obou těchto metod.

6.4.3 Základ pro další navazující výzkumy

Vzhledem k významnému množství získaných poznatků a zpracovaných dat tato práce může představovat odrazný můstek pro mnoho dalších studií. Nejenže byly položeny otázky například ohledně hlubšího využití imerzní mikroskopie při zkoumání morfologie buněk ve vzorcích, ale zároveň byla zohledněna i omezení, která je v následujících

výzkumech možné minimalizovat, a tento výzkum tak rozšířit o další cenná data a informace, které by mohly pomoci při diagnostice leukémií.

6.5 Návrhy do budoucna

Z výše zmíněných omezení tohoto výzkumu vyplývají různé návrhy pro jeho zlepšení a rozšíření o další aspekty, jež by mohly vést k lepšímu pochopení problematiky tohoto tématu.

6.5.1 Další diagnostické metody

V rámci této práce byly porovnávány pouze dvě diagnostické metody – a to konkrétně stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů pomocí imerzní mikroskopie vzorků a flowcytometrie. Při diagnostice ALL se však používají i přístroje a metody další. Je to především méně přesný, ale zato velmi rychlý a dostupný hematologický analyzátor a poté též náročná, ale esenciální cytogenetická a molekulárně genetická vyšetření daného pacienta. I tyto využívané metody by mohlo být přínosné prozkoumat a porovnat jejich výhody a nevýhody s ostatními.

6.5.2 Vzorek pacientů

Uskutečněný výzkum zohledňoval pouze 32 dětských pacientů z let 2022 a 2023 s místem narození jen na poměrně malém území veškeré rozlohy obyvatelného území Země. V následujících výzkumech by bylo vhodné mít početně o něco větší vzorek pacientů, kteří by zároveň byli diagnostikováni ve větším časovém intervalu. Zároveň by k úplnosti dalších výzkumů přispělo i zohlednění pacientů z širšího území, a důležité by mohlo být i to vzít v úvahu pacienty dospělé.

6.5.3 Typ onemocnění

Porovnávané diagnostické metody neslouží v klinické praxi pouze k diagnostice akutní lymfoblastické leukémie, ale i k diagnostice jiných onemocnění. Mezi těmi hlavními jsou další typy leukémie, například AML. Mimo to se stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů používá i třeba při diagnostice infekční mononukleózy, či při jiných patologických stavech pacientů vedoucích ke změně počtů určitého z typů leukocytů. Vzhledem k tomu, že každé onemocnění je svým způsobem a projevy unikátní, jednotlivé diagnostické metody mohou být pro jeho diagnostiku lepší, nebo naopak horší volbou. I toto by mohly v budoucnu další navazující studie zkoumat a tyto uvažované metody porovnávat na vzorcích pacientů diagnostikovaných s odlišným onemocněním.

7 ZÁVĚR

V rámci této práce byly splněny všechny z hlavních i vedlejších cílů stanovených výše. Došlo k naučení se mikroskopování s imerzním olejem vzorků periferní krve i kostní dřeně a k osvojení si schopnosti rozpoznat jednotlivé typy krevních buněk (i trombocytů) fyziologicky přítomných v periferní krvi pod mikroskopem. Zpracování práce také vedlo k naučení se rozpoznat lymfoblasty periferní krve a kostní dřeně od ostatních typů leukocytů a v těchto vzorcích i stanovit diferenciální rozpočet leukocytů. V průběhu zpracování hlavního cíle práce došlo k porovnání dvou metod analýzy krevních vzorků využívaných při diagnostice ALL, a to konkrétně za pomoci srovnání počtu lymfoblastů ve vstupních vzorcích periferní krve a kostní dřeně za využití stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů pod mikroskopem a metody flowcytometrie. Též byla vytvořena brožurka pro pozorování periferní krve pod mikroskopem pro studenty lékařských fakult a další zájemce o toto téma, přičemž odkaz na ni je přiložen v příloze.

Ze získaných dat od dětských pacientů vyplývá, že ALL postihuje častěji pacienty mužského pohlaví a pacienty předškolního věku. V periferní krvi i v kostní dřeni bylo také zjištěno průměrně více blastů v poměru k ostatním leukocytům, přičemž v kostní dřeni bylo zastoupení blastů ještě větší. Druhé nejdominantnější zastoupení pak ve vzorcích periferní krve představovaly lymfoblasty. Samotné porovnání metod imerzní mikroskopie barvených vzorků a flowcytometrie potvrdilo, že se tyto metody ve svých výsledcích jistým způsobem liší. Zatímco mikroskopie je ideální při pozorování patologií v morfologiích jednotlivých krevních elementů, při přesném stanovení množství jednotlivých typů leukocytů vykazuje o něco větší chybovost. Přesné počty je však schopná doplnit flowcytometrie, která ale na rozdíl od mikroskopie neklade na morfolologii krevních elementů takový důraz.

Výsledky této práce ukazují, že je stále důležité využívat stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů pod mikroskopem i metodu flowcytometrie. Imerzní mikroskopie je totiž o něco dostupnější a je možné provést ji poměrně rychle a bez velkých nákladů, navíc je pod mikroskopem přítomnost různých patologií dobře prokazatelná. Po získání podezření na výskyt nějaké patologie, zde především ALL, je ovšem ideální stanovení přesného množství typů leukocytů pomocí flowcytometrie a následné určení podtypu ALL, v čemž je flowcytometrie velmi přesná. V průběhu výzkumu se ovšem částečně ukazovalo, že mikroskopie by mohla mít i další potenciál, než pouhé počáteční zkoumání vzorku – morfologie různých krevních elementů by toho totiž mohla o zdravotním stavu pacienta říct ještě o něco víc. Různé konsekvence tohoto přístupu k mikroskopii by však potřebovaly další rozsáhlejší výzkum, který by tyto domněnky mohl potvrdit, nebo naopak vyvrátit a začít klást na mikroskopii menší důraz.

Tato práce významně přispěla k pochopení důležitosti různých diagnostických metod využívaných u pacientů s ALL. Tento výzkum je do budoucna možné rozšířit o větší množství dětských pacientů diagnostikovaných s ALL z jiných let, než jsou roky 2022 a 2023, nebo i o pacienty ze zkoumaných let, ale diagnostikovaných v jiných

nemocnicích. Dále je též možné do navazujícího výzkumu zahrnout i dospělé pacienty s ALL a porovnat efektivitu v této práci zkoumaných metod diagnostiky – mikroskopování a flowcytometrie – u ALL, která se od té dětské může v různých aspektech lišit. Mimo to by mohlo být přínosné podobný výzkum provést i u jiných typů leukémie, jako je například AML.

Výsledky této práce přinesly nové poznatky v oblasti diagnostiky akutní lymfoblastické leukémie u dětí a mohou být zakomponovány do rozhodování o vhodnosti využití mikroskopie a flowcytometrie při diagnostice tohoto onemocnění, čímž mohou přispět k optimalizaci metod diagnostiky v klinické praxi.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A INTERNETOVÝCH ZDROJŮ

AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019. *Treating Cancer with Immunotherapy | Types of Immunotherapy* [online] [vid. 2025-01-18]. Dostupné z: <https://www.cancer.org/cancer/managing-cancer/treatment-types/immunotherapy/what-is-immunotherapy.html>

AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020. *What are Stem Cells? | Where do Stem Cells Come From?* [online] [vid. 2025-01-18]. Dostupné z: <https://www.cancer.org/cancer/managing-cancer/treatment-types/stem-cell-transplant/why-stem-cell-transplants-are-used.html>

AMERICAN CANCER SOCIETY, 2024a. *How Radiation Therapy Is Used to Treat Cancer* [online] [vid. 2025-01-18]. Dostupné z: <https://www.cancer.org/cancer/managing-cancer/treatment-types/radiation/basics.html>

AMERICAN CANCER SOCIETY, 2024b. *Targeted Therapy Drugs for Acute Lymphocytic Leukemia (ALL)* [online] [vid. 2025-01-18]. Dostupné z: <https://www.cancer.org/cancer/types/acute-lymphocytic-leukemia/treating/targeted-therapy.html>

BELURKAR, Sushma, Himabindu MANTRAVADI, Chethan MANOHAR a Annamma KURIEN, 2013. Correlation of morphologic and cytochemical diagnosis with flowcytometric analysis in acute leukemia. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* [online]. 9(1), 71 [vid. 2025-01-28]. ISSN 0973-1482. Dostupné z: doi:10.4103/0973-1482.110378

BETTS, J. Gordon, Kelly A. YOUNG, James A. WISE, Eddie JOHNSON, Brandon POE, Dean H. KRUSE, Oksana KOROL, Jody E. JOHNSON, Mark WOMBLE a Peter DESAIX, 2013a. *18.3 Erythrocytes - Anatomy and Physiology | OpenStax* [online]. B.m.: OpenStax [vid. 2025-04-14]. Dostupné z: <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology-2e/pages/18-3-erythrocytes>

BETTS, J. Gordon, Kelly A. YOUNG, James A. WISE, Eddie JOHNSON, Brandon POE, Dean H. KRUSE, Oksana KOROL, Jody E. JOHNSON, Mark WOMBLE a Peter DESAIX, 2013b. *18.4 Leukocytes and Platelets - Anatomy and Physiology | OpenStax* [online]. B.m.: OpenStax [vid. 2025-04-14]. Dostupné z: <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology-2e/pages/18-4-leukocytes-and-platelets>

BLOOD SMEARS LAB, bez roku. *Blood Smears Lab* [online] [vid. 2025-01-04]. Dostupné z: https://medcell.org/tbl/blood_smears/reading.php

GLOBOCAN 2022, 2022. *Cancer Today* [online] [vid. 2025-01-04]. Dostupné z: <https://gco.iarc.who.int/today/>

GUPTA, Srishti, Tathagata CHATTERJEE, Sanjeevan SHARMA, Ajay SHARMA, Prosenjit GANGULY, Jasjit SINGH a Satyaranjan DAS, 2016. Flowcytometric comparative analysis in acute leukemias between Indian and proposed minimal screening panel. *Medical Journal, Armed Forces India* [online]. 72(3), 220–230 [vid. 2025-01-28]. ISSN 0377-1237. Dostupné z: doi:10.1016/j.mjafi.2016.01.002

HOFFBRAND, A.V., P.A.H. MOSS a J.E. PETTIT, 2006a. Chapter 10: The aetiology and genetics of haematological malignancies. In: *Essential Haematology*. 5. B.m.: Blackwell Publishing. ISBN 978-1-4051-3649-5.

HOFFBRAND, A.V., P.A.H. MOSS a J.E. PETTIT, 2006b. Chapter 12: Acute Leukaemias. In: *Essential Haematology*. 5. B.m.: Blackwell Publishing. ISBN 978-1-4051-3649-5.

CHENNAMADHAVUNI, Adithya, Varun LYENGAR, Shiva Kumar R. MUKKAMALLA a Alex SHIMANOVSKY, 2025. Leukemia. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2025-04-14]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560490/>

ISHIDA, Cecilia, Muhammad ZUBAIR a Vikas GUPTA, 2025. Molecular Genetics Testing. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2025-01-18]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560712/>

KRAHULOVÁ, Markéta a Jiří VORLÍČEK, 1998. *AKUTNÍ LEUKEMIE Informace pro pacienty a jejich blízké* [online]. ISBN 80-210-1783-X. Dostupné z: <https://www.fnbrno.cz/areal-bohunce/interni-hematologicka-a-onkologicka-klinika/akutni-leukemie/t1282>

LF UPOL, bez roku. *Odběr periferní krve* [online]. bez roku. Dostupné z: http://old.lf.upol.cz/fileadmin/user_upload/LF-kliniky/hippokrat/Pracoviste/Hematologie/06_Odber_periferni_krve.pdf

MCKINNON, Katherine M., 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology* [online]. 120, 5.1.1-5.1.11 [vid. 2025-01-04]. ISSN 1934-3671. Dostupné z: doi:10.1002/cpim.40

MZČR, bez roku. *Průtoková cytometrie* [online] [vid. 2025-01-05]. Dostupné z: https://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS3/hypertext/AJDJU.htm

NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2011. *Definition of cytogenetics - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI* [online] [vid. 2025-01-18]. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/cytogenetics>

ON THIS DAY, bez roku. Famous People who Died of Leukemia. *On This Day* [online] [vid. 2025-02-23]. Dostupné z: <https://www.onthisday.com/people/cause-of-death/leukemia>

PANDEY, Dr Vanita, 2021. Flow cytometry diagnosis of acute leukemia and comparison of cytomorphological diagnosis with Flow cytometry diagnosis. *International Journal of Clinical and Diagnostic Pathology* [online]. 4(1), 04–09 [vid. 2025-01-28]. ISSN 2617-7234. Dostupné z: doi:10.33545/pathol.2021.v4.i1a.315

PECKA, Miroslav a ET AL., 2010. MORFOLOGICKÁ VYŠETŘENÍ. In: *PRAKTICKÁ HEMATOLOGIE Laboratorní metody*. první. Český Těšín: Nakladatelství Infiniti art, s.r.o., s. 343 stránek. ISBN 978-80-903871-9-5.

PFIZER, bez roku. *Leukemia Overview: Symptoms, Signs, Treatment and Causes* | Pfizer [online] [vid. 2025-01-06]. Dostupné z: <https://www.pfizer.com/disease-and-conditions/leukemia>

PUCKETT, Yana a Onyee CHAN, 2025. Acute Lymphocytic Leukemia. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2025-01-26]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459149/>

SACHER, Robert, 2000. Microscope Immersion Oil. *Microscopy Today* [online]. **8**(8), 33–35 [vid. 2025-01-05]. ISSN 2150-3583, 1551-9295. Dostupné z: [doi:10.1017/S1551929500060442](https://doi.org/10.1017/S1551929500060442)

SALVARIS, Ross a Pasquale Luke FEDELE, 2021. Targeted Therapy in Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Journal of Personalized Medicine* [online]. **11**(8), 715 [vid. 2025-01-18]. ISSN 2075-4426. Dostupné z: [doi:10.3390/jpm11080715](https://doi.org/10.3390/jpm11080715)

SINO BIOLOGICAL, bez roku. *Cluster of Differentiation (CD) Antigens* | Sino Biological [online] [vid. 2025-01-18]. Dostupné z: <https://www.sinobiological.com/research/cd-antigens>

SUNY OER SERVICES, ANATOMY & PHYSIOLOGY I & II – OLI, bez roku. *Erythrocytes* | *Anatomy and Physiology II* [online] [vid. 2025a-01-03]. Dostupné z: <https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/erythrocytes/>

SUNY OER SERVICES, ANATOMY & PHYSIOLOGY I & II – OLI, bez roku. *Leukocytes and Platelets* | *Anatomy and Physiology II* [online] [vid. 2025b-01-03]. Dostupné z: <https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/leukocytes-and-platelets/>

TARÁBEK, Pavol, Petra ČERVINKOVÁ a A KOLEKTIV, 2006. 6.2 Zobrazování optickými soustavami. In: *Odmaturuj z fyziky*. druhé. Brno: Nakladatelství DIDAKTIS. ISBN 80-7358-058-6.

ÚZIS ČR, bez roku. kostní dřev | NZIP. *NZIP.cz* [online] [vid. 2025a-01-05]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/2943>

ÚZIS ČR, bez roku. periferní krev | NZIP. *NZIP.cz* [online] [vid. 2025b-01-05]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/5054>

WANG, Gufeng a Ning FANG, 2012. Chapter four - Detecting and Tracking Nonfluorescent Nanoparticle Probes in Live Cells. In: P. Michael CONN, ed. *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Academic Press, Imaging and Spectroscopic Analysis of Living Cells, s. 83–108 [vid. 2025-01-06]. Dostupné z: [doi:10.1016/B978-0-12-391857-4.00004-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391857-4.00004-5)

YALE MEDICINE, bez roku. Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *Yale Medicine* [online] [vid. 2025a-01-18]. Dostupné z: <https://www.yalemedicine.org/conditions/acute-lymphoblastic-leukemia-all>

YALE MEDICINE, bez roku. Acute Myeloid Leukemia (AML). *Yale Medicine* [online] [vid. 2025b-01-18]. Dostupné z: <https://www.yalemedicine.org/conditions/acute-myeloid-leukemia-aml>

YALE MEDICINE, bez roku. Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Yale Medicine* [online] [vid. 2025c-01-18]. Dostupné z: <https://www.yalemedicine.org/conditions/chronic-lymphocytic-leukemia-cll>

YALE MEDICINE, bez roku. Chronic Myeloid Leukemia (CML). *Yale Medicine* [online] [vid. 2025d-01-18]. Dostupné z: <https://www.yalemedicine.org/conditions/chronic-myeloid-leukemia-cml>

9 SEZNAM OBRÁZKŮ, GRAFŮ A TABULEK

Seznam obrázků

Obr. 1: Hematopoéza (zdroj: https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/hematopoietic-tissue)	13
Obr. 2: Popis mikroskopu (zdroj: autor).....	22
Obr. 3: Mikroskopování s imerzním olejem (zdroj: autor)	23
Obr. 4: Vzorek s kyselou fosfatázou (zdroj: atlas ODHB FN Brno)	24
Obr. 5: Vzorek s PAS (zdroj: atlas ODHB FN Brno)	25
Obr. 6: Vzorek s myeloperoxidázou (zdroj: atlas ODHB FN Brno).....	26
Obr. 7: Princip flowcytometrie (zdroj: autor)	27
Obr. 8: Krevní nátěr (zdroj: autor)	33
Obr. 9: HEMA AUTO STAINER ~ přístroj pro barvení krevních vzorků (zdroj: autor)	34
Obr. 10: Použitý světelný mikroskop ~ pohled zepředu (zdroj: autor)	36
Obr. 11: Použitý světelný mikroskop ~ pohled z boku (zdroj: autor).....	36
Obr. 12: Použitý objektiv se zvětšením 100× (zdroj: autor).....	36
Obr. 13: Krabička se vzorky pacienta ~ ilustrativní, smyšlený pacient (zdroj: autor)....	37
Obr. 14: Vzorek periferní krve (vlevo) a kostní dřeň (vpravo) (zdroj: autor)	37
Obr. 15: Vzorek periferní krve (vlevo) a kostní dřeň (vpravo) (zdroj: autor)	37
Obr. 16: Nanesení imerzního oleje na sklíčko (zdroj: autor).....	38
Obr. 17: Pozice objektivu při mikroskopování (zdroj: autor).....	38
Obr. 18: Meandrovitý pohyb při mikroskopování (zdroj: autor)	39
Obr. 19: Erytrocyty (zdroj: autor)	39
Obr. 20: Retikulocyt (zdroj: autor).....	40
Obr. 21: Hypochromický erytrocyt (zdroj: autor).....	40
Obr. 22: Terčovitý erytrocyt (zdroj: autor).....	40
Obr. 23: Anizocytóza (zdroj: autor)	41
Obr. 24: Bazofilní tečkování (zdroj: autor)	41
Obr. 25: Echinocyt (zdroj: autor)	41
Obr. 26: Trombocyty (zdroj: autor).....	41
Obr. 27: Neutrofilní segmenty (zdroj: autor).....	42
Obr. 28: Neutrofilní tyče (zdroj: autor)	42
Obr. 29: Lymfocyty (zdroj: autor)	43
Obr. 30: Reaktivní lymfocyty (zdroj: autor).....	43
Obr. 31: Monocyty (zdroj: autor).....	43
Obr. 32: Eosinofily (zdroj: autor).....	44
Obr. 33: Basofily (zdroj: autor).....	44
Obr. 34: Blasty (zdroj: autor).....	44
Obr. 35: Holá jádra ~ jaderné stíny (zdroj: autor).....	45
Obr. 36: Apoptotické buňky (zdroj: autor).....	45

Obr. 37: Přebytké barvivo (zdroj: autor).....	45
Obr. 38: Počítadlo (zdroj: autor)	46
Obr. 39: Blasty (hodnocený pacient, zdroj: ODHB FN Brno)	47
Obr. 40: Lymfocyty (hodnocený pacient, zdroj: ODHB FN Brno)	47
Obr. 41: Neutrofilní segmenty (hodnocený pacient, zdroj: ODHB FN Brno)	47
Obr. 42: Neutrofilní tyč (hodnocený pacient, zdroj: ODHB FN Brno)	48
Obr. 43: Monocyty (hodnocený pacient, zdroj: ODHB FN Brno)	48
Obr. 44: Eosinofily (hodnocený pacient, zdroj: ODHB FN Brno)	48
Obr. 45: Basofily (hodnocený pacient, zdroj: ODHB FN Brno)	49
Obr. 46: Počítadlo (zdroj: autor)	49
Obr. 47: Blasty (hodnocený pacient, zdroj: ODHB FN Brno)	50
Obr. 48: Navázání monoklonálních protilátek s fluorochromy na antigeny buňky (zdroj: autor).....	51
Obr. 49: Zobrazení dat z flowcytometru („dot plot” histogram; podle dat zpracovaných ve FN Brno) – fyziologický vzorek (zdroj: autor)	53
Obr. 50: Zobrazení dat z flowcytometru („dot plot” histogram; podle dat zpracovaných ve FN Brno) – patologický vzorek T-ALL (zdroj: autor)	54

Seznam grafů

Graf 1: Věk pacientů při diagnostice.....	56
Graf 2: Pohlaví diagnostikovaných.....	57
Graf 3: Průměrný počet jednotlivých typů leukocytů v periferní krvi diagnostikovaných pacientů.....	58
Graf 4: Poměr jednotlivých typů leukocytů v periferní krvi diagnostikovaných pacientů	59
Graf 5: Množství blastů v periferní krvi diagnostikovaných pacientů.....	59
Graf 6: Průměrný počet jednotlivých typů leukocytů v kostní dřeni diagnostikovaných pacientů.....	60
Graf 7: Poměr jednotlivých typů leukocytů v kostní dřeni diagnostikovaných pacientů.....	60
Graf 8: Množství blastů v kostní dřeni diagnostikovaných pacientů	61
Graf 9: Porovnání množství blastů v periferní krvi získaných z mikroskopování a z flowcytometrie.....	62
Graf 10: Porovnání množství blastů v kostní dřeni získaných z mikroskopování a z flowcytometrie	63
Graf 11: Porovnání množství blastů při diagnostice v periferní krvi a v kostní dřeni	64
Graf 12: Porovnání směrodatných odchylek periferní krve a kostní dřene.....	65
Graf 13: Porovnání průměru směrodatných odchylek u periferní krve a kostní dřene...65	

Seznam tabulek

Tab. 1: Nejčastější genetické abnormality u ALL	29
Tab. 2: Zkoumané CD antigeny u ALL a jejich funkce	52
Tab. 3: Zkoumané cytoplazmatické antigeny u ALL a jejich výskyt u určitého podtypu ALL	52
Tab. 4: Pohlaví, rok narození a věk diagnostikovaných pacientů.....	55

10 DODATEČNÉ MATERIÁLY

Příloha 1: Žádost o sběr dat	80
Příloha 2: Žádost o sběr dat	81
Příloha 3: Práce s mikroskopem.....	82
Příloha 4: FN Brno – ODHB	82
Příloha 5: Brožurka k mikroskopování periferní krve (Odkaz na Google Drive)	83

ŽÁDOST O SBĚR DAT/POSKYTNUTÍ INFORMACE PRO STUDIJNÍ ÚČELY
v souvislosti se závěrečnou diplomovou (odbornou) prací studentů škol

Vyplňuje žadatel:

Jméno a příjmení žadatele: Nela Bartoníčková.....
Datum narození: 13.12.2006..... Telefon: +420 737 751 475..... E-mail: nbartonickova.nb@gmail.com.....
Adresa trvalého bydliště: U Dubu 27, 644 00 Brno.....
Přesný název školy/fakulty: Gymnázium Matyáše Lercha, Žižkova 55, 616 00 Brno.....
Obor studia: všeobecný.....

Vyplňte, prosím, zodpovědně a úplně všechny údaje a otázky. **Správnou odpověď zakřičkujte!**

Forma studia: ☒ prezenční ☐ kombinovaná

Téma závěrečné práce: Akutní lymfoblastická leukemie u dětí.....

Účel žádosti:

- ☐ sběr dat/zjišťování informací pro zpracování diplomové/bakalářské práce
☐ sběr dat/zjišťování informací pro zpracování seminární/odborné práce
☒ sběr dat/zjišťování informací pro jiný účel: (uveďte): SOC (Středoškolská odborná činnost)

Vedoucí práce (jméno a příjmení vedoucího práce a název školy/instituce, ve které je zaměstnán)

..... MUDr. Veronika Fírmolová, PhD., FN Brno.....

Žadatel je zaměstnancem/rodinným příslušníkem zaměstnance FN Brno:

- ☐ ANO Pracoviště/Jméno zaměstnance FN Brno: ☒ NE
(informace slouží k posouzení žádosti v případě dotazníkové akce – benefit pro zaměstnance FN Brno a rodinné příslušníky)

Požadavek na (zaškrtněte):

V případě, že žadatel potřebuje získat informaci o počtech vyšetření/ošetření a **předem má souhlas konkrétního pracoviště**, že tato data mu budou poskytnuta vedením tohoto pracoviště bez nutnosti jeho nahlížení do zdravotnické dokumentace pacientů, vyplní oddíl „Ostatní – statistická data“. Jinak vyplní oddíl „Nahlížení do zdr. dokumentace“.

☐ **Dotazníková akce** ☐ pro pacienty FN Brno ☐ pro zaměstnance FN Brno

Počet respondentů, kteří budou vyplňovat dotazník:

Termín, kdy proběhne vyplnění dotazníků: od: do:

Pracoviště, kde bude dotazníková akce probíhat:

K vyplnění žádosti je nutno doložit vzor vašeho dotazníku!

☐ **Nahlížení do zdravotnické dokumentace**

Předpokládaný počet kusů zdravotnické dokumentace, do které bude žadatel nahlížet:

Termín, ve kterém bude žadatel nahlížet do zdravotnické dokumentace: od do

Pracoviště, ze kterého/kterých bude zdravotnická dokumentace pacientů:

Přesná specifikace, co bude žadatel vyhledávat ve zdravotnické dokumentaci:

☒ **Ostatní**

☐ kazuistika – počet:

☐ vedení rozhovoru s pacientem FN Brno – počet pacientů: z kterého pracoviště:

5-292/21/10

☐ vedení rozhovoru se zaměstnancem FN Brno – počet zaměstnanců: povolání:
z kterého pracoviště:

K vyplnění žádosti je nutno doložit vzor rozhovoru (orientační okruh otázek)!

☐ statistická data – informace o počtech např. zdravotnických výkonů, vyšetření, určité agendy (např. porodnost), přístrojích

☒ jiné (specifikujte): zkoumání vzorků krve pacientů

Za které období budou data zjišťována: ...za cca posledních deset let

Kdy proběhne sběr dat žadatelem: od: ...07 2024.....do: ...10 2024.....

Pracoviště, kde bude sběr dat probíhat: ...ODH FN Brno.....

Přesná specifikace, co bude žadatel zjišťovat: projevy akutní lymfoblastické leukemie u dětí ve zkoumaných vzorcích

Budete FN Brno uvádět jako „zdroj dat“ ve své práci?: ☒ ANO ☐ NE

Poučení: Žadatel bere na vědomí, získaná data mohou být použita pouze pro účel uvedený v této žádosti. Další nakládání s daty bez souhlasu FN Brno pro jiné účel je považováno za neoprávněné.

Žadatel souhlasí se zpracováním jeho osobních údajů dle zásad GDPR pro účely evidence této žádosti. Závazně se zavazuje zachovávat mlčenlivost o skutečnostech, o nichž se dozví v souvislosti s prováděným výzkumem a sběrem dat/informací. V případě, že žadatel uvádí FN Brno jako „zdroj informací“, je jeho povinností předložit zpracované výsledky ke schválení vedoucímu zaměstnání v příslušné podřízenosti příslušného zdravotnického náměstka FN Brno, který žádost o sběr dat poskytnutí informací ve FN Brno povolil. Prezentace výsledků s uvedením jména Fakultní nemocnice Brno je možná pouze s jeho souhlasem.

Vyplněnou Žádost odešlete do FN Brno:

a) elektronicky (bez vašeho podpisu, který je nahrazen tím, že odesíláte žádost ze své e-mailové adresy)
na adresu: Bastarova.Jana@fnbrno.cz

b) nebo v listinné formě (s vaším podpisem na žádosti) na adresu:
Fakultní nemocnice Brno
Oddělení organizace řízení – Jana Baštařová, Jihlavská 20, 625 00 Brno

Datum: ...11.06.2024..... Podpis: Nela Bartoničková

Příloha 2: Žádost o sběr dat



Příloha 3: Práce s mikroskopem



Příloha 4: FN Brno – ODHb



Příloha 5: Brožurka k mikroskopování periferní krve
([Odkaz na Google Drive](#))