

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

KARMEN DEŽMAN

DIPLOMSKA NALOGA

Visokošolski strokovni program
Laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2009

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

KARMEN DEŽMAN

**DIFERENCIALNA KRVNA SLIKA DOLOČENA S PET BARVNO
PRETOČNO CITOMETRIJO**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala v Specializiranem hematološkem laboratoriju na polikliniki v Ljubljani. Mikroskopski pregled krvnega razmaza ter statistično vrednotenje so opravili v hematološkem laboratoriju in na Kliničnem oddelku za hematologijo v Kliničnem centru v Ljubljani.

Zahvaljujem se doc. dr. Urošu Mlakarju, dr. med in do. Dr. Heleni Podgornik, univ. dipl. inž. kem. za pomoč in nasvete pri nastajanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi Darji Žontar, Ivani Nerad in Alenki Babnik, ki so mi pomagale pri delu z analizatorji in pri diferenciaciji s pomočjo mikroskopa.

Zahvaljujem se tudi svojim staršema za podporo in koristne nasvete skozi vsa leta šolanja.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Uroša Mlakarja, dr. med. in somentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem.

Ljubljana, junij, 2009

Predsednica diplomske komisije:

Član diplomske komisije:

I.	POVZETEK.....	I
II.	SEZNAM OKRAJŠAV	II
1	UVOD	1
1.1	KRVNE CELICE.....	1
1.1.1	Celice rdeče vrste	3
1.1.2	Trombociti in megakariociti	3
1.1.3	Celice bele vrste	3
1.2	KRVNA SLIKA	9
1.3	HEMATOLOŠKI ANALIZATORJI	9
1.3.1	Hematološki analizator Beckman Coulter LH 750.....	10
1.4	PRETOČNA CITOMETRIJA	12
1.5	POTREBE PO NOVIH METODAH DIFERENCIRANJA.....	15
2	NAMEN NALOGE.....	18
3	PREISKOVANCI IN METODE DELA.....	19
3.1	PREISKOVANCI	19
3.2	LABORATORIJSKE PREISKAVE.....	20
3.2.1	Določitev celotne krvne slike s hematološkim analizatorjem	20
3.2.2	Ocena diferencialne krvne slike z mikroskopom	21
3.2.3	Diferenciacija belih krvnih celic na pretočnem citometru.....	24
3.3	METODE	27
3.3.1	Podatki iz hematološkega analizatorja LH750	27
3.3.2	Podatki iz pretočnega citometra FC500	28
3.3.3	Statistična analiza	36
4	REZULTATI.....	37
4.1	PRIMERJAVA IZSLEDKOV VSEH TREH METOD	38
4.2	IZSLEDKI REZULTATOV PROUČEVANIH PARAMETROV DOBLJENIH IZ HEMATOLOŠKEGA ANALIZATORJA, MIKROSKOPA IN PRETOČNEGA CITOMETRA PRI NORMALNIH VZORCIH	41
4.2.1	Statistično vrednotenje proučevanih parametrov pri zdravi populaciji	42
4.3	IZSLEDKI IN REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE PROUČEVANIH PARAMETROV IZ HEMATOLOŠKEGA ANALIZATORJA, MIKROSKOPA IN PRETOČNEGA CITOMETRA PRI BOLNIKI Z ML	45
4.3.1	Statistično vrednotenje proučevanih parametrov pri bolnikih z B-KLL	47
4.4	IZSLEDKI PROUČEVANIH PARAMETROV IZ HEMATOLOŠKEGA ANALIZATORJA, MIKROSKOPA IN PRETOČNEGA CITOMETRA PRI BOLNIKI Z AL	50
5	RAZPRAVA.....	54
6	SKLEPI	57
7	LITERATURA	58
8	PRILOGA	59

I. POVZETEK

V splošnih in specializiranih laboratorijih se hemogrami rutinsko izdelujejo s pomočjo hematoloških analizatorjev, ki imajo zmožnost natančnega štetja petih vrst zrelih krvnih celic. Patoloških in abnormalnih celic analizator ne more opredeliti, zabeleži le opozorila in v takšnem primeru je potrebno pregledati razmaz venske krvi pod mikroskopom, kar je dokaj zamudna metoda. Zaradi vse večje potrebe po ročnih diferencialnih krvnih slikah, težnje po čim hitrejši izdaji izvida ter nenehni izboljšavi analizatorjev smo v naši diplomski nalogi za avtomatizacijo diferencialne krvne slike uporabili analizo na pretočnem citometru. S šestimi specifičnimi celičnimi označevalci smo skušali v enem koraku čim širše zajeti populacije celic, ki so prisotne v venski krvi.

V raziskavo smo vključili zdrave preiskovance (15), bolnike s kronično limfocitno levkemijo (14), bolnike z neopredeljenim ne-Hodkinovim limfomom (2), bolnika z dlakastocelično levkemijo (1), bolnike z akutno mieloblastno levkemijo različnih podvrste (9), dva bolnika z akutno limfoblastno levkemijo ter po enega bolnika s kronično mieloično levkenijo, levkopenijo, mikrocitno amenijo, aktivno sarkoidozo, avtoimunske trombocitopenije in infektivno mononukleozo.

Naše rezultate smo primerjali z rezultati že rutinsko uveljavljenih metod, in sicer ročne DKS in DKS na hematološkem analizatorju. Statistično smo vrednotili le populacijo zdravih preiskovancev ter bolnikov z B-KLL, zaradi dovolj velikega števila vzorcev.

Rezultati našega dela so pokazali, da je naš pristop k avtomatski izdelavi DKS primeren za velike splošne laboratorije kot presejalna preiskava za zmanjšanje števila potrebnih ročnih diferencialnih slik. Neposredno bi lahko opravili dokončno imunofenotipizacijo pri bolnikih s kronično limfocitno levkemijo, zaznali smo prisotnost blastnih celic in določili ali pripadajo mieloični ali limfatični liniji ter zajeli populacijo nezrelih granulocitov. Ostalih patoloških celic, ki so tudi lahko prisotne v venski krvi, pa z našim načinom določanja nismo zaznali.

Pridobivanje rezultatov z analizatorji je hitrejše, odmerjanje reagentov natančnejše in poraba biološkega materiala manjša. Če pa imamo v vzorcih patološke celice, moramo vzorec nujno pregledati pod mikroskopom, da lahko te celice opredelimo.

II. SEZNAM OKRAJŠAV

PMC - pluripotentna matična celica
P-MC- nediferencirana hčerinska celica
MCL- matična celica limfatične vrste
MC-L- nediferencirana hčerinska celica
MMCM- multipotentna matična celica mieloične vrste
MMC-M- nediferencirana hčerinska celica
UMC- usmerjena matična celica
KLL- kronična limfocitna levkemija
NHL- nehodkinov maligni limfom
AML- akutna mieloblastna levkemija
ALL - akutna limfoblastna levkemija
DKS- diferencialna krvna slika
SHL- Specializiran hematološki laboratorij
PBS- puferirana fiziološka raztopina
KML- kronična mieloična levkemija
AT- avtoimunska trombocitopenija
IF- infektivna mononukleoza
MA- mikrocitna anemija
Ne%- delež nevtrofilnih granulocitov
Ly%- delež limfocitov
LyB%- delež limfocitov B
LyT%- delež limfocitov T
NK%- delež NK celic
Mo%- delež monocitov
Eo%- delež eozinofilcev
Ba%- delež bazofilcev
Blast%- delež blastov
Prom%- delež promielocitov
Mielo%- delež mielocitov
Meta%- delež metamielocitov
Pal. Gan.%- delež paličastih granulocitov

Nrbc%- delež normoblastov

Me- mediana

Q1, Q3- kvartili

LH- analiza s hematološkim analizatorjem

1 UVOD

1.1 Krvne celice

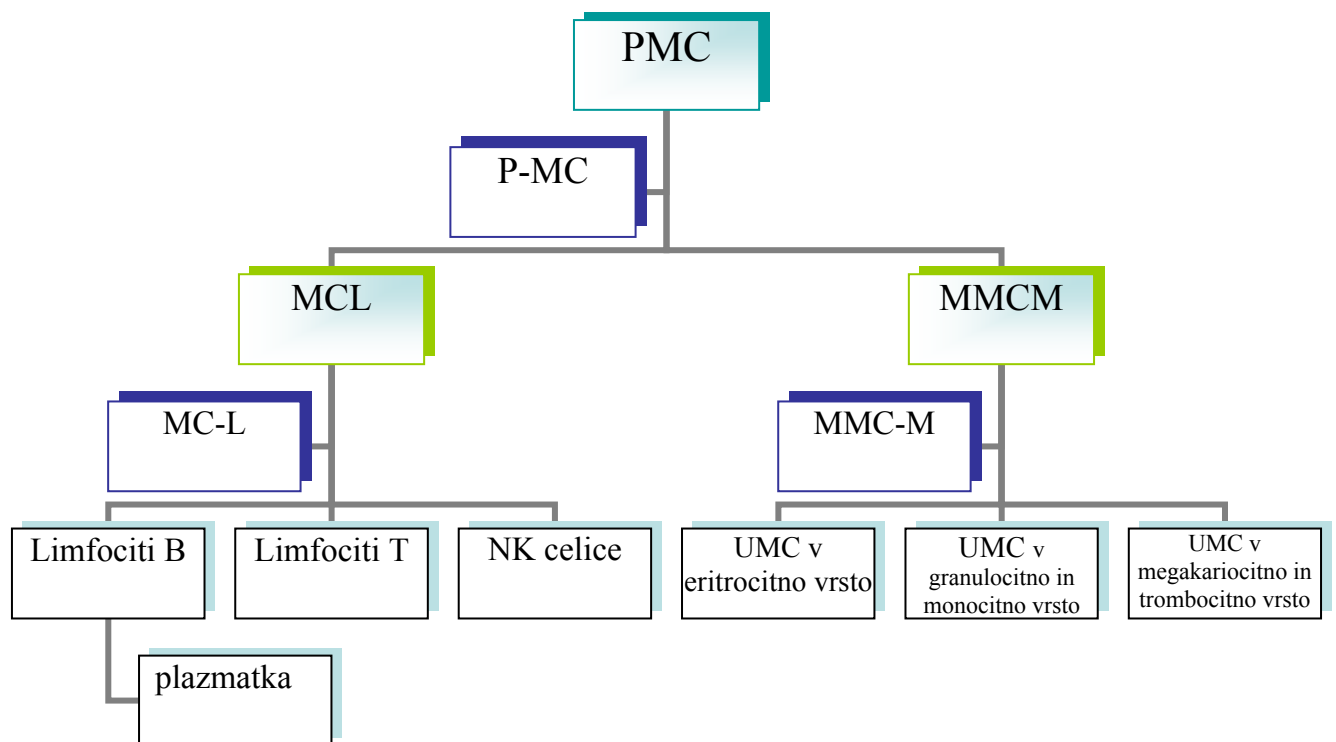
Vse krvne celice nastajajo pri človeku v krvotvornem ali hematopoetskem tkivu. Pri odraslem človeku sta to rdeči kostni mozeg in limfatično tkivo.

Izvor matičnih celic je kostni mozeg. Glavna lastnost matičnih celic je sposobnost samoobnove in s tem ohranitve svojih lastnosti in sposobnost dozorevanja v matične celice, ki so usmerjene v določeno vrsto krvnih celic.

Osnovna matična celica je pluripotentna (PMC). Z delitvijo se obnavlja, po drugi strani pa dozoreva v multipotentne. Poznamo dve vrsti multipotentnih matičnih celic, mieloično in limfatično. Multipotentna matična celica mieloične vrste (MMC-M) dozoreva v usmerjene matične celice (UMC) rdeče vrste, nevtrofilno-monocitne, eozinofilne in bazofilne vrste ter megakariocitno-trombocitne vrste. Iz teh se po več zaporednih delitvah in z dozorevanjem razvijejo zrele krvne celice, ki se izplavijo v kri. Iz multipotentne matične celice limfatične vrste (MCL) se razvijejo med posebnim procesom transformacije ki poteka v limfatičnem tkivu, limfociti vrste B in T ter NK celice.

Vsaka matična celica se deli na dve celici: ena ostane nediferencirana, druga pa se deli in diferencira naprej. Na tak način se v kostnem mozgu ohranjajo matične celice, iz katerih kasneje nastajajo vse krvne celice.

Nastajanje krvnih celic je natančno uravnano in omogoča stalno in enakomerno nadomeščanje propadlih krvnih celic (1).



Slika 1: Prikaz razvoja krvnih celic iz pluripotentne matične celice (PMC) do zrelih celic.

Legenda:

PMC - pluripotentna matična celica

P-MC- nediferencirana hčerinska celica

MCL- matična celica limfatične vrste

MC-L- nediferencirana hčerinska celica

MMCM- multipotentna matična celica mieloide vrste

MMC-M- nediferencirana hčerinska celica

UMC- usmerjena matična celica

Celice, ki so normalno prisotne v krvi

V krvi so normalno prisotne vse zrele celice, razen plazmatk. Od nezrelih celic najdemo normalno v krvi paličaste nevtrofilne granulocite (predstopnja nevtrofilcev), ki lahko predstavljajo 5% vseh levkocitov, ter retikulocite, ki jih je 5 do 15%(2).

1.1.1 Celice rdeče vrste

Eritrociti so zrele celice, ki se razvijejo iz multipotentne matične celice rdeče vrste. Njihova osnovna naloga je prenos kisika iz pljuč v obrobna tkiva. Vsebujejo encim karboanhidrazo, ki katalizira nastajanje in razpad ogljikove kisline tako sodelujejo tudi pri prenosu ogljikovega dioksida iz tkiv. Eritrociti so bikonkavni in zlahka spreminjajo obliko, kar jim omogoča neoviran prehod skozi kapilare. Njihovo število v krvi se ohranja v fizioloških mejah, ker stalno nastajajo in se izplavljajo iz kostnega mozga. Notranjost eritrocitov je izpolnjena s hemoglobinom (1).

1.1.2 Trombociti in megakariociti

Trombociti nastajajo iz megakariocitov, največjih celic v kostnem mozgu. Megakariociti po krvnem obtoku zapustijo kostni mozeg in se zagozdijo v pljučnih kapilarah. Tu z razpadom robnega dela citoplazme nastajajo trombociti. Velikost trombocitov je različna, odvisna od starosti celice in so brez jeder. V neaktivnem stanju so diskoidne oblike. Imajo poglavitno vlogo pri strjevanju krvi, sodelujejo pa tudi pri okvari tkiv in pri vnetju (1).

1.1.3 Celice bele vrste

Ime »bele krvne celice« izhaja iz dejstva, da po centrifugiranju krvnega vzorca med sedimentiranimi rdečimi krvnimi celicami in krvno plazmo ostane tanka plast celic, ki so bele barve. Znanstveni izraz levkociti neposredno odraža ta opis, ki izhaja iz grščine (*levkos-belo* in *kytos-celice*) (3).

Krvne celice bele vrste varujejo telo pred okužbami in rakastimi tvorbami. Normalno število levkocitov v periferni krvi je $4,0 \times 10^9/L$ – $10,0 \times 10^9/L$. Razen v krvi jih v velikem številu najdemo tudi v limfatičnem sistemu, vranici in drugih telesnih tkivih. Levkociti so celice z jedrom. Glede na obliko in velikost jedra ter videz celične citoplazme jih delimo na *granulocyte*, *monocyte* in *limfocyte* (1).

1.1.3.1 Granulociti

Granulociti so dobili ime po svojih značilnih zrnih (granulacijah) v citoplazmi. Granulacije v citoplazmi granulocitov so lahko nespecifične in specifične. Specifične granulacije so značilne za samo eno celično vrsto, medtem ko so nespecifične prisotne pri več celičnih vrstah. Poznamo tri vrste granulocitov, ki jih ločimo glede na vrsto. To so nevtrofilni granulociti ali nevtrofilci, eozinofilni granulociti ali eozinofilci in bazofilni granulociti ali bazofilci (1). Preglednica I prikazuje razdelitev granulocitov glede specifičnih granulacij.

Preglednica I: Prikaz razdelitve celičnih vrst granulocitov

CELICE GRANULOCITNE VRSTE	ZRELI GRANULOCITI	SPECIFIČNE GRANULACIJE
Celice nevtrofilne vrste	nevtrofilci	Svetlo rjave, modrikaste ali sive
Celice eozinofilne vrste	Eozinofilci	Oranžne ali rdeče
Celice bazofilne vrste	Bazofilci	Temno modre do vijoličaste

Prvotno se granulociti kot vse krvne celice, razvijejo iz PMC, nadaljnji razvoj do končno diferenciranega granulocita pa poteka po naslednjih stopnjah:

- mieloblast
- promielocit
- mielocit
- metamielocit
- paličasti granulocit
- segmentirani granulocit ali segmentiranec (1).

Mieloblast je prva celica granulocitne vrste, ki je velika okrog 15 do 20 μm . Jedro je okroglo ali nakazano ovalno ter lahko vsebuje od 2 do 5 jedrc. Struktura kromatina je rahla in mrežasta. Citoplazma je modre barve, ki pa je ob jedru svetlejša. V primerjavi z jedrom je citoplazme zelo malo in običajno ne vsebuje zrn (1).

Promielocit se preobrazi iz mieloblasta in je največja celica granulocitne vrste, saj lahko meri do 25 μm . Jedro je nekoliko upognjeno ali ovalno ter vsebuje kot mieloblast 2 do 5 jedrc. Struktura kromatina je podobna mieloblastovi, ponekod pa so že vidne začetne

zgoditve. Citoplazme je več kot pri mieloblastu in je svetlejša barve. V citoplazmi že najdemo posamezna zrnca (1).

Mielocit je manjši od predhodnika, jedro pa zavzema le še polovico celice, nukleoli so še lahko prisotni ali pa jih ni več. Po obliki je okroglo ali nakazano zažeto. Kromatin je zgoščen v grudah. V mlajših obdobjih je citoplazma še modrikasta v zrelejših pa rahlo rožnata, prevladujejo specifična zrnca. Mielociti so zadnja stopnja, ki se še deli. Naslednje celice torej le še dozorevajo (1).

Metamielocit ima upognjeno jedro v obliki podkve ali ledvice. Struktura kromatina je grobo grudasta. Citoplazma je rožnata in vsebuje številna specifična zrnca (1).

Paličasti granulocit nastane iz dozorelega metamielocita in sodi med zrele granulocite. Je okrogle oblike in velik približno 15 μm . Jedro je paličasto razpotegnjeno in upognjeno v obliki klobase. Struktura kromatina je grobo grudasta, citoplazma je rožnate barve, po celotni površini vsebuje specifična zrnca (1).

Segmentirani granulocit ali segmentiranec je končno diferenciran granulocit in glede na specifična zrnca ločimo 3 različne granulocite: nevtrofilce, eozinofilce in bazofilce (1).

Nevtrofilci so okrogle oblike in veliki približno 15 μm . Citoplazma je rožnate barve, po celotni površini vsebuje specifična zrnca. Jedro je segmentirano, ima 2-5 segmentov, segmenti so med seboj povezani s tanko nitko kromatina. Struktura kromatina je grobo grudasta. Predstavljajo 55-70% vseh levkocitov. Njihova glavna naloga je fagocitoza bakterij in mikrobov, delno pa tudi anorganskih snovi in nekaterih celic. Za razliko od eozinofilcev in bazofilcev se ti aktivno gibljejo, kar jim omogoča hiter dostop do vnetnih tkiv (1).

Eozinofilci so nekoliko večji od nevtrofilcev; ponavadi merijo 12-17 μm . Njihova citoplazma je nabito polna oranžnih zrn, tako da pogosto sploh ni vidna. Jedro ima običajno le 2 segmenta. Eozinofilcev je v krvi približno 1-3% glede na vse levkocite. Povečanje njihovega števila je lahko indikator alergije ali prisotnosti parazitov (1).

Bazofilci so najmanjši izmed granulocitov in merijo okoli 10-14 μm . Citoplazma je polna grobih, temnovijoličnih granulacij, ki običajno tudi zakrivajo jedro, ki ima le 2 segmenta. Ker so granule vodotopne, je mogoče zaslediti v citoplazmi vakuole. Bazofilcev je v krvi

zelo malo, saj predstavljajo le 0,5-1% vseh levkocitov. Njihove funkcije so preprečevanje strjevanja krvi s sproščanjem heparina ter sproščanje histamina pri vnetnih reakcijah (1).

MORFOLOŠKE NEPRAVILNOSTI GRANULOCITOV

Morfološke nepravilnosti granulocitov po vzroku nastanka delimo na podedovane in pridobljene.

Glede na mesto napake v celici pa razdelimo morfološke nepravilnosti granulocitov na:

- a) nepravilnosti v sestavi citoplazme
- b) nepravilnosti v zgradbi jeder

Najpogosteje najdemo nepravilnosti pri nevtrofilnih granulocitih (2).

a) Nepravilnosti v sestavi citoplazme

Döhlejeva telesca so najpogostejša pridobljena morfološka nepravilnost. So blede modra, okrogla ali ovalna telesca. Lahko jih vidimo pri okužbah, opeklinah, poškodbah in pri zdravljenju s citostatiki.

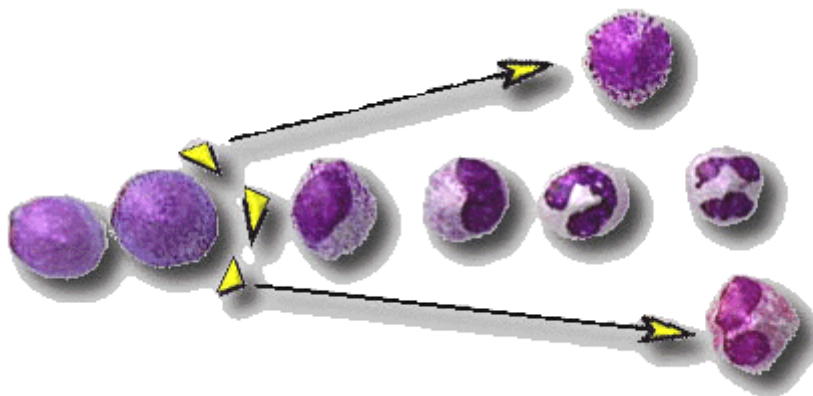
Toksične granulacije so pridobljene. So večja groba zrnca temno vijolične barve, ki so prisotne pri hudih okužbah.

Alder-Rellijeva anomalija se deduje recesivno. Pri tej bolezni gre za motnjo v presnovi polisaharidov. V citoplazmi granulocitov, pa tudi limfocitov in monocitov, so prisotna številna velika temnovijolična zrnca, podobna toksičnim granulacijam (2).

b) Nepravilnosti v sestavi jedra granulocitov

Pelger-Hüetova anomalija je podedovana nepravilnost, kjer je motena sinteza kromatina nevtrofilcev, zato jedra ne segmentirajo.

Hipersegmentacija granulocitov je nepravilnost, jedro se začne zažemati že pri promielocitu in mielocitu. Zreli granulociti imajo večje število segmentov od normalnih segmentiranih granulocitov, to je nad pet segmentov (2).



Slika 2: Razvojne stopnje granulocita.

1.1.3.2 Monocitna - makrofagna celična vrsta

V to skupino spadajo monociti in makrofagi. Monocit po prehodu v tkiva dozori v makrofag, imenovan tudi histiocit. Monociti predstavljajo 3-8% vseh belih celic.

Razvojne stopnje celic monocitno- makrofagne vrste so:

- monoblast
- promonocit
- monocit
- makrofag

Monoblast je velik od 16 do 22 μm . S panoptičnim barvanjem ga ne moremo zanesljivo ločiti od mieloblastov, lahko pa ga z imunološkimi celičnimi označevalci (1).

Promonocit je velik od 10 do 20 μm . Jedro je zgubano, podobno kakor možgani, zvito in lahko vsebuje več jedrc. Struktura kromatina je rahla. Citoplazma je modre ali sivomodre barve in lahko vsebuje redka azurofilna zrnca (nebesno modre barve) (1).

Monociti so različne velikosti, zato je njihov premer lahko od 15 do 40 μm .

Večinoma so okrogli z ravnim robom citoplazme, nekateri monociti pa imajo neraven rob citoplazme z eno ali večimi izboklinami. Citoplazma je svetlo sivo-modre barve, je obilna in vsebuje azurofilna zrnca, pogosto pa še vakuole. Jedro je ledvičasto ali podkvasto upognjeno, lahko je tudi paličasto in ima več režnjev ter ne vsebuje grud kromatina. Struktura kromatina je zelo rahla, čipkasta in škrlatne barve (1).

1.1.3.3 Celice limfocitne vrste

Limfociti oziroma celice limfocitne vrste predstavljajo 20-35% vseh levkocitov. Limfocite razdelimo v dve poglavitni skupini, limfocite B in T. Razvijejo se iz MCL v kostnem mozgu, kjer limfociti B tudi dozori, limfociti T in NK celice pa dozori v priželjcu. Dozorevanje in preobrazba zrelih limfocitov T poteka v sekundarnih limfatičnih organih, kot so bezgavke, vranica in drugo limfatično tkivo. Nastanejo veliki imunoblasti T, ki zore v imunocite T. Nekateri dozore do spominskih celic, drugi v T celice pomagalke, T celice zaviralke in T celice ubijalke. Po limfnem obtoku pa lahko preidejo iz sekundarnih limfatičnih organov v kri. Zreli limfociti B iz kostnega mozga preidejo v kri in sekundarne limfatične organe. Ob prisotnosti antigenov se zreli limfociti B preobrazijo v velike imunoblaste B, ta se deli in zori od plazmoblasta, proplazmocita v plazmatke.

Zaradi svojih sposobnosti uničevanja mikrobov in virusov predstavljajo limfociti glavni del obrambnih mehanizmov v specifični obrambi (1, 3).

Razvojne stopnje celic limfocitne vrste so

- limfoblast
- prolimfocit
- veliki limfocit
- mali limfocit

Limfoblast je prva razpoznavna celica limfocitne vrste. Meri od 15 do 20 μm . Jedro je okroglo ali ovalno in lahko vsebuje do dve jedrci. Struktura kromatina je drobno zrnata. Celica ima ozek rob svetlo modre citoplazme (1).

Prolimfocit je nekoliko manjši od limfoblasta, ima pa več citoplazme. Jedro ima bolj grob kromatin, jedrce pa je slabo vidno (1).

Veliki limfocit običajno meri 12-20 μm . Jedro je okroglo ali rahlo zažeto ter modre barve, z grudasto kromatinsko strukturo in vidnim nukleolom. Citoplazma je obilna, je svetlo modre barve in vsebuje azurofilna zrnca, včasih so prisotne tudi vakuole (1).

Mali limfocit je najmanjši levkocit in meri približno 7-12 μm . Večino celice zavzema jedro, ki je okroglo, ovalno ali nekoliko zažeto ter modre barve, z grudasto kromatinsko strukturo. Citoplazma, katera je omejena le na ozek rob okoli jedra, je modre barve in lahko vsebuje azurofilna zrnca (1).

Plazmatka je okrogla ali ovalna celica in meri od 12 do 20 μm . Jedro je okroglo ali ovalno, leži v enem polu celice (ekscentrično jedro) in vsebuje gost kromatin. Citoplazma je intenzivno modre barve in je ob jedru svetlejša. Lahko vsebuje vakuole, včasih tudi azurofilna zrnca ter majhne igličaste in romboidne tvorbe (1).

1.2 Krvna slika

Krvna slika oziroma hemogram je osnovna preiskava v medicini. Odlikuje jo dejstvo, da lahko zdravniki iz nje dobijo veliko koristnih podatkov, ki jih pravilno usmerjajo pri prepoznavanju različnih bolezni. Glede na osnovne krvne celične vrste lahko krvno sliko delimo na eritrocitno (rdečo), levkocitno (belo) in število trombocitov. Kadar je število celic izven referenčnih vrednosti, lahko sklepamo na različne bolezenske vzroke (1). Hemogram naredimo s pomočjo hematološkega analizatorja.

1.3 Hematološki analizatorji

Hematološki analizatorji omogočajo avtomatiziran pregled krvnih celic. Krvne celice štejejo in merijo njihove lastnosti s pomočjo električnih ali optičnih načinov detekcije ali pa s kombinacijo obeh načinov. Ker se krvne celice, ki so morfološko spremenjene, razlikujejo od normalnih, jih analizator ne more razlikovati. Zato moramo napraviti razmaz venske krvi. Še posebej, če sumimo na krvno bolezen. Nanjo lahko kaže nenormalno število posameznih vrst levkocitov, nenormalno število trombocitov, če imamo na izpisu hemograma opozorila, kot so slaba ločitev celičnih populacij, nepravilna lega ali dodatna populacija celic (1).

1.3.1 Hematološki analizator Beckman Coulter LH 750

Hematološki analizator Coulter LH 750 uporablja dva načina merjenja hematoloških parametrov:

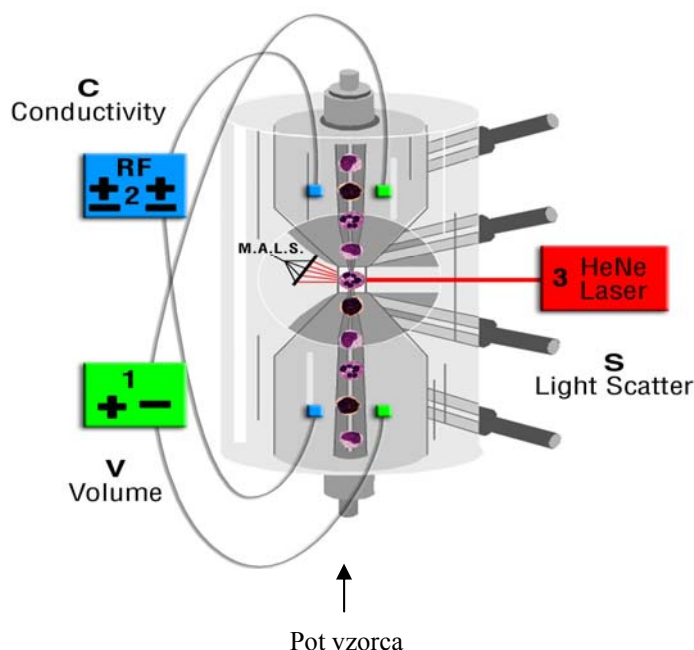
- z merjenjem upornosti merimo volumen in štejemo bele in rdeče krvne celice ter trombocite
- z VCS (*V: Volume, C: Conductivity, S: Scatter*) pretočno citometrijo določamo diferencialno belo krvno sliko, retikulocite in limfocitne podvrste
- fotometrično določa koncentracijo hemoglobina v vzorcu (4)

Hematološki analizator Coulter LH 750 deluje po naslednjih korakih:

1. vsrkavanje vzorca, mešanje in redčenje
2. elektro-optične analize z uporabo VSC tehnologije:
 - Določanje volumna celic z nizkofrekvenčnim tokom
 - Določanje prevodnosti z visokofrekvenčnim tokom
 - Merjenje sipane svetlobe (*light scattering*), ki uporablja vir svetlobe helij-neonski laser
3. zbiranje, shranjevanje in obdelava podatkov
4. analiza in prikaz podatkov (4)

1.3.1.1 Merjenje števila in velikosti celic

Celice analizator šteje in meri njihovo velikost tako, da meri spremembe v električni upornosti, ko celica v prevodnem mediju potuje skozi odprtino pretočne celice aparata (slika 1). Celice, ki so suspendirane v prevodnem mediju delujejo kot izolatorji, zaradi lipidnega dvosloja. Ko celice potujejo skozi odprtino naraste upornost med elektrodama potopljenima v celični suspenziji, ki sta na vsaki strani odprtine. Pri tem celica sproži impulz. Število impulzov pomeni število celic, jakost impulza pa velikost celice (4).



Slika 3: Pretočna celica pri VCS tehnologiji.

1.3.1.2 VCS tehnologija

Z VCS (*V*: Volume, *C*: Conductivity, *S*: Scatter) tehnologijo aparat določa diferencialno krvno sliko. VCS tehnologija uporablja nizkofrekvenčni tok za ugotavljanje volumna celice, visokofrekvenčni tok pa zaznava notranjo zgradbo celice z merjenjem spremembe v prevodnosti. Laserska svetloba se sipa na površini celice in v citoplazmi, iz česar aparat prepozna obliko in površinsko zgradbo celice ter granuliranost citoplazme(4).

Merjenje volumna

Volumen celice merimo z nizkofrekvenčnim tokom. Merimo spremembo upora, ki določa velikost celice. Celice so suspendirane v prevodnem mediju in se obnašajo kot izolatorji ter tako nudijo upor nizkofrekvenčnemu toku. Celica potuje preko odprtine in nadomesti volumen prevodnega medija z lastnim volumenom. Upornost se poveča in napetost pade. Spremembo napetosti zazna kot impulz, ki je sorazmeren velikosti celice (4).

Merjenje prevodnosti

Celična membrana deluje kot prevodnik za visokofrekvenčni tok. Tok ovirajo notranje strukture celice. Z merjenjem prevodnosti ugotavljamo notranjo zgradbo (granuliranost) celice (4).

Merjenje sipane svetlobe

Ko se laserski žarek usmeri v celico, se na njej svetloba sipa v vseh smereh. Sipana svetloba pada na dva detektorja, ki jo pretvarjata v električne impulze. Eden zbira žarke pod kotom 20° - 70° iz česar aparat določi notranjo zgradbo celice, drugi pa zbira žarke pod kotom 10° - 20° , iz česar aparat določi velikost celice (1, 4).

1.3.1.3 VCS parametri

Celice s podobnimi lastnostmi imajo podoben volumen (V), prevodnost (C) in razpršenost (S) ter tvorijo skupine na diagramu. Osmotsko nabrekanje in krčenje, ki je rezultat delovanja reagentov, je kinetična reakcija. Nanjo vplivajo temperatura, čas in koncentracija reagenta. Te spremenljivke povzročajo povečano ali zmanjšano nabrekanje, kar vpliva na lego populacij. Pozicijski parametri omogočajo, da dobimo populacije v pravi legi na diagramu (4).

1.4 Pretočna citometrija

Pretočna citometrija temelji na merjenju fluorescence celic in razpršenosti svetlobe. Sodobni pretočni citometri so zmožni analizirati več tisoč delcev vsako sekundo, kar nam da zanesljivo podobo o fizikalnih in biokemičnih lastnostih celic (5).

Za detekcijo v pretočni citometriji se uporabljajo fluorescenčne molekule, t.i. fluorokromi, vezane na protitelesa. Konjungirana monoklonska ali poliklonska protitelesa prepoznajo specifične receptorje na celicah, v našem primeru na vseh levkocitih, in se nanje vežejo. Ti receptorji so antigenske molekule in služijo kot celični označevalci. Njihova prisotnost je odvisna od razvojne stopnje celic. Celice lahko barvamo z dvema, tremi ali več vrstami monoklonskih protiteles. S tem prikažemo, katere kombinacije antigenov izražajo

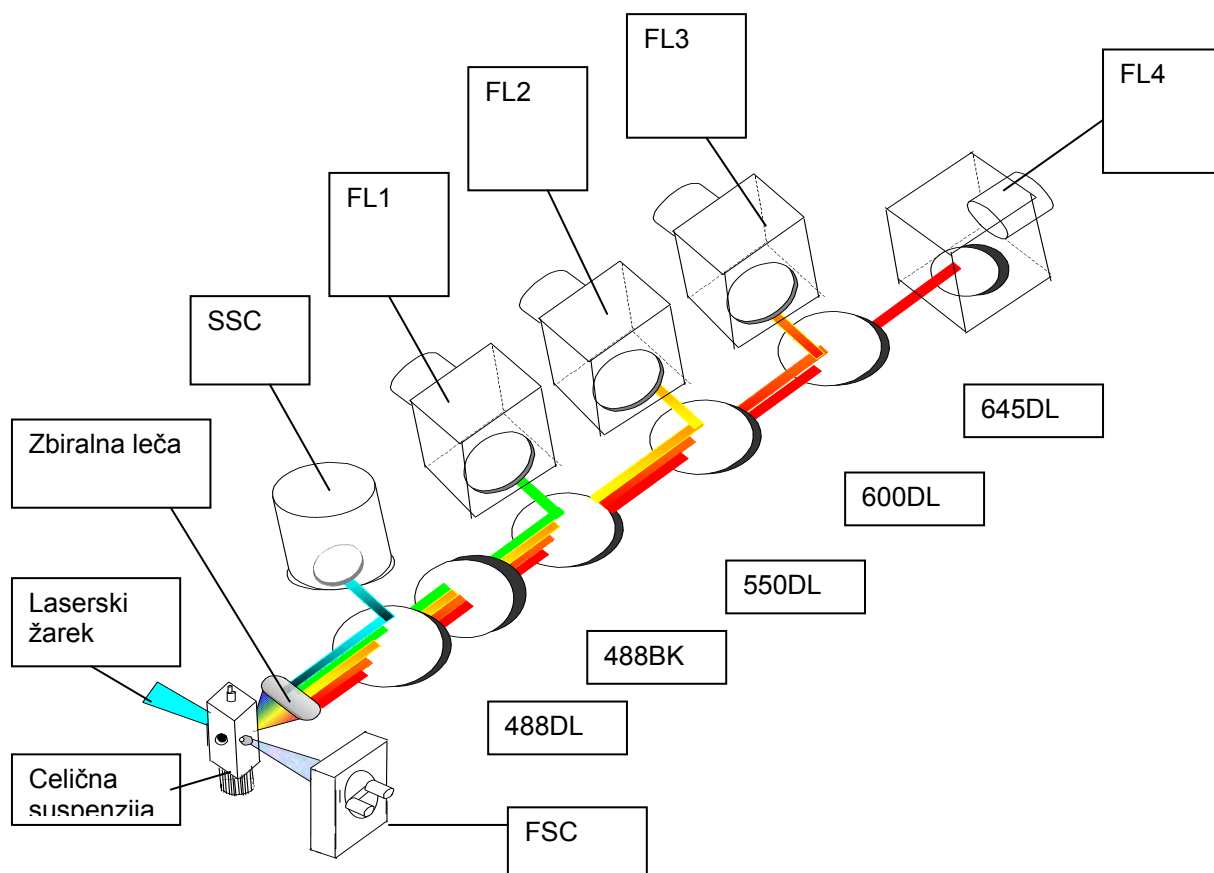
posamezne celice. Monoklonska protitelesa so glede na antigen, ki ga določajo, razvrščene v CD (*cluster of differentiation*) skupine (6, 7).

V pretočnem citometru celice ena za drugo potujejo skozi ozek snop svetlobe. Ko pride posamezna celica v območje svetlobnega žarka, se le-ta lahko odbije ali lomi, lahko pa se tudi absorbira v molekulah fluorokromnih barvil, ki so vezana na monoklonska protitelesa. Fluorokromi nato oddajo svetlobo večjih valovnih dolžin. Svetlobo, ki jo osvetljena celica odda, analizira sistem fotosprejemnikov.

Vir svetlobe, ki obseva celice, je laserski žarek. Pri prehodu snopa žarkov odda posamezna celica svetlobo, ki je odvisna od njenih lastnosti. Svetlobni signali, ki imajo enake valovne dolžine kot obsevalna (ekscitacijska) svetloba, nastajajo zaradi sipanja na celičnih strukturah.

Svetlobni signali, ki pa imajo večjo valovno dolžino kot obsevalna svetloba, nastajajo zaradi fluorescence.

Vse svetlobne signale zbirajo in selekcionirajo fotodetektorji preko sistema leč in filtrov(6).



Slika 4: Shematski prikaz pretočnega citometra.

Dva fotodetektorja merita količino razpršene svetlobe, ki jo odda obsevalna celica (oddana-emitirana svetloba je enaka vzbujevalni-ekscitacijski svetlobi).

Fotodetektor FSC (Forward Scatter) zazna razpršeno svetlobo iz smeri laserskega žarka, količina prejete svetlobe je sorazmerna velikosti celic.

Fotodetektor SSC (Side Scatter) zazna razpršeno svetlobo pravokotno od smeri laserskega žarka, količina prejete svetlobe je sorazmerna granularnosti celic. Granularnost celice je odraz količine in lastnosti membranskih struktur celice – lizosomov, endoplazmatskega retikuluma, fagosomov, citoplazemske in jedrne membrane. Poleg fotodetektorjev FSC in SSC ima pretočni citometer tudi več fluorescenčnih detektorjev (FL1, FL2,...), ki merijo svetlobo večjih valovnih dolžin od vzbujevalne (laserske) svetlobe. Pretočni citometri imajo običajno dva do šest fluorescenčne fotodetektorje, od katerih vsak prejema fluorescenčno svetlobo določene valovne dolžine, in na ta način meri signal, ki ga oddaja določeno fluorescenčno barvilo. Fotodetektorji pretvorijo svetlobne signale v električne.

Izmerjene vrednosti električnih signalov po računalniški obdelavi prikažemo v obliki točkovnih diagramov in/ali histogramov. O vsaki celici na ta način dobimo podatke o njeni relativni velikosti, granuliranosti in o vrstah in jakostih oddanih fluorescenčnih signalov (6).

1.5 Potrebe po novih metodah diferenciranja

Hematološki laboratoriji se dandanes zelo hitro spreminjajo in modernizirajo. Diferencialni avtomatski celični števci z novimi parametri zagotavljajo laboratorijem točnejše podatke, hitrejša analiza ter izboljšujejo delovno storilnost laboratorijev. Vse te novosti so v korist tako pacientom kot tudi sami kliniki. Kljub tem izpopolnjenim analiznim sistemom pa ostaja mikroskopski pregled krvnega razmaza bistvena preiskava v hematoloških laboratorijih. Razumevanje in razlaga krvne slike ima pomembno vlogo za postavitev diagnoze hematološke bolezni tako za zdravnika kot za laboratorijskega delavca, ki izvaja analize.

Pri mikroskopskem pregledu obarvanega krvnega razmaza opazujemo krvne celice in jih ocenjujemo glede oblike, velikosti, razčlenjenosti jedra, zgradbe kromatina, granulacij, obarvanosti citoplazme in zrn v citoplazmi ter vključkov v citoplazmi. Težava ročnega mikroskopiranja je v subjektivni oceni morfoloških značilnosti krvnih celic, kar privede do različnih rezultatov med opazovalci, zahteva pa tudi strokovno usposobljene osebe in nenehno usposabljanje le teh. Sama priprava krvnega razmaza in diferenciranje le tega zahtevata veliko časa. Da bi skrajšali čas, ki je potreben za oceno krvnega razmaza, na tržišča prihajajo vedno novejši in boljši analizatorji, ki avtomatsko naredijo in pobarvajo krvne razmaze, nekateri pa imajo tudi zmožnost prepoznavanja in razvrščanja celic v razrede (8).

Eden takšnih analizatorjev je tudi avtomatski digitalni morfološki analizator CELLAVISION® DM96. Sestavljen je iz skenirne enote in računalnika. Skenirna enota je sestavljena iz motoriziranega mikroskopa z visoko kakovostnim digitalnim fotoaparatom, ki zbira in v naprej opredeljuje krvne celice. Motoriziran mikroskop samodejno poišče celice na objektnem steklu in identificira morebitne bele krvne celice, ustvari digitalne slike in na osnovi programske opreme analizira celice. Analizirane celice razvrsti v 6

različnih razredov, in sicer nevtrofilce, eozinofilce, monocite, limfocite, ostalo (sem spadajo limfomske celice, atipični limfociti, blasti in tumorske celice) ter nediferencirane celice (neznane). Digitalne slike se prikažejo na računalniškem monitorju in vse celice iste vrste se prikažejo v enem preglednem zaslonu. Sistem tudi delno opredeli rdeče krvne celice (polikromazija, hipokromija, mikrocitoza, makrocitoza, poikilocitoza, anizocitoza) ter prikaže sliko ki omogoča oceno morfologije rdečih krvnih celic, mogoča pa je tudi ocena trombocitov. Vse slike in podatki se shranjujejo v celovito zbirko podatkov. Laboratorijski delavec lahko že obdelana stekelca nato proučuje na več načinov lahko pa poveča tudi posamezne celice za podrobnejši pregled. Vsi rezultati in digitalne slike se shranjujejo v bazi podatkov, zato je možno kasneje poiskati določenega bolnika ter tako slediti morfološkim spremembam krvnih celic v daljšem časovnem obdobju.

Nova zmožnost aparature je analiza ostalih telesnih tekočin, in sicer cerebrospinalne, pleuralne in sinovialne tekočine. Preparate vzorcev telesnih tekočin predhodno pripravimo s postopkom citocentrifugiranja ter jih pobarvamo. Pobarvana stekelca nato vstavimo v analizator. Hkrati lahko vstavimo 12 stekelc, v katerih analizator samodejno šteje celice in jih razvršča v zgoraj naštete skupine.

Bistvena prednost analizatorja pred ročnim diferenciranjem pa je, da le ta lahko analizira od 30 do 60 preparatov na uro, kar je neprimerljivo hitreje od ročnega mikroskopskega pregleda (8).

Nedavni razvoj novih večbarvnih pretočnih citometrov je sprožil vprašanja o možnosti diferenciacije belih krvnih celic na pretočnem citometru. Tako kot so v članku (9), ki je služil kot izhodišče pri naši diplomski nalogi, smo tudi mi poskušali v eni sami epruveti in s kombinacijo različnih protiteles v vzorcu venske krvi določiti diferencialno krvno sliko. Za pripravo vzorca in za analizo na pretočnem citometru smo porabili dobre pol ure časa.

Na podoben način so izvedli diferenciacijo bele krvne slike v eni epruvetki ter s kombinacijo šestih protiteles (10). Analizo so opravili le na tistih vzorcih, pri katerih je hematološki analizator zabeležil opozorila. Vzorce so predhodno lizirali. Z dodatkom barvila DRAQ5 so obarvali in zajeli le žive celice z jedri. Za detekcijo celic na pretočnem citometru so uporabili celične označevalce CD36, CD203, CD138, CD45, CD16 in CD56, za katere so ugotovili, da so dovolj zanesljivi celo za diferenciacijo patoloških vzorcev. Z

zajetjem celic, ki se ne barvajo z barvilom DRAQ5 v kombinaciji s protitelesom CD36, pa so določili tudi trombocite (10).

2 NAMEN NALOGE

Hemogrami se v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo rutinsko izdelujejo s hematološkim analizatorjem Coulter LH750, ki ima zmožnost natančnega štetja petih vrst zrelih krvnih celic, in sicer limfocitov, monocitov ter nevtrofilnih, eozinofilnih in bazofilnih granulocitov. Analizator je zasnovan tako, da nas opozori na morebitne abnormalne celice, oceniti pa jih ne more, ker je njihova morfologija zelo raznolika. Ko se pojavijo opozorila, je potrebno pregledati krvni razmaz. Zaradi vse večjega števila ročni diferencialnih slik, se pojavljajo potrebe po avtomatizaciji le teh.

V naši nalogi bomo skušali diferencialno belo krvno sliko določiti s pretočnim citometrom FC500. Vzorcju venske krvi bomo dodali šest specifičnih celičnih označevalcev, in sicer CD16-FITC, CD2-PE, CRTH2-PE, CD19-ECD, CD16-PC5 in CD45-PC7 ter skušali v enem koraku čim širše zajeti 12 vrst različnih celic.

Zanimalo nas bo, kako uspešen je ta način določanja diferencialne krvne slike pri normalni krvni sliki.

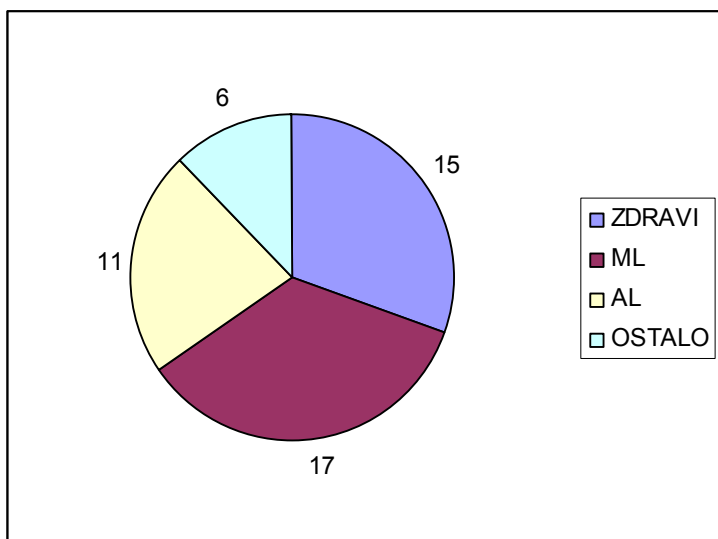
Z uporabljenimi protitelesi bomo poskušali zaznati patološke celice, ki se pojavljajo v venski krvi nekaterih značilnih krvnih boleznih.

Naše rezultate bomo primerjali z rezultati dobljenimi s pomočjo hematološkega analizatorja Coulter LH750 ter z rezultati ročnega mikroskopiranja.

3 PREISKOVANCI IN METODE DELA

3.1 Preiskovanci

V raziskavo smo vključili 49 vzorcev venske krvi, ki je bila v SHL poslana za določitev hemograma in DKS. 15 vzorcev je pripadalo zdravi populaciji, ostali so bili vzorci bolnikov. Večinoma je šlo za vzorce bolnikov z nanovo odkrito boleznijo. Povprečna starost preiskovanih bolnikov je bila 57 let (13 – 88 let). Vse zbrane patološke vzorce smo razdelili v tri skupine glede bolezni, ki je bila ugotovljena pri posameznem vzorcu. Prvo skupino so sestavljali vzorci bolnikov z malignim limfomom (ML). V to skupino smo urstili 14 vzorcev s kronično limfocitno levkemijo (KLL), dva vzorca z neopredeljenim ne-Hodkinovim malignim limfomom (NHL) ter en vzorec z dlakastocelično levkemijo (DCL). Drugo skupino so sestavljali vzorci bolnikov z akutno levkemijo (AL). Tudi v to skupino smo uvrstili različne podtipe te bolezni, in sicer 9 vzorcev bolnikov z akutno mieloblastno levkemijo (AML) ter dva vzorca z akutno limfoblastno levkemijo (ALL). V zadnjo skupino pa smo uvrstili vzorce bolnikov z ostalimi diagnozami. Ta skupina zajema po enega bolnika s kronično mieloično levkemijo (KML), levkopenijo, mikrocitno anemijo (MA), aktivno sarkoidozo, avtoimunsko trombocitopenijo (AT) in infektivno mononukleozo (IF). Število bolnikov po diagnozi predstavlja slika 5.



Slika 5: Število obravnavanih bolnikov glede na diagnozo.

3.2 Laboratorijske preiskave

3.2.1 Določitev celotne krvne slike s hematološkim analizatorjem

Za določitev celotne krvne slike s hematološkim analizatorjem smo uporabili vensko kri, ki smo jo odvzeli v epruvete s K₃EDTA. Analizo smo opravili na analizatorju LH750 proizvajalca Beckman Coulter.

REAGENTI IN KONTROLNI VZORCI:

Reagenti za hematološki analizator Coulter LH750

- DILUENT: razredči vzorec, stabilizira celične membrane, izpira instrument med analizo, usmerja tok vzorca v pretočno celico
- COULTER LYSE S III: lizira eritrocite, sprošča hemoglobin (Hb), zmanjša velikost delcev, da ne motijo štetja levkocitov, povzroči pretvorbo Hb v pigment, čigar absorpcija je sorazmerna koncentraciji Hb
- REAGENČNI SISTEM:
 1. COULTER LH Series Pak je bazičen, hipertoničen reagent, katerega naloga je normalizirati mešanico reagentov in izenačiti osmotski tlak. Reagent povrne bele krvne celice v naravno stanje, nevtralizira pH vrednost in vrne izotoničnost. Voda gre iz celic in le-te se skrčijo. Ko je doseženo ionsko ravnovesje, se krčenje ustavi in celice so pripravljene za citometrično analizo.
 2. COULTER LH Series RETIC PAK je kisel hipotoničen reagent. Ta reagent povzroči, da celice nabreknejo. Eritrociti so hitreje podvrženi lizi, ker vsebujejo več holesterola kot bele krvne celice in so bolj dovzetni za reagent.
- COULTER CLENZ[®] čisti in izpira notranje površine instrumenta (4).

Kontrolni vzorci

- COULTER LATRON PRIMER - raztopina, ki jo uporabimo pred Latron kontrolo, pripravi cevke in ostale komponente za kontrolni postopek
- COULTER LATRON CONTROL - raztopina za preverjanje uravnane pretočne celice, kjer analizator meri volumen celic, prevodnost in sipano svetlobo
- 5C® Series - za spremljanje štetja celic in diferencialno krvno sliko

PRINCIP MERJENJA:

Število krvnih celic:

Analizator meri število krvnih celic tako, da najprej vsrka vzorec, ki ga razdeli na dva dela. En del gre v WBC komoro, drugi del pa v RBC komoro. Suspenziji vzorca, ki potuje v WBC komoro, je dodan reagent za liziranje, ki povzroči lizo eritrocitov. Suspenzija vzorca potuje iz komore skozi odprtino pretočne celice. Preko te odprtine potuje električni tok. Ko celica preide odprtino, sproži impulz. Število impulzov pomeni število celic, velikost impulza pa je sorazmerna z volumenom celice (4).

Diferencialna bela krvna slika:

Medtem ko se polnita WBC in RBC komora, potuje del vzorca v predel za diferencialno analizo in merjenje retikulocitov. Za diferencialno analizo se vzorec pomeša s segretim reagentom za liziranje. Med mešanjem vstopi reagent, ki ohranja levkocitne populacije. Vzorcju se doda še razredčilo. Tako pripravljen vzorec aparat injicira v pretočno celico, kjer se vsaki celici izmeri volumen, prevodnost in razpršenost svetlobe (4).

3.2.2 Ocena diferencialne krvne slike z mikroskopom

Za oceno bele krvne slike pod mikroskopom smo pripravili krvni razmaz, ga posušili, pobarvali in ocenili.

DELOVNI PRIBOR:

- predmetna stekelca VITROGNOST
- krovna stekelca
- nastavki za izdelavo razmaza
- posodice z nosilnimi stojali za barvanje krvnih razmazov
- mikroskop Olympus BH-2

REAGENTI:

- May-Grünwald reagent (eozin in metilensko modrega v metanolu)
- Giemsa (eozin in dva derivata metilensko modrega - azurI in azurII v metanolu)
- Sörensenov fosfatni pufer
- Redestilirana voda

Priprava reagentov:

Pred uporabo smo si pripravili vse delavne raztopine.

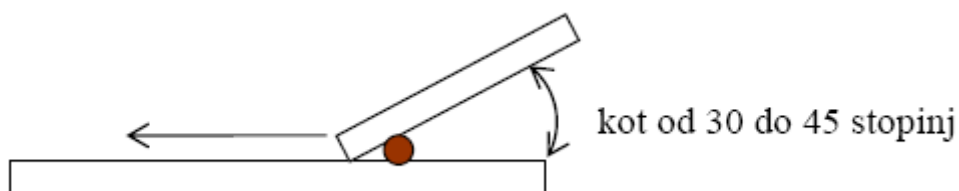
Sörensenov fosfatni pufer smo pripravili iz raztopine A, ki vsebuje 9,1 g/l KH_2PO_4 raztopljenega v redestilirani vodi in iz raztopine B, ki vsebuje 9,5 g/l Na_2HPO_4 ali 11,9 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$. Vzeli smo 630 mL raztopine A in 370 mL raztopine B ter uravnali pH vrednost na 6,6. Za barvanje smo si pripravili delovno raztopino v 1000mL bučki, in sicer iz 50 mL matične raztopine ter dopolnili z redestilirano vodo do oznake. Končna pH vrednost je bila 6,8. Redčen Sörensenov fosfatni pufer nam je nato služil za pripravo raztopine May-Grünwalda s fosfatnim pufrom v razmerju 1:1 ter za 10% raztopino Giemse v fosfatnem pufri.

Priprava krvnih razmazov:

Razmaze smo pripravili iz krvi odvzete v epruvete z K_3EDTA v roku štirih ur od odvzema. Sol EDTA po daljšem času povzroča poškodbo celic (2). Pripravili smo jih na čistih in razmaščenih objektnih stekelcih ustrezne kakovosti.

Pred nanosom smo kri dobro premešali ter s pomočjo nastavka za pripravo razmaza (t.i. metuljček) kanili kapljico na sredino objektnega stekla tik pod matiranim robom. Krovno stekelce smo postavimo pred kapljico, potegnili nazaj, da se je kapljica razporedila po

celotnem robu in na hitro potegnili pod kotom 45 stopinj proti nasprotnemu koncu stekelca (slika 6).



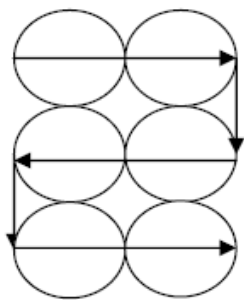
Slika 6: Priprava krvnega razmaza pod kotom.

Na koncu smo krvne razmaze ustrezno označili. Sušili smo jih na zraku približno pol ure ter jih nato pobarvali po naslednjem postopku:

1. **FIKSACIJA:** dobro posušene krvne razmaze smo postavili v posodico z raztopino po May- Grünwaldu za 5 minut
2. brez vmesnega spiranja smo jih prenesli za 1 minuto v posodico z razredčeno raztopino May-Grünwalda s fosfatnim pufrom v razmerju 1:1
3. **BARVANJE:** razmaze smo prenesli v posodico z 10% raztopino Giemse v fosfatnem pufru, barvali smo jih 20 minut
4. **IZPIRANJE:** po končanem barvanju smo razmaze 2-3x sprali s fosfatnim pufrom in jih posušili na zraku.

POSTOPEK MIKROSKOPIRANJA:

Ko so bili krvni razmazi pobarvani in posušeni, smo jih diferencirali s pomočjo mikroskopa Olympus BH-2. Najprej smo jih pogledali pod malo povečavo (100x-na povečava) s katero smo si naravnali jasno sliko vidnega polja in poiskali primerno gosto mesto v razmazu, diferencirali pa smo pod imerzijsko povečavo (1000x-na povečava). Prešteli smo 100 celic bele vrste, vključno z normoblasti, če jih je bilo manj kot 10%, sicer smo jih šteli posebej. Celice pregledujemo pod mikroskopom s cikcak tehniko (slika 7).



Slika 7: Prikaz cikcak tehnike mikroskopiranja.

Rezultat smo podali v odstotkih. Hkrati smo ocenili tudi velikost, obarvanost in obliko eritrocitov ter pod opombe zabeležili morfološke nepravilnosti posameznih krvnih celic ter morebitno prisotnost velikih trombocitov in agregatov trombocitov. Pri diferenciranju smo upoštevali in ocenjevali obliko in velikost celic, razčlenjenost jedra, zgradbo kromatina, obarvanost citoplazme, granulacije, vključke v citoplazmi ter obarvanost zrn.

Preglednica II: Orientacijske referenčne vrednosti za posamezne vrste levkocitov pri odraslih

IME CELIC	RELATIVNI DELEŽ	ŠTEVILČNA KONCENTRACIJA $10^9/L$
Paličasti nevtrofilec	0,00-0,05	do 0,5
Segmentiranec	0,40-0,70	1,6-7,5
Limfociti	0,20-0,50	0,8-5,0
Monociti	0,02-0,10	0,08-1,00
Eozinofilci	0,01-0,06	0,04-0,6
Bazofilci	0,00-0,01	do 0,10

3.2.3 Diferenciacija belih krvnih celic na pretočnem citometru

DELOVNI PRIBOR

Pri delu smo uporabljali:

- pipete znamke Eppendorf (50 μ L, 1mL)
- pipete znamke Transferpette® (10 μ L, 5 μ L)
- različno velike nastavke za pipete
- epruvete za odčitavanje na pretočnem citometru
- vortex

- pretočni citometer FC500, Beckman Coulter

REAGENTI:

- CD36-FITC (fluoresceine α -isothiocyanate) (ref. IMO766U, klon FAG.152)
- CD2-PE (phycoerythrin) (ref.A07744, klon 39C1.5)
- CRTH2-PE (ref.A07413)
- CD19-ECD (phycoerythrin texas red) (ref.A07770, klon J3-119)
- CD16-PC5 (phycoerythrin cyanin 5) (ref.A07767, klon3G8)
- CD45-PC7 (phycoerythrin cyanin7) (refIM3548, klon J.3)
- VersaLyseTM
- Beads (flow-count fluorosphere)
- PBS-puferirana fiziološka raztopina

Proizvajalec vseh zgoraj naštetih reagentov je IMMUNOTECH (France), razen PBS, katerega smo si pripravili sami.

Protitelesa smo shranjevali v hladilniku pri temperaturi 2-8°C ter zaščitene pred svetlobo. Beadse in PBS smo ravno tako shranjevali v hladilniku. Reagent za liziranje smo shranjevali pri sobni temperaturi (18-25°C). Rok uporabe je odtisnjen na steklenički, po odprtju je uporaben še 90 dni.

Priprava reagentov:

PBS- puferirana fiziološka raztopina

Za matično raztopino potrebujemo 40g NaCl, 1 g KCl, 1 g KH₂PO₄ in 7,6 g Na₂HPO₄x2H₂O, ki jo raztopimo v 300 mL redestilirane vode in dopolnimo v merilni bučki do 500 mL.

Delovno raztopino si pripravimo iz 100 mL matične raztopine ter 900 mL redestilirane vode ter dodamo 1 g NaN₃. Natrijev azid služi kot konzervans.

VZOREC:

Polna venska kri odvzeta v epruvete z EDTA

Koncentracija levkocitov v vzorcu krvi je mora biti od 5x10⁹/L do 10x10⁹/L. Če je bilo potrebno, smo vzorec redčili s PBS do ustrezne koncentracije.

Koncentracija eritrocitov v vzorcu krvi ni smela presegati koncentracije $6 \times 10^{12}/L$. V primeru, da jo je, smo vzorec redčili s PBS.

POTEK DELA:

V označeno epruveto smo pipetirali po 10 μL protiteles CD36-FITC, CD2-PE in CRTH2-PE ter po 5 μL protiteles CD19-ECD, CD16-PC5 in CD45-PC7. Nato smo dodali 50 μL vzorca ter inkubirali 20 minut v temi pri sobni temperaturi. Po končani inkubaciji vzorca in protiteles smo rdeče krvne celice lizirali z 1 mL reagenta VersaLyse™, močno premešali in inkubirali v temi pri sobni temperaturi 10 minut. V epruveto smo nato tik pred odčitavanjem pipetirali še 100 μL raztopine beads-ov in premešali.

MERITVE:

Pripravljen vzorec smo analizirali na pretočnem citometru FC500, proizvajalca Beckman Coulter.

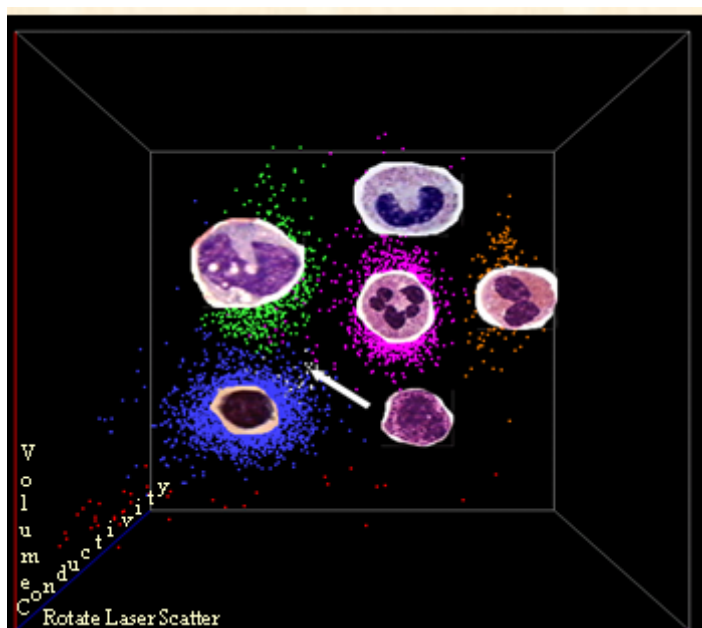
Celice v vzorcu smo označili s protitelesi, ki so označena s fluorokromi (FITC, PE, ECD, PC5 IN PC7). Ko so celice potovale skozi laserski žarek, so se fluorokromi vznemirili in fluorescirali. Z optičnimi zrcali in filtri se oddana svetloba razdeli na svetlobo različnih valovnih dolžin. To svetlobo zaznajo detektorji svetlobnih signalov. S procesiranjem signalov in računalniško obdelavo podatkov dobimo rezultate meritev, ki so v našem primeru prikazane z citogrami. Z eno meritvijo na pretočnem citometru smo hkrati prikazali prisotnost/odsotnost šestih celičnih antigenov v enem vzorcu krvi.

3.3 Metode

Zbirali smo izvide iz hematološkega analizatorja Coulter LH750 (število levkocitov, delež in absolutno število limfocitov, monocitov, nevtrofilcev, eozinofilcev ter bazofilcev). Zbirali smo izsledke ročne diferencialne krvne slike krvnih razmazov po pregledu pod svetlobnim mikroskopom ter izsledke merjenja na pretočnem citometru FC 500.

3.3.1 Podatki iz hematološkega analizatorja LH750

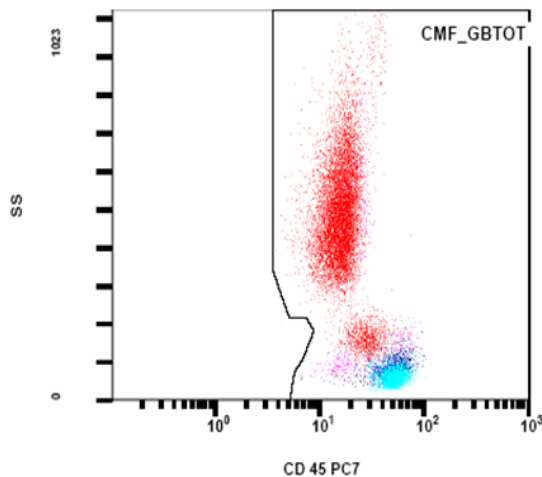
Diagram Coulter LH750 (slika 8) prikazuje limfocite, monocite ter nevtrofilne, eozinofilne in bazofilne granulocite. Kot je razvidno na sliki, je na x osi sipana svetloba, na y osi volumen celic ter na z osi prevodnost celic.



Slika 8: Tridimenzijski podatkovni diagram Coulter LH750.

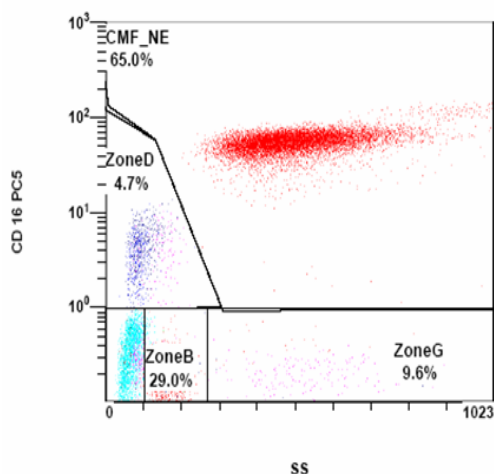
3.3.2 Podatki iz pretočnega citometra FC500

Pomembna možnost analize s pretočno citometrijo je zamejevanje celičnih populacij (»gating«), ki omogoča analizo fizikalnih in antigenskih lastnosti skupine celic v heterogeni celični suspenziji (11).



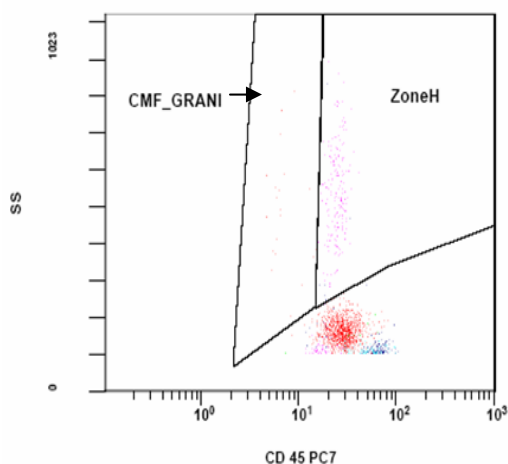
Slika 9: Citogram populacije levkocitov (Citogram 1).

Prvi citogram prikazuje, kako lahko na osnovi granuliranosti celic in ekspresije CD45 antigena (skupni levkocitni antigen) v heterogeni celični suspenziji opredelimo več različnih celičnih populacij, in sicer limfocite, monocite in granulocite. Celice, ki so najbolj granularne, se razporedijo najvišje v citogramu. Sem sodijo granulociti, predvsem zreli. Celice, ki so najmanj granularne, se razporedijo najnižje v citogramu. To so limfociti. Nekoliko bolj kot limfociti so granularni monociti. Celični označevalec CD45 je najmočnejše izražen na zrelih celicah bele vrste, slabo se izraža na mladih, nezrelih celicah, odsoten pa je na eritrocitih.

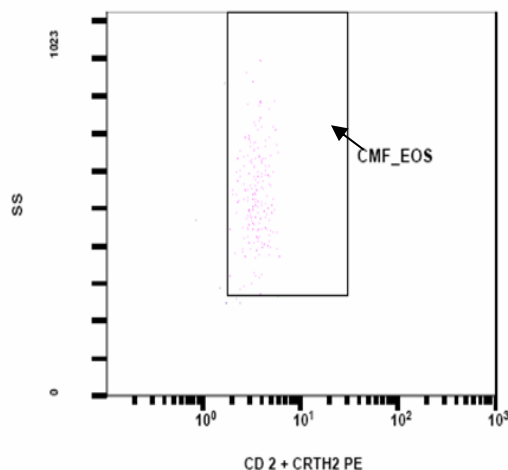


Slika 10: Citogram populacije nevtrofilnih granulocitov ter področja B, D in G (Citogram 2).

Drugi citogram prikazuje porazdelitev levkocitov na osnovi granuliranosti in izražanja CD16 antigena. Celični označevalec CD16 je najmočnejše izražen na nevtrofilnih granulocitih, ki so tudi najbolj granulirani. Prisoten pa je tudi na citotoksičnih T limfocitih in NK celicah ter na vnetnih (inflammatory) monocitih. Na tem citogramu imamo prikazana še tri orientacijska področja, področje B, področje D in področje G, ki pomagajo pri nadaljnjem opredeljevanju populacij.

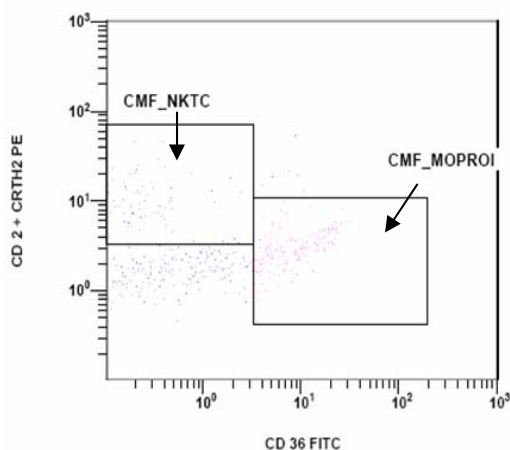


Slika 11: Citogram celic zamejenih v področju G, kjer zajamemo populacijo nezrelih granulocitov ter področje H (Citogram 3).



Slika 12: Citogram celic iz področja H, kjer zajamemo populacijo eozinofilcev (Citogram 4).

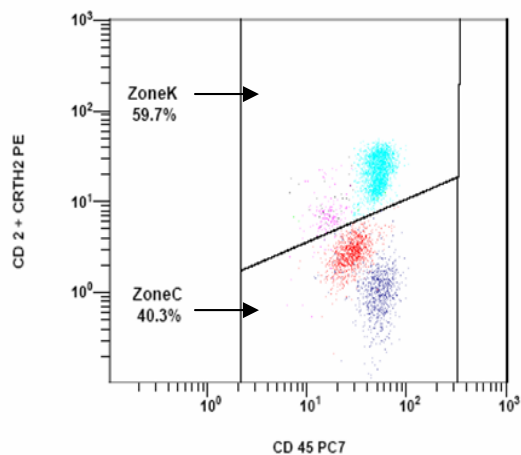
Na tretjem in četrtem citogramu (sliki 12 in 13) je prikazana porazdelitev celic iz področja G. Šibko izražanje antigena CD45 označuje nezrele granulocite. Področje, kjer je CD45 antigen močnejše izražen, je označeno s črko H. V tem področju je v naslednjem, četrtem, citogramu s pomočjo celičnega označevalca CRTH2 (CD294) zamejeno področje eozinofilcev.



Slika 13: Citogram celic iz področja D, ki so CD16 pozitivne, in s katerim zajamemo populacijo T/NK citotoksičnih celic ter populacijo vnetnih monocitov (Citogram 5).

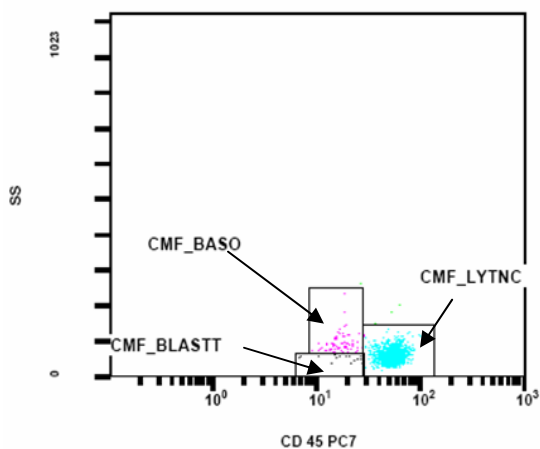
Na petem citogramu (slika13) so prikazane celice iz področja D (citogram 2). To so celice, ki imajo močno izražen antigen CD16, ki je prisoten na citotoksičnih T limfocitih, na NK celicah ter na vnetnih monocitih. S celičnim označevalcem CD36 zajamemo vnetne

monocyte. S kombinacijo označevalcev CD2 + CRTH2 pa citotoksične T limfocite ter NK celice. Celični označevalec CD2 se izraža na limfocitih T in na večini NK celic. Populaciji citotoksičnih limfocitov T ter NK celic sta zajeti skupaj in jih z uporabljenimi označevalci ne moremo ločiti med seboj.



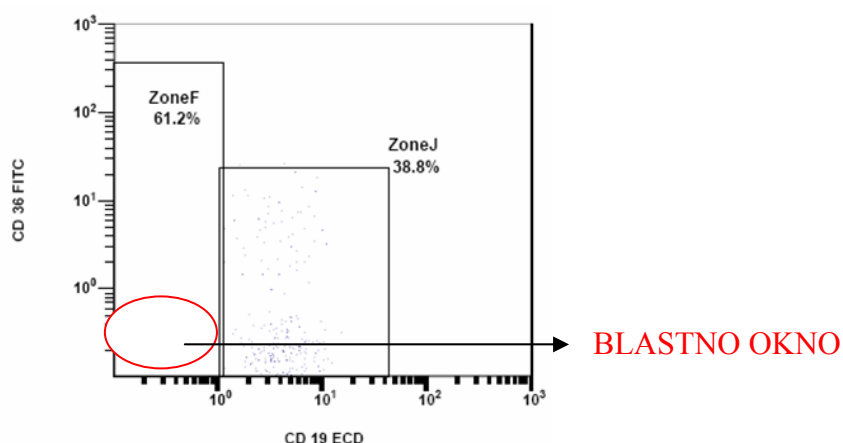
Slika 14: Citogram celic zamejenih v področja B, ki so CD16 negativne. Zamejeno populacijo celic opredelimo na področji C in K (Citogram 6).

Citogram na sliki 14 prikazuje celice iz področja B (citogram 2), ki so najmanj granulirane ter ne izražajo CD16 antigena. Ker je celični označevalec CD45 močno pozitiven, zajamemo limfocite in monocyte. S kombinacijo označevalcev CD2 + CRTH2 razdelimo območje citograma na dve področji, in sicer na področje K in na področje C.



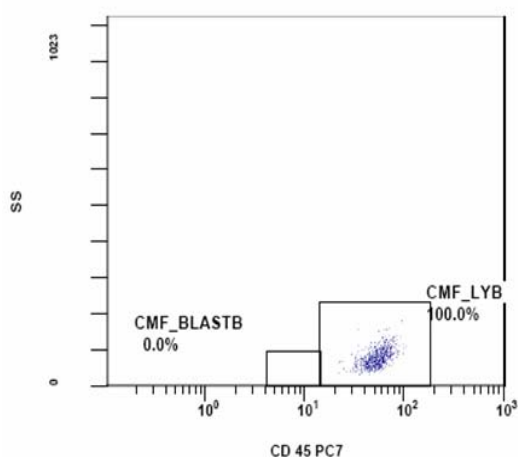
Slika 15: Citogram celic zamejenih v področju K, s katerim opredelimo populacije bazofilcev, necitotoksičnih limfocitov T ter limfoblastov T (Citogram 7).

Citogram na sliki 15 prikazuje porazdelitev celic iz področja K (citogram 6), kamor se umestijo celice, ki izražajo na svojih površinah CD2 antigen in/ali CRTH2 antigen. CD2 antigen je prisoten na vseh limfocitih, medtem ko je antigen CRTH2 prisoten na necitotoksičnih limfocitih T ter na bazofilcih, ki so nekoliko bolj granulirani. Necitotoksični limfociti T na svoji površini ne izražajo CD16 antigena, izražajo pa CD2 in/ali CRTH2 antigen.



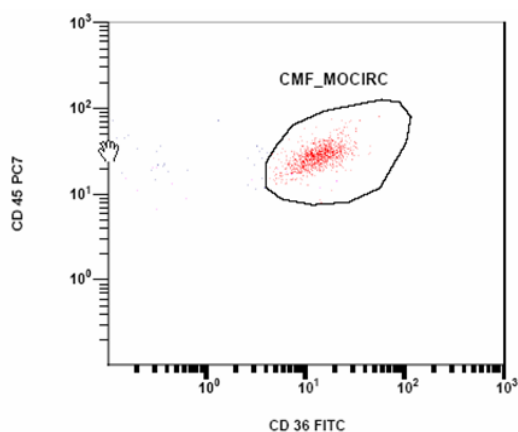
Slika 16: Citogram populacije celic, ki so označene s področji F in J ter so predhodno zamejene v področju C (Citogram 8).

V citogramu 8 (slika 16) so zajete celice iz področja C (citogram 6), ki na svoji površini ne izražajo CD16 antigena. To so celice, ki niso granulirane imajo pa na svoji površini CD45 antigen. Celotno območje je razdeljeno na dve področji, področje J, v katerem so celice, ki se vežejo s protitelesi za CD19 in področje F, kamor se umestijo celice, ki vežejo protitelesa za CD36. Levo spodaj je zamejeno področje celic, ki so CD19 in CD36 negativne ter je definirano kot blastno okno.



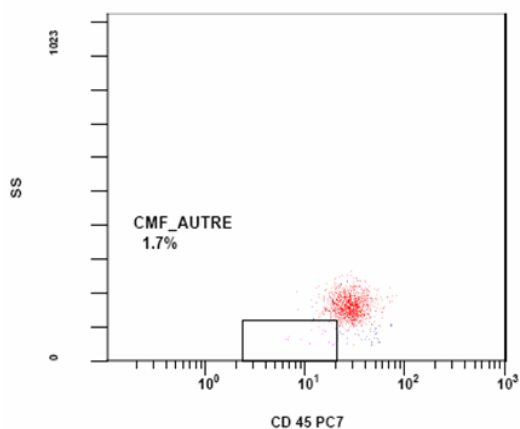
Slika 17: Citogram celic predhodno zamejenih v področju J, s katerim prikažemo populacije limfocitov B ter limfoblastov B (Citogram 9).

V citogramu 9 (slika 17) so prikazane celice iz področja J (citogram 8), ki močno izražajo antigen CD19. Ta je prisoten na B limfocitih. Področje, kjer je celični označevalec CD45 šibkeje izražen, pripada B limfoblastom, področje, kjer je močneje izražen, pa zrelejšim B limfocitom.



Slika 18: Citogram celi zamejenih iz področja F s katerim prikažemo populacijo monocitov (Citogram 10).

Citogram CD36/CD45 (slika18) določa levkocite iz področja F (citogram 8), ki na svoji površini izražajo CD36 antigen, ki je značilen za monocite. Z močnim izražanjem označevalca CD36 in negativnim označevalcem CD19 določimo populacijo monocitov.



Slika 19: Citogram populacije mladih celic mieloične vrste (Citogram 11), ki so predhodno zajete v blastnem oknu (slika 16)

Na zadnjem citogramu so prikazane celice, ki so zajete v področju blastnega okna. Te celice so CD19 in CD2 negativne, kar pomeni, da ne spadajo v limfocitno vrsto. Celice niso granulirane. Celični označevalec CD45 je šibko izražen. V to področje se razvrščajo mlade celice mieloične vrste (mieloblasti).

Delež posamezni vrst krvnih celic smo odčitali iz rezultatske tabele, ki jo je izdelal program pretočnega citometra na podlagi citogramov in vnesenega protokola. V spodnji preglednici imamo prikazano, kakšno je izražanje posameznega celičnega označevalca pri določeni celični vrsti in v katerem citogramu so zajete posamezne vrste belih krvnih celic.

Preglednica III: Prikaz intenzitete izražanja posameznega celičnega označevalca pri določeni celični vrsti.

Celična vrsta	Intenziteta izražanja celičnih označevalcev	Citogram	
Limfociti B	SS↓, CD45↑, CD16 ⁻ , CD2 ⁻ in CRTH2 ⁻ , CD19 ⁺	9	
Limfoblasti B	SS↓, CD45↓, CD16 ⁻ , CD2 ⁻ in CRTH2 ⁻ , CD19 ⁺	9	
Necitotoksični T limfociti	SS↓, CD45↑, CD16 ⁻ , CD2/CRTH2 ⁺	7	
Citotoksični T limfociti in NK celice	SS↓, CD45↑, CD16 ⁺ , CD2/CRTH2 ⁺	5	
Limfoblasti T	SS↓, CD45↓, CD16 ⁻ , CD2/CRTH2 ⁺	7	
Mieloblasti	SS↓, CD45↓, CD19 ⁻ , CD2 ⁻ in CRTH2 ⁻	11	
Nezreli granulociti	SS↑, CD45↑↓, CD16 ⁻ , CD2 ⁻ in CRTH2 ⁻	3	
Nevtrofilci	SS↑, CD45↑, CD16 ⁺	2	
Eozinofilci	SS↑, CD45↑, CD16 ⁻ , CD2/CRTH2 ⁺	4	
Bazofilci	SS↑↓, CD45↑↓, CD16 ⁻ , CD2/CRTH2 ⁺	7	
Monociti	SS↑↓, CD16 ⁻ , CD2 ⁻ in CRTH2 ⁻ , CD19 ⁻ , CD36 ⁺	10	
Vnetni monociti	SS↓↑, CD16 ⁺ , CD2 ⁻ in CRTH2 ⁻ , CD19 ⁻ , CD36 ⁺	5	

Legenda:

- ↑ - močno izražanje
- ↓ - šibko izražanje
- ↑↓ - srednje močno izražanje
- + - prisotnost celičnega označevalca
- - odsotnost celičnega označevalca

3.3.3 Statistična analiza

V statistični analizi smo med seboj primerjali vrednosti posameznih vrst celic dobljenih s tremi različnimi načini določanja. Dobljenim rezultatom smo določili Me in kvartile. Prvi kvartil (Q_1), imenovan tudi 25. centil, je vrednost pod katero se nahaja 25% vseh nevtrofilcev. Drugi kvartil (Q_2) je hkrati tudi Me. Po definiciji je to mera srednje vrednosti, ki ranžirno vrsto razdeli na dva enaka dela. Polovica vrednosti je od nje manjših ali enakih, druga polovica pa večjih ali enakih. Tretji kvartil (Q_3) je vrednost, od katere je manjših ali njej enakih 75% vrednosti.

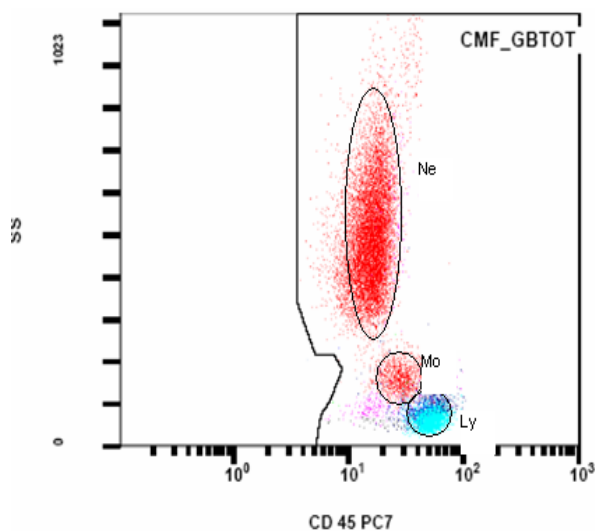
Razpon vrednosti pri vsaki metodi smo grafično prikazali v obliki kvantilnega diagrama. Gre za zaporedno nanizane okvirje s po dvema ročajema (angl. *box-and-whiskers plots*). Vsak okvir z ročajema določa pet točk: pogojni minimum (min) in pogojni maksimum (max) ter kvartili Q_1 , Q_2 in Q_3 . Pogojni minimum je najmanjša vrednost, ki še ni spodnji osamelec, pogojni maksimum pa največja vrednost, ki ni zgornji osamelec. Območje v okvirju označuje srednjo polovico vrednosti (vrednosti med 25. in 75. centilom oz. med 1. in 3. kvartilom). Debelejša prečna linija znotraj tega območja predstavlja Me. Porazdelitev preostale vrednosti ponazarjata ročaja, ki pa nikoli ne presegata 1,5-kratne višine okvirja (t.i. medkvartilnega območja). V posameznemu kvantilnemu diagramu so lahko prisotni zgornji in spodnji osamelci (°) (izstopajoče vrednosti) ter zgornji in spodnji ekstremni osamelci (*) (ekstremno izstopajoče vrednosti) (12).

S Friedmanovim testom za primerjavo več med seboj odvisnih vzorcev smo ugotavljali, če se različne metode diferenciacije belih krvnih celic med seboj statistično razlikujejo. Statistično obdelavo podatkov smo izvedli s programom za statistično analizo SPSS (*SPSS 16.0 for Windows*).

4 REZULTATI

Za detekcijo 12-ih različnih vrst belih krvnih celic smo uporabili 5 barvno pretočno citometrijo ter kombinacijo 6-ih specifičnih celičnih označevalcev CD36-FITC, CD2-PE, CRTH2-PE, CD19-ECD, CD16-PC5 in CD45-PC7. Celični označevalec CD45 se pojavlja na vseh celicah bele vrste, pri čemer je zelo močno izražen na zrelih celicah, šibko na mladih, nezrelih celicah, odsoten pa je na rdečih krvnih celicah. Vsaka od celic ima drugačno intenziteto izražanja celičnega označevalca CD45 ter različno granuliranost (SSC). Najbolj granulirani so granulociti, najmanj pa limfociti in monociti. Za ločevanje med monociti in limfociti B smo izbrali celična označevalca CD36 in CD19. Prikaz citograma s tema dvema označevalcema je prikazan na sliki 16. CD36 antigen imajo na svoji površini tudi mladi normoblasti. Med granulociti smo s celičnim označevalcem CRTH2 določili populaciji eozinofilcev in bazofilcev (sliki 12 in 15), z označevalcem CD16 pa nevtrofilne granulocite. Celični označevalec CD16 je prisoten tudi na citotoksičnih T/NK limfocitih in vnetnih (inflammatory) monocitih. Za opredelitev T-celične vrste smo izbrali celični označevalec CD2, ki je prisoten na limfocitih T in večini NK celic. V kombinaciji s celičnim označevalcem CD16, CD2 označevalec omogoča zaznavo tako necitotoksičnih limfocitov T ($CD2^+/CD16^-$) kot tudi citotoksičnih limfocitov T ($CD2^+/CD16^+$), vendar pa s tema dvema označevalcema ne moremo razločevati med citotoksičnimi limfociti T in NK celicami.

Interpretacija naših rezultatov temelji na zamejevanju celičnih populacij (»gating«), ki smo ga izvedli na dva različna načina: t.i. orientacijsko in specifično zamejevanje. Pri orientacijskem zamejevanju smo izbrali oziroma zajeli celice, ki imajo podobne, lahko pa tudi iste lastnosti glede izražanja določenega antigena. S specifičnim zamejevanjem celičnih populacij pa smo proučevali antigenske lastnosti ene same populacije. Za boljše in hitrejše razumevanje in interpretacijo rezultatov so v citogramu posamezne populacije celic obarvane z različnimi barvami. Že v prvem citogramu CD45/SSC (slika 20) nam barvni zapis omogoča, da si ustvarimo sliko posameznih populacij levkocitov ter razumemo karakteristiko izražanja celičnega označevalca CD45 in granuliranosti celic (SSC).

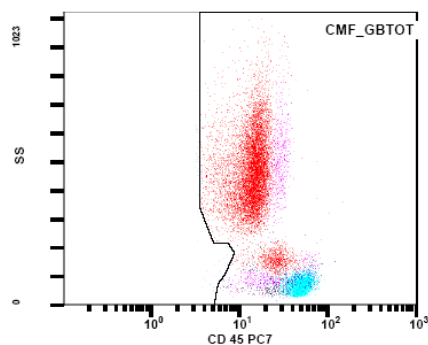


Slika 20: Prikaz barvnega zapisa posameznik populacij levkocitov.

4.1 Primerjava izsledkov vseh treh metod

Slika 21 prikazuje primer rezultatske tabele, ki jo je na osnovi v prejšnjem poglavju opisanih citogramov izdelal pretočni citometer (program) na osnovi vnesenega protokola. Delno diferencialno krvno sliko smo dobili tudi s pomočjo VCS tehnologije (LH750). Slika 22 prikazuje citogram, ki ga prikaže hematološki analizator ter tabelarični izpis. Ročno diferencialno sliko je izdelal tehnik v citološkem laboratoriju in slika 23 prikazuje krvni razmaz pod mikroskopom pri 1000x povečavi za istega bolnika ter rezultate v tabeli. Gre za rezultate normalne krvi.

Color	Name	% Gated	Cells/ μ L
	CMF_BLASTT	0.49	13.14
	CMF_BASO	0.69	18.47
	CMF_LYTNC	16.64	444.08
	CMF_PLT	0.00	0.00
	CMF_NKTC	3.05	81.36
	ZoneK	17.81	475.16
	CMF_AUTRE	1.07	28.42
	CMF_MOCIRC	6.34	169.28
	CMF_NE	62.49	1667.43
	CMF_MOPROI	0.47	12.61
	CMF_GRANI	0.51	13.50
	CMF_EOS	4.05	108.18
	CMF_LYB	1,68	44,76
	CMF_BLASTB	0.00	0,00



Slika 21: Prikaz rezultatske tabele in citograma iz pretočnega citometra.

Legenda:

CMF BLASTT - limfoblasti T

CMF BASO - bazofilci

CMF LYTNC – necitotoksični limfociti

CMF NKTC – citotoksični limfociti T in NK celice

CMF AUTRE – mieloblasti

CMF MOCIRC – monociti

CMF NE – nevtrofilci

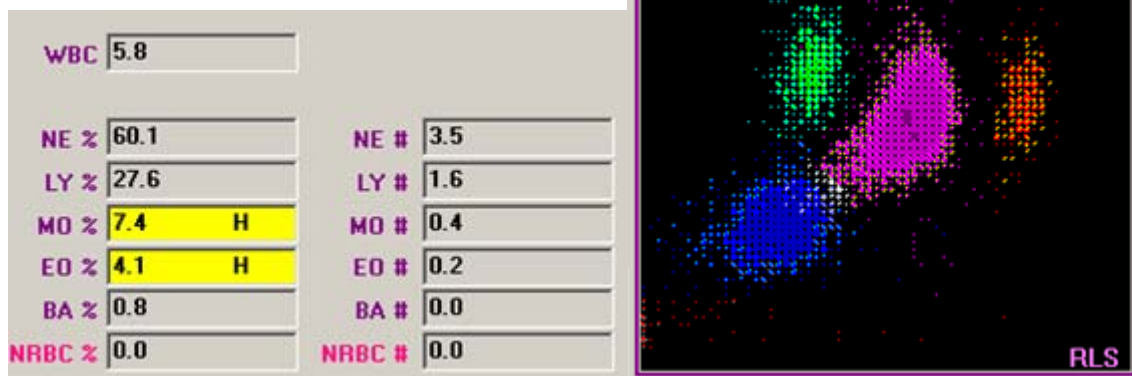
CMF MOPROI – vnetni monociti

CMF GRANI – nezreli granulociti

CMF EOS- eozinofilci

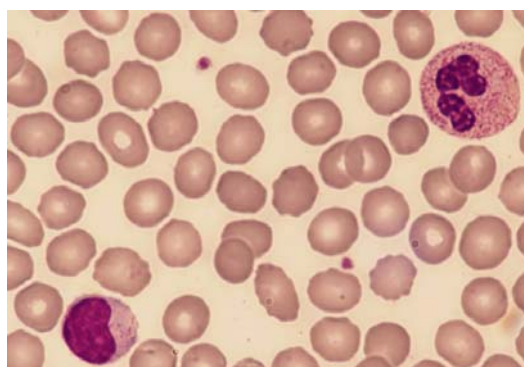
CMF LYB – limfociti B

CMF BLASTB – limfoblasti B



Slika 22: Prikaz rezultatov in citograma iz hematološkega analizatorja.

+	
Blasti	
Promielociti	
Mielociti	
Metamielociti	
Paličasti granulociti	
Neutrofilci	53
Eozinofilci	5
Bazofilci	1
Prolimfociti	
Limfociti	36
Atipični limfociti	
Promonociti	
Monociti	5
normoblasti	



Slika 24: Prikaz rezultatov ročne DKS in krvnega razmaza pod mikroskopom.

4.2 Izsledki rezultatov proučevanih parametrov dobljenih iz hematološkega analizatorja, mikroskopa in pretočnega citometra pri normalnih vzorcih

Vzorčno skupino zdravih preiskovancev je sestavljalo 15 vzorcev venske krvi. Rezultati, ki smo jih primerjali med seboj, so prikazani v preglednici IV.

Preglednica IV: rezultati preislovanih parametrov zdrave populacije.

vzorec	Št.Lkc 10 ⁹ /L	metoda	Ne%	Ly%	Mo%	Eo%	Ba%
ZA	5,8	DKS	53	36	5	5	1
		LH	60,1	27,6	7,4	4,1	0,8
		FC	63,0	21,5	7,0	4,1	0,7
ZM	5,9	DKS	48	44	7	0	1
		LH	48,4	36,4	11,6	2,7	0,9
		FC	47,7	31,9	11,8	2,4	2,2
JN	6,2	DKS	68	28	4	0	0
		LH	65,2	24,9	8,3	1,0	0,6
		FC	65,0	24,4	7,8	1,1	1,0
TK	5,5	DKS	52	39	9	0	0
		LH	50,5	37,9	9,5	1,5	0,6
		FC	51,9	31,3	9,7	1,6	0,2
SGI	9,1	DKS	67	23	7	2	1
		LH	62,4	25,1	8,7	2,6	1,2
		FC	69,1	14,9	8,6	2,8	0,8
AS	6,6	DKS	51	46	2	1	0
		LH	52,5	34,7	9,1	3,0	0,7
		FC	51,7	30,4	9,7	2,9	0,5
PJ	9,0	DKS	59	27	12	1	1
		LH	62,6	22,1	11,6	3,2	0,5
		FC	60,7	19,3	11,6	3,0	0,5
MM	8,6	DKS	59	30	6	5	0
		LH	61,2	27,4	7,5	3,4	0,5
		FC	61,2	21,1	8,2	3,7	0,2
MB	6,1	DKS	45	34	9	12	0
		LH	41,5	34,5	10,8	12,4	0,8
		FC	40,4	22,8	8,5	12,1	0,7
KP	6,7	DKS	55	32	11	2	0
		LH	63,2	26,7	7,0	2,2	0,9
		FC	62,6	25,5	6,9	2,3	0,4
BA	6,3	DKS	54	40	4	1	1
		LH	57,6	31,6	8,1	2,2	0,5
		FC	57,4	23,9	8,1	1,9	0,6
DK	8,8	DKS	65	25	6	4	0
		LH	59,4	31,2	6,5	2,6	0,3
		FC	54,3	32,6	6,9	2,1	0,4
MZ	4,4	DKS	66	23	8	2	1
		LH	58,2	31,8	8,9	0,6	0,5
		FC	58,3	25,9	9,4	0,6	0,4
JL	8,8	DKS	56	23	14	7	0
		LH	59,4	25,1	8,4	6,4	0,7
		FC	59,9	21,5	8,8	4,5	0,5
AB	6,7	DKS	53	41	2	3	1
		LH	54,6	34,9	6,9	3,2	0,4
		FC	65,1	17,9	7,0	3,5	0,4

4.2.1 Statistično vrednotenje proučevanih parametrov pri zdravi populaciji

Pri statističnem vrednotenju smo primerjali absolutno število nevtrofilnih granulocitov, limfocitov, monocitov, eozinofilcev in bazofilcev merjenih s hematološkim analizatorjem, pretočnim citometrom ter s pregledom krvnega razmaza. Podrobneje smo predstavili vrednosti nevtrofilnih granulocitov in limfocitov.

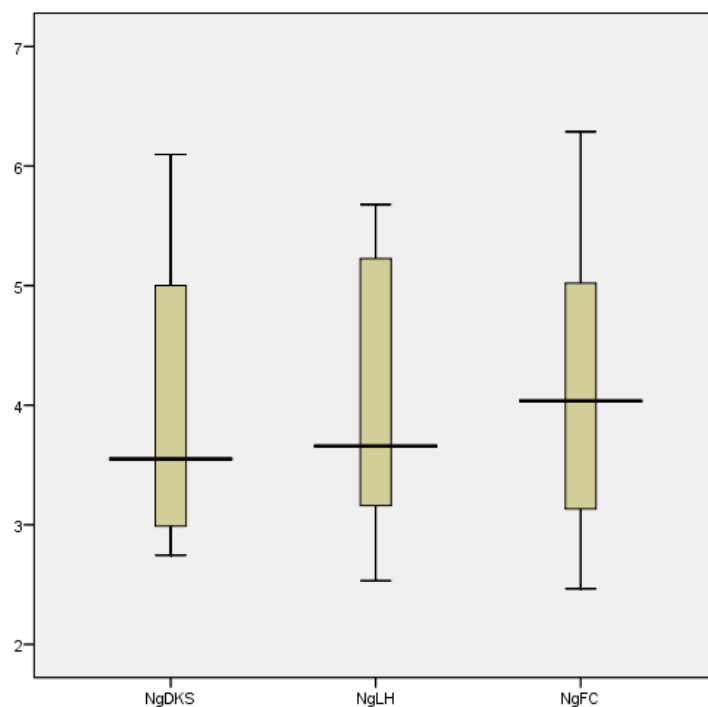
Friedmanov test je pokazal, da med vrednostmi mediane nevtrofilcev merjenih z različnimi metodami ni statistično značilnih razlik ($p > 0,05$). Nekateri izmed parametrov statistične obdelave absolutnega števila nevtrofilcev so zbrani v preglednici V.

Preglednica V: Primerjava velikosti prvih kvartilov, median in tretjih kvartilov pri nevtrofilcih zdrave populacije.

	Q ₁	Me	Q ₃
NgDKS	2,90	3,55	5,07
NgLH	2,85	3,66	5,23
NgFC	2,85	4,04	5,26

Q₁-prvi kvartil; Me-mediāna; Q₃-tretji kvartil

Razpon vrednosti nevtrofilcev pri vsaki metodi smo grafično prikazali v obliki kvantilnega diagrama. Slika 25 prikazuje porazdelitve vrednosti nevtrofilnih granulocitov merjenih s tremi metodami, in sicer z ročno DKS, hematološkim analizatorjem in pretočnim citometrom. Vidimo, da med porazdelitvami nevtrofilnih granulocitov ni velikih razlik.



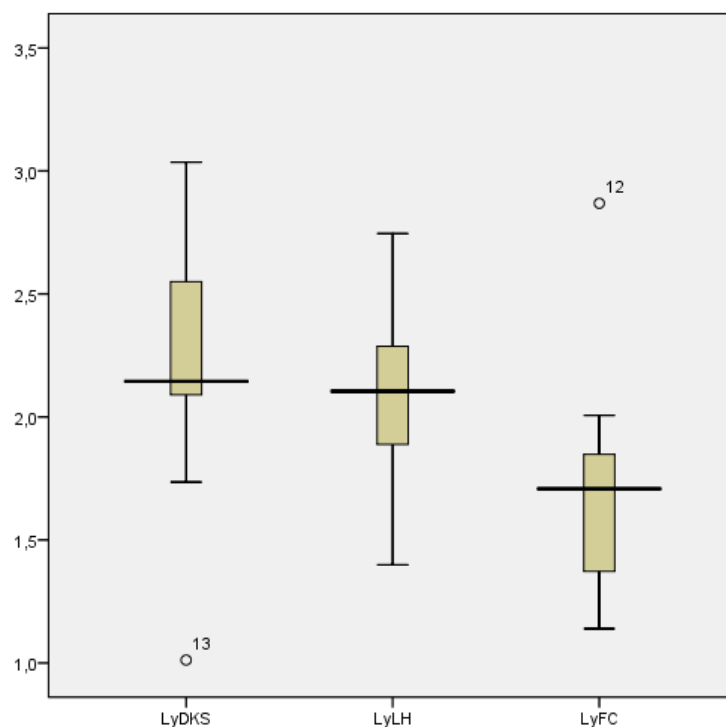
Slika 25: Kvartilni diagram porazdelitve vrednosti nevtrofilnih granulocitov pri vsaki od uporabljenih metod zdrave populacije. Območje v okvirju označuje vrednosti med 1. in 3. kvartilom. Debela črta znotraj tega območja predstavlja mediano. Vrednosti na y osi predstavljajo absolutne vrednosti števila nevtrofilcev ($10^9/L$).

Statistično smo primerjali tudi vrednosti limfocitov merjenih z različnimi metodami. Friedmanov test je pokazal statistično značilno razliko v vrednostih limfocitov dobljenih z različnimi metodami ($p < 0,05$).

Preglednica VI: Primerjava velikosti prvih kvartilov, median in tretjih kvartilov pri limfocitih zdrave populacije.

	Q ₁	Me	Q ₃
LyDKS	2,09	2,14	2,58
LyLH	1,79	2,10	2,29
LyFC	1,35	1,71	1,18

Q₁-prvi kvartil; Me-median; Q₃-tretji kvartil



Slika 26: Kvantilni diagram porazdelitve vrednosti limfocitov pri vsaki od uporabljenih metod zdrave populacije. Območje v okvirju označuje vrednosti med 1. in 3. kvartilom. Debela črta znotraj tega območja predstavlja mediano. Vrednosti na y-osi predstavljajo absolutne vrednosti števila limfocitov merjenih v $10^9/L$.

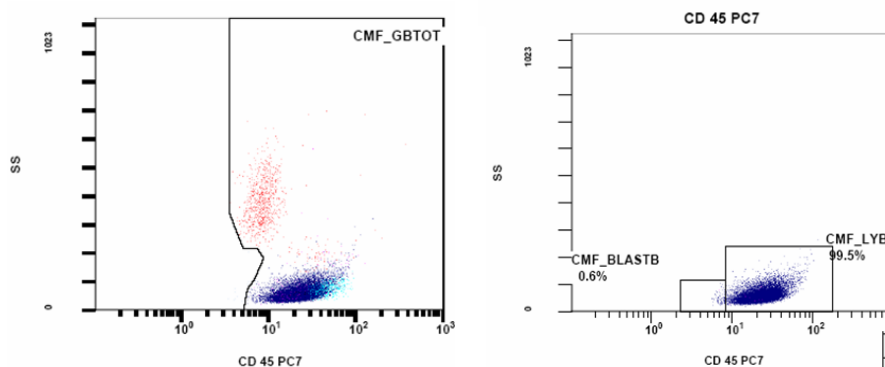
Slika 26 prikazuje porazdelitev vrednosti limfocitov pri različnih metodah. Vidimo, da med porazdelitvama limfocitov merjenih z ročno DKS in hematološkim analizatorjem LH ni velikih razlik. Največje vrednosti limfocitov smo dobili pri metodi ročnega mikroskopiranja. Prisoten je tudi spodnji osamelec ($^{\circ}$), verjetno zaradi nizkega števila levkocitov vzorca. Iz pripadajoče tabele VI lahko razberemo, da sta Me dobljeni z metodo ročne DKS in LH-ja skoraj identični, razlikujejo se le srednje polovice vrednosti. Pri DKS se ta vrednost nahaja med $2,09$ in $2,58 \times 10^9/L$, pri LH zajema vrednosti med $1,79$ in $2,29 \times 10^9/L$. Statistično najbolj odstopajo vrednosti limfocitov dobljene z metodo FC. Me znaša $1,71 \times 10^9/L$, medtem ko se srednja polovica vrednosti nahaja med $1,36$ in $1,88 \times 10^9/L$. Prisoten pa je tudi zgornji osamelec.

Izmerili smo tudi vrednosti monocitov, eozinofilcem in bazofilcem, vendar pa jih nismo podrobneje opisovali zaradi majhnih vrednosti ter s tem večjih odstopanj pri posamezni metodi.

4.3 Izsledki in rezultati statistične analize proučevanih parametrov iz hematološkega analizatorja, mikroskopa in pretočnega citometra pri bolnikih z ML

Vzorčno skupino bolnikov z ML je sestavljalo 17 vzorcev. 14 vzorcev je pripadalo bolnikom z B-KLL, dva bolnikoma z NHL in eden bolniku z DCL.

Pri bolnikih z B-KLL so lahko prisotni tako mali zreli limfociti kot tudi "atipični" limfociti. To so lahko prolimfociti, nezreli limfociti, veliki limfociti ter limfociti z zažetim jedrom (13). Z vsemi tremi metodami diferenciacije belih krvnih celic smo določili povišan odstotek limfocitov. Pri pregledu razmaza krvi pod svetlobnim mikroskopom smo pri večini vzorcev zasledili Gumprechtove sence, v šestih primerih pa tudi atipične limfocite, kar je razvidno iz preglednice VII. Tudi s pretočno citometrično analizo smo pri vseh vzorcih dobili zelo povišan odstotek limfocitov, ki pripadajo glede na imunološke značilnosti limfocitom B. Na sliki 27 sta prikazana značilna citograma vzorcev krvi bolnikov z B-KLL.



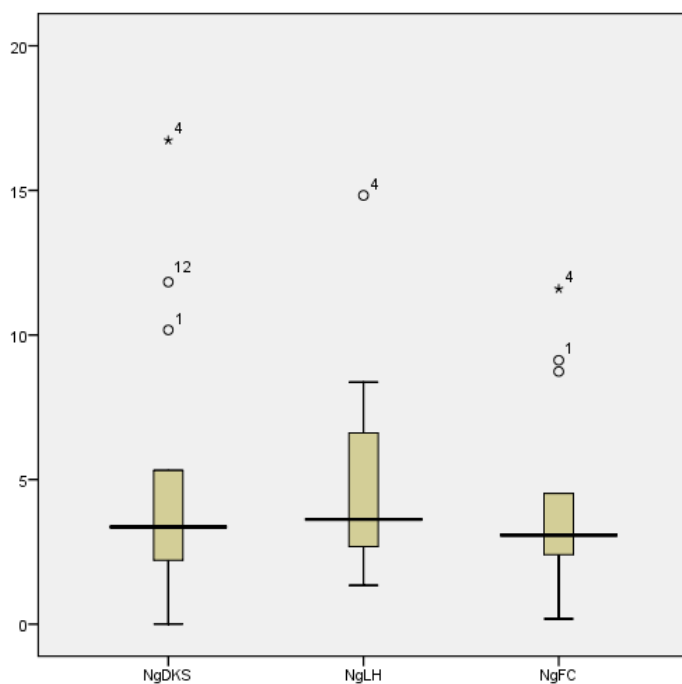
Slika 27: Področje limfocitov B v citogramu

Preglednica VII: Izsledki rezultatov limfocitov merjenih z različnimi metodami pri bolnikih z B-KLL.

			LIMFOCITI					
vzorec	Št.Lkc 10 ⁹ /L	metoda	Ne%	Ly%	LyT%	LyB%	NK%	opombe
SS	31,8	DKS	32	66				atipični Ly, limfocitoza monocitoza
		LH	21	72,9				
		FC	28,7	63,5	7,7	55,1	0,7	
LM	12,4	DKS	23	71				Gumprechtove sence limfocitoza
		LH	19,5	72,2				
		FC	19,9	69,7	12,6	56,2	0,9	
KF	26,9	DKS	12	87				Gumprechtove sence Ly blasti, različni Ly, limfocitoza
		LH	9,6	88,6				
		FC	9,6	85,4	8,1	75,7	1,6	
DM	57,7	DKS	29	69				Gumprechtove sence Limfocitoza, levkocitoza
		LH	25,7	72,7				
		FC	20,1	77,2	2,7	74,5	0,0	
DH	14,0	DKS	25	68				limfocitoza
		LH	27,3	67,2				
		FC	28,2	62,1	8,7	52,5	1,9	
GD	21,1	DKS	19	62				veliki limfociti z vidnim nukleolom(19) Gumprechtove sence limfocitoza
		LH	15,0	80,6				
		FC	16,4	75,2	7,2	67,6	0,6	
KA	4,0	DKS	38	58				
		LH	33,6	63,8				
		FC	33,4	60,1	7,2	52,6	0,3	
CM	35,3	DKS	5	94				Gumprechtove sence atipični Ly, limfocitoza
		LH	13,8	80,9				
		FC	4,1	89,4	2,4	85,8	0,2	
PE	46,2	DKS	10	56				veliki limfociti z vidnim nukleolom(23) Gumprechtove sence Ly blasti, limfocitoza, monocitoza
		LH	5,8	78,2				
		FC	5,2	88,1	7,6	79,4	1,1	
BS	183,7	DKS	0	100				Gumprechtove sence Mo blasti, atipični ly
		LH	3,6	89,6				
		FC	0,1	97,3	0,9	96,3	0,1	
LT	132,9	DKS	4	95				Gumprechtove sence atipični Ly, limfocitoza
		LH	6,3	85,2				
		FC	3,4	93,0	0,9	91,7	0,4	
ZL	45,5	DKS	26	74				Gumprechtove sence atipični Ly, limfocitoza, levkocitoza
		LH	11,8	84,6				
		FC	19,2	79,9	5,5	72,2	1,2	
TZ	21,2	DKS	15	83				Gumprechtove sence atipični Ly, limfocitoza
		LH	14,4	82,5				
		FC	12,7	83,8	13,4	70,1	0,3	
SA	17,0	DKS	13	79				veliki limfociti z vidnim nukleolom(6) Gumprechtove sence atipični Ly, limfocitoza
		LH	20,1	76,6				
		FC	24,4	72,5	8,2	63,3	1,0	

4.3.1 Statistično vrednotenje proučevanih parametrov pri bolnikih z B-KLL

Pri skupini bolnikov z B-KLL smo zaradi zadostnega števila vzorcev opravili statistično analizo. Kot pri zdravi populaciji, smo tudi tu za statistično primerjavo vrednosti opazovanih parametrov uporabili Friedmanov test. Pokazal je, da med vrednostmi nevtrofilcev merjenih s tremi različnimi metodami ni statistično značilnih razlik ($p > 0,05$). Razpon vrednosti nevtrofilcev pri vsaki metodi imamo grafično prikazano v obliki kvantilnega diagrama na sliki 28.



Slika 28: Kvantilni diagram porazdelitve vrednosti nevtrofilnih granulocitov pri vsaki od uporabljenih metod populacije bolnikov z B-KLL. Vrednosti na y-osi predstavljajo absolutne vrednosti števila nevtrofilcev merjenih v $10^9/L$.

Največje vrednosti nevtrofilcev kot tudi razpon le-teh smo dobili pri analizatorju LH-ju, prisoten pa je tudi zgornji osamelec (°). Iz pripadajoče preglednice V lahko razberemo, da se srednja polovica vrednosti nahaja med $2,65$ in $6,63 \times 10^9/L$. Pri DKS se ta interval nahaja med $2,10$ in $6,53 \times 10^9/L$, prisotna sta dva zgornja osamelca (°) in en ekstremni osamelec (*). Najmanjši razpon vrednosti pa smo dobili pri metodi z FC, kjer le ta znaša med $2,16$ in $5,57 \times 10^9/L$. Tudi pri tej metodi sta prisotna en zgornji osamelec (°) in en zgornji

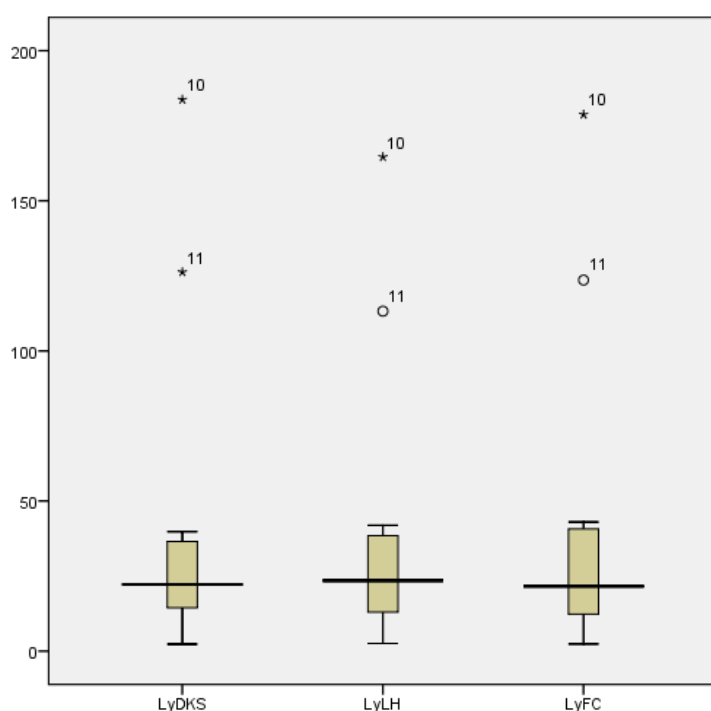
ekstremni osamelec (*). Najvišjo vrednost Me smo dobili pri metodi z LH in znaša $3,62 \times 10^9/L$, najnižjo pa pri metodi z FC, kjer je ta vrednost $3,08 \times 10^9/L$.

Preglednica VIII: Primerjava velikosti prvih kvartilov, median in tretjih kvartilov pri nevtrofilnih granulocitih populacije bolnikov z B-KLL.

	Q ₁	Me	Q ₃
NgDKS	2,10	3,36	6,53
NgLH	2,65	3,62	6,63
NgFC	2,16	3,08	5,57

Q₁-prvi kvartil; Me-mediāna; Q₃-tretji kvartil

Statistična primerjava vrednosti limfocitov populacije bolnikov z B-KLL s Friedmanovim testom je pokazala, da med vrednostmi limfocitov merjenih s tremi različnimi metodami ni statistično značilnih razlik ($p > 0,05$).



Slika 29: Kvantilni diagram porazdelitve vrednosti limfocitov pri vsaki od uporabljenih metod populacije bolnikov z B-KLL. Vrednosti na y osi predstavljajo absolutne vrednosti števila nevtrofilcev merjenih v $10^9/L$.

Slika 29 prikazuje porazdelitve vrednosti limfocitov pri metodah z ročno DKS, LH in FC. Vidimo, da med porazdelitvami limfocitov pri različnih metodah skorajda ni razlik. Tudi vrednosti Me so pri vseh metodah podobne, kar imamo prikazano v preglednici VIII. Prisotni so tudi zgornji osamelci (°) in ekstremni zgornji osamelci (*), in sicer sta pri metodi z DKS prisotna dva zgornja ekstremna osamelca (*), pri metodah z LH in FC pa pri obeh po en zgornji osamelec (°) in en ekstremni zgornji osamelec (*). Prisotnost teh zgornjih osamelcev je verjetno na račun zelo visokega števila levkocitov ter visokega deleža limfocitov pri dveh vzorcih, kar je razvidno iz preglednice VII.

Preglednica IX: Primerjava velikosti prvih kvartilov, median in tretjih kvartilov pri limfocitih populacije bolnikov z B-KLL.

	Q ₁	Me	Q ₃
LyDKS	1,32	2,22	3,73
LyLH	1,21	2,35	3,93
LyFC	1,14	2,16	4,13

Q₁-prvi kvartil; Me-mediana; Q₃-tretji kvartil

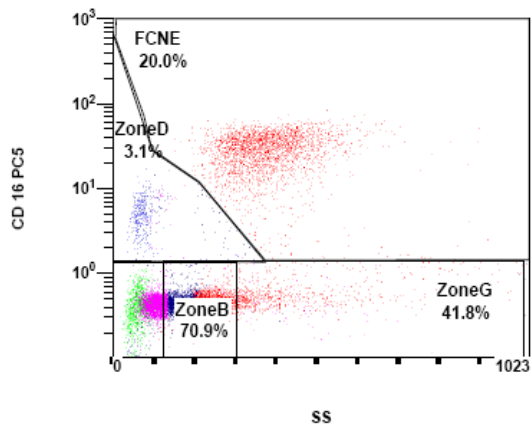
Pri vzorcih bolnikov z NHL in DCL zaradi premajhnega števila vzorcev, nismo delali statistične primerjave, temveč le opisno. S pregledom krvnega razmaza pod svetlobnim mikroskopom pri vseh treh vzorcih zasledimo prisotnost atipičnih limfocitov in dlakastih celic, kar je razvidno iz preglednice XI v prilogi. Z analizo vzorcev na pretočnem citometru Coulter FC500 smo z uporabo celičnih označevalcev CD19 in CD2 limfocite lahko uvrstili le med limfocite B in limfocite T. Pri vzorcih bolnikov z NHL smo tako dobili povišan delež limfocitov B, kar je vidno v preglednici XI v prilogi. Da bi določili, kateri podskupini limfocitov pripadajo atipični limfociti, ter da bi zaznali prisotnost dlakastih celic, bi morali uporabiti celične označevalce, ki prepoznajo antigene na teh celicah.

4.4 Izsledki proučevanih parametrov iz hematološkega analizatorja, mikroskopa in pretočnega citometra pri bolnikih z AL

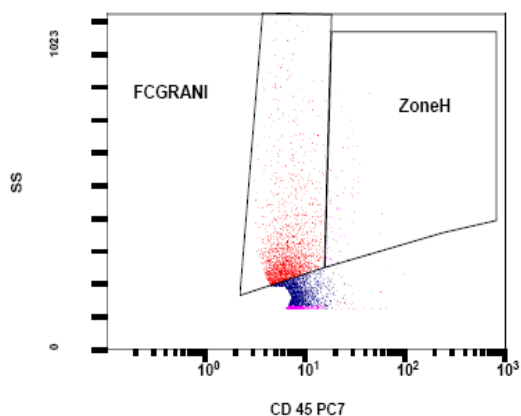
V vzorčno skupino bolnikov z AL je bilo vključenih 11 vzorcev venske krvi. Dva vzorca sta pripadala bolnikoma z ALL, ostali pa bolnikom z AML. Od tega so imeli štirje ugotovljeno akutno mieloblastno levkemijo (vzorci PM, SN, GB in UMU), po dva akutno promielocitno levkemijo (vzorca SU in KJ) in akutno mielomonocitno levkemijo (vzorca ZR in NB) ter en vzorec akutno monoblastno levkemijo (vzorec GT). Statistične analiza nismo opravili zaradi premajhnega števila enakih vzorcev. Vse izmerjene vrednosti pa so prikazane v preglednici XII v prilogi.

Pri skupini bolnikov z akutno mieloblastno levkemijo je bil zanimiv vzorec z oznako PM ki je imel hemogram narejen z analizatorjem LH750 normalen. Pod mikroskopom smo v razmazu periferne krvi prešteli 5% blastnih celic. Isti vzorec krvi smo analizirali tudi s pretočno citometrično analizo, kjer smo zasledili 3% blastnih celic mieloične vrste. Pri drugem vzorcu te podskupine, z oznako SN, smo prešteli v krvnem razmazu pod mikroskopom 100% blastnih celic. Hematološki analizator Coulter LH750 nas je opozoril na prisotnost monoblastov ter na pomik v levo do mielocita. S pretočnim citometrom Coulter FC500 smo določili 68,9% mieloblastov ter 13,9% limfocitov B. Pri vzorcu z oznako UMU se vrednosti dobljene z ročno DKS in pretočnim citometrom ujemajo.

Pri bolnikih z akutno promieleocitno levkemijo smo v razmazu periferne krvi prešteli visok odstotek promielocitov (71% pri vzorcu SU in 51% pri vzorcu KJ). Pretočni citometer Coulter FC500 je zabeležil visok odstotek nezrelih granulocitov, in sicer pri vzorcu SU 62,7% in pri vzorcu KJ 41,8%. V tem področju so zajeti tudi promileociti. Na sliki 30 je prikazana porazdelitev populacije levkocitov v citogramu pri bolniku z akutno promielocitno levkemijo. Promielociti so granulirani in v citogramu CD16/SS padejo v področje G. Pri obeh vzorcih so prisotne tudi blastne celice mieloične vrste. V citogramu na sliki 31 je vidna porazdelitev nezrelih granulocitov. Celice, ki padejo iz področja, ki označuje nezrele granulocite, so mieloblasti.

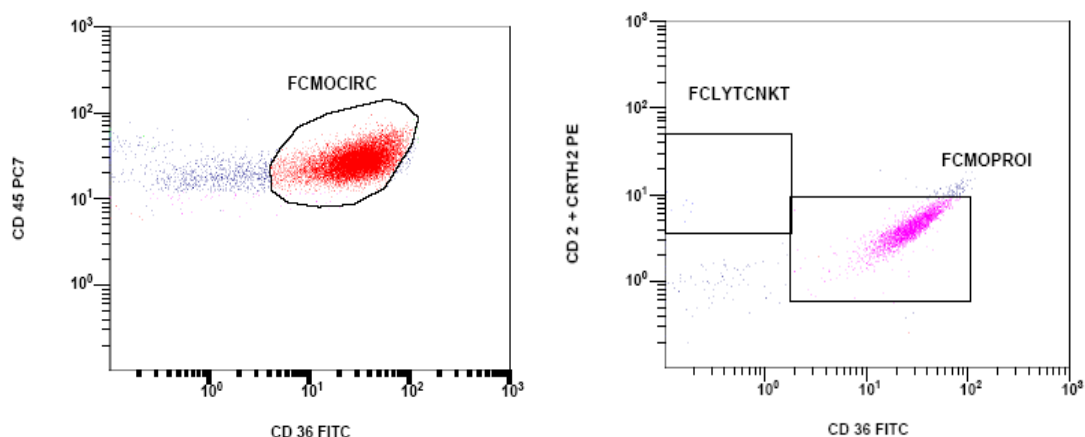


Slika 30: Primer citograma vzorca bolnika z akutno promielocitno levkemijo



Slika 31: Prikaz porazdelitve nezrelih granulocitov v citogramu

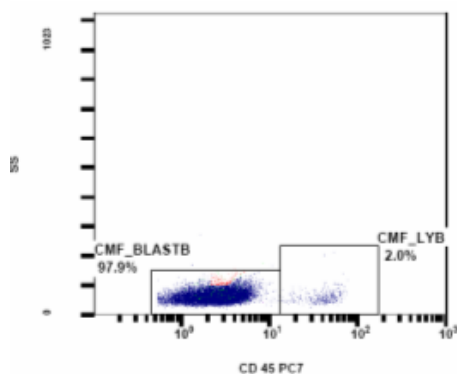
Pri vzorcu bolnika z akutno monoblastno levkemijo so rezultati, ki smo jih dobili s hematološkim analizatorjem Coulter LH750, s pretočnim citometrom Coulter FC500 ter z ročno DKS med seboj primerljivi. Smo pa s pretočnim citometrom poleg 68,8% monocitov, ki so CD36 pozitivni, zaznali tudi 15,1% monocitov, ki izražajo celična označevalca CD36 in CD16. Po literaturnih navedbah (10), te celice uvrščajo med vnetne (inflammatory) monocite. Na sliki 32 sta prikazana citograma z monociti in vnetnimi monociti.



Slika 32: Področje monocitov v citogramu CD36/CD45 in področje vnetnih monocitov v citogramu CD36/CD2+CRTH2

Analizirali smo tudi dva vzorca bolnikov z akutno mielomonocitno levkemijo. Hematološki analizator Coulter LH750 nas je pri vzorcu z oznako ZR opozoril na prisotnost limfoblastov in mieloblastov, pri vzorcu NB pa na prisotnost monoblastov. Vrednosti, ki smo jih dobili z ročno DKS in s pretočnim citometrom, so pri vzorcu ZR med seboj primerljive. Blastne celice pa s pretočno citometrično analizo umestimo med mieloblaste. Pri drugem vzorcu (NB) blastnih celic pod mikroskopom ne zasledimo, medtem ko je pretočni citometer Coulter FC500 zabeleži 1,7 % mieloblastov. Smo pa pri tem vzorcu krvi v krvnem razmazu prešteli 20% normoblastov. Mladi normoblasti imajo na svoji površini antigene za označevalec CD36, z zorenjem pa jih izgubijo. Normoblast niso granulirani ter so CD45 negativni, zato jih s pretočno citometrično analizo in s celičnimi označevalci, ki smo jih mi uporabili, nismo mogli zaznati.

V preiskavo smo vključili tudi dva vzorca z akutno limfoblastno levkemijo (ALL). Z vsemi tremi metodami smo zasledili prisotnost blastnih celic. V preglednici XII je vidno dobro ujemanje rezultatov ročne DKS in pretočnega citometra. Pretočni citometer je celice uvrstil med B-limfoblaste, kar je prikazano na spodnjem citogramu (slika 33).



Slika 33: Citogram z B-limfoblasti

V zadnjo skupino smo uvrstili vzorce bolnikov, ki so imeli različne (ne nujne) krvne bolezni, ki se odražajo v spremenjeni krvni sliki (KML, AT, sarkoidozo, MA in infektivno mononukleozo-IF)

Pri vzorcu bolnika s KML so v krvnem razmazu prisotne vse razvojne stopnje belih krvnih celic, kar vidimo v preglednici XIII.

Pri vzorcu krvi bolnika z IF smo v krvnem razmazu zasledili poleg 40% normalnih limfocitov še 20% virocitov. V preglednici XIII, pod oznako IF-GU, so prikazane vse izmerjene vrednosti pri danem vzorcu. S pretočnim citometrom smo izmerili približno 62% vseh limfocitov, od tega jih je 60,9% umestil med limfocite T. Za točno določitev odstotka virocitov na pretočnem citometru bi morali uporabiti še celične označevalce, ki prepoznajo antigene na teh celicah.

Pri vzorcih z avtoimunsko trombocitopenijo, sarkoidozo, levkopenijo in mikrocitno anemijo v krvnih slikah opravljenih na vse tri načine ne zasledimo velikih posebnosti in razlik, le odstotek limfocitov izmerjenih na pretočnem citometru Coulter FC500 je nekoliko manjši kot pri ostalih dveh metodah.

5 RAZPRAVA

Glavni namen našega dela je bila avtomatizacija diferencialne krvne slike s pomočjo analize na pretočnem citometru. Želeli smo v enem koraku čim širše zajeti vse populacije celic, ki so lahko prisotne v venski krvi zdrave populacije ter pri nekaterih značilnih krvnih boleznih.

Statistično smo vrednotili skupini zdravih preiskovancev ter skupino bolnikov z B-KLL pri katerih smo imeli zadostno število vzorcev. Za statistično primerjavo vseh treh metod pri petih celičnih vrstah (Ne, Ly, Mo, Eo in Ba) smo uporabili neparametrični Friedmanov test. Naša metoda in celični označevalci, ki smo jih uporabili, je primerna predvsem za diferenciacijo normalnih vzorcev ter za umestitev limfocitov v B in T celično vrsto. Subpopulacije limfocitov T pa smo umestili še v dve podskupini, in sicer skupino citotoksičnih limfocitov T in NK celic ter skupino necitotoksičnih limfocitov T. Ti dve skupini smo med sabo ločili na podlagi izražanja celičnega označevalca CD16, ki je prisoten na citotoksičnih limfocitih T in NK celicah, necitotoksični limfociti T pa ne izražajo antigena za to protitelo.

Pri zdravi populaciji so statistični izsledki pokazali statistične razlike vrednosti mediane števila limfocitov med že rutinsko uveljavljenima metodama (ročna DKS in LH) ter med metodo pretočne citometrije (FC), ki smo jo uporabili v diplomski nalogi. Vrednosti limfocitov merjenih z metodo FC so v primerjavi z ostalima dvema nekoliko nižje. Vzrok je verjetno v neenotni populaciji limfocitov, ki sodijo v različne celične vrste in podvrste ter s tem izražajo različne antigene, mi pa smo jih skozi postopke zamejevanja lahko delno izgubili. Nasprotno pa smo pri skupini bolnikov z B-KLL s Friedmanovim testom pokazali, da ni statistično značilnih razlik med vrednostmi limfocitov merjenimi z različnimi metodami. To si lahko razlagamo z dejstvom, da je pri tej bolezni prisotna enotna populacija limfocitov, in sicer limfocitov B, kar je razvidno tudi iz preglednice XI v prilogi, katere smo mi s celičnim označevalcem CD19 zelo dobro zaznali. Tudi hematološki analizator nas je v skoraj vseh primerih opozoril na nepravilnosti v limfocitni vrsti z obvestili kot so limfocitoza, limfoblasti, različni limfociti..., le v enem primeru ni dal nobenih opozoril, kljub povišanemu deležu limfocitov.

Pri vzorcih bolnikov z AL zaradi premajhnega števila homogenih vzorcev nismo opravili statistične analize. Celotno skupino je sestavljalo 11 vzorcev venske krvi, ki so imeli ugotovljene različne oblike te bolezni. Med vsemi je bil najbolj zanimiv vzorec z oznako PM, pri katerem hematološki analizator ni dal nobenih opozoril in tudi vsi parametri krvne slike so bili v normalnih mejah (preglednica XII). Z ostalima metodama pa smo zabeležili blaste, ki smo jih nato z metodo FC umestili med mieloblaste. Ta primer že kaže na potrebo po novih, bolj natančnih metodah diferenciacije belih krvnih celic.

Pri vseh ostalih vzorcih bolnikov z AML nas je že hematološki analizator opozoril na prisotnost patoloških celic v krvi, ki smo jih nato z metodo ročne DKS le še potrdili. Tudi z metodo FC smo zaznali prisotnost mieloblastov in nezrelih granulocitov, vendar pa je njihova detekcija nenatančna in potrebuje naknadno določanje, in sicer zato, ker smo mieloblaste opredelili le glede granuliranosti in izražanja označevalca CD45. Mieloblasti niso (ali so malo) granulirani, izražanje celičnega označevalca CD45 pa je šibko. Za njihovo bolj natančno detekcijo bi morali uporabiti še druge označevalce, ki so specifični za blaste mieloične vrste. Tudi za detekcijo promielocitov, ki so značilni za akutno promielocitno levkemijo, bi morali uporabiti druge, zanje specifične označevalce, ker smo jih mi z našo metodo umestili zgolj v nezrele granulocite. Na tem mestu velja omeniti vzorec bolnika z diagnozo KML, za katero je značilna prisotnost vseh razvojnih stopenj celic granulocitne vrste. Če primerjamo rezultate metode FC vzorcev bolnika s KML ter bolnikov z akutno promielocitno levkemijo (KJ in SU), bi z uporabo te metode lahko prišlo do napačne diagnoze.

Kot bolj učinkovita in natančnejša metoda pa se je metoda FC pokazala v primeru dveh vzorcev bolnikov z ALL, kjer smo blaste lahko opredelili ali pripadajo B ali T limfoblastom ter s tem že delno opredelili bolezen.

V venski krvi pa so lahko prisotne tudi druge patološke celice, kot so plazmatke, dlakaste celice, limfomske celice, prolimfociti, virociti in druge, ki pa jih z našim načinom določanja ne moremo opredeliti, opredelimo pa jih lahko z metodo ročne DKS.

Glede na vsa našeta dejstva, so novejši pristopi k avtomatski izdelavi DKS primerni za velike splošne laboratorije kot presejalna preiskava za zmanjšanje števila potrebnih ročnih diferencialnih slik. Le-te bodo še vedno potrebne pri vseh sumljivih vzorcih. Na osnovi rezultatov našega dela pa bi lahko neposredno opravili dokončno imunofenotipizacijo tudi

pri nekaterih malignih limfomih (predvsem pri KLL), ki jo ta pristop dobro prepozna. Pri akutnih levkemijah z dobljenimi rezultati našega dela ne moremo napraviti dokončnih zaključkov zaradi premajhnega števila vzorcev pri posamezni podvrsti AL. Smo pa z našo metodo dobro zaznali prisotnost blastnih celic in določili ali pripadajo mieloični ali limfoblastni vrsti.

Na koncu smo primerjali še cene vseh treh metod za analizo enega vzorca. Celotna krvna slika s hematološkim analizatorjem stane 2,51 evra, ročna DKS z mikroskopom stane 2,79 evra in samo reagenti za diferenciacijo na pretočnem citometru za en vzorec stanejo 35,34 evrov. Vidimo, da je preiskava na pretočnem citometru v primerjavi z otalima dvema, veliko dražja in že zato ni primerna za male specializirane laboratorije, kot je SHL.

Pregled krvnega razmaza zaenkrat ostaja še vedno osnovna preiskava za določitev prve diagnoze in za usmeritev v nadaljnje preiskave pri ostalih boleznih, ki se odražajo v spremenjeni beli krvni sliki.

6 SKLEPI

Za določitev diferencialne bele krvne slike smo uporabili šest specifičnih celičnih označevalcev, in sicer CD36-FITC, CD2-PE, CRTH2-PE, CD19-ECD, CD16-PC5 in CD45-PC7.

Z uporabljenimi označevalci smo skušali v enem koraku zajeti 12 različnih vrst krvnih celic, in sicer mieloblaste, nezrele granulocite, nevtrofilce, eozinofilce, bazofilce, monocite, vnetne monocite, limfocite B, T in NK celice ter limfoblaste B in T. To nam je tudi uspelo, le da smo NK celice in citotoksične limfocite T umestili v eno skupino, necitotoksične limfocite T pa v drugo skupino.

Pri zdravi populaciji smo zelo dobro zaznali vse populacije celic.

Z uporabljenimi protitelesi smo določili imunofenotip limfocitom, blastne celice smo umestili med mieloblaste ali limfoblaste ter določili področje nezrelih granulocitov. Za ostale patološke celice, ki so tudi lahko prisotne v venski krvi, pa bi morali uporabiti zanje specifična protitelesa.

Primerjava rezultatov, dobljenih z vsemi tremi metodami, je pokazala zelo dobro ujemanje pri skupini bolnikov z B-KLL ter pri skupini bolnikov z B-ALL, kjer smo z našo metodo še dodatno lahko določili imunofenotip limfocitom. Nekoliko slabše rezultate smo dobili pri skupini zdravih preiskovancev, predvsem na račun populacije limfocitov, ki so med seboj morfološko najbolj različni. Najslabše ujemanje rezultatov pa smo ugotovili pri bolnikih z AML.

7 LITERATURA

1. Pretnar J., Kralj J., Podgornik H., Pajič T., Žontar D.: Laboratorijske preiskave v klinični hematologiji; Poglavje 12, Bolezni krvi in krvotvornih organov, Interna medicina, glavni urednik Kocjančič A, Mravlje F., 3. izdaja, Littera Picta, d.o.o., 2005: 1172-90
2. Pivk bređa: Laboratorijska hematologija, Ljubljana 2003: 75-80
3. <http://sl.wikipedia.org/wiki/levkociti>
4. AccuFlex™ Technology, Detailed principles of operation, Reference manual, Miami, 1999
5. <http://biology.berkeley.edu/crl/flow-cytometry>
6. Ihan Alojz: Klinična uporaba analize limfocitnih populacij s pretočnim citometrom, Kemomed, Kranj, 1999:7-21
7. Robinson J. P.: Flow cytometry, Encyklopedia of biomaterials and biomedical engineering, 2004: 630-37
8. http://www.sysmexeurope.com/files/articles/Xtra_AutomatedDigitalMorphology.pdf
9. Faucher JL, Lacronique-Gazaille, Frebet E, Trimoreau F, Donnard M, Bordessoule D, Lacombe F, et al. »6 Markers/5 Colors« Extended White Blood Cell Differential by Flow Cytometry. Cytometry A. 2007; 71: 934-44
10. Bjornsson S, Wahlstrom S, Nostrom E, Bernevi I, O'Neill U, Johansson E, Runstrom H, et.al. Total nucleated cell differential for blood and bone marrow using a single tube in a five-color flow cytometry. Cytometry B. 2008; 74:91-103
11. <http://www.onko-i.si/uploads/articles/1-2003-kloboves.pdf>
12. Košmelj K: Uporaba statistike, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 2001: 43-49, 53-61
13. Jaffe ES, Harris NL, Stein H., Vardiman JW.:Chronic Lymphocytic leukemia / small lymphocytic lymphoma; Pathology and Genetics. Tumors of Haematopoetic and Lymphoid Tissues. World Health organisation classification of tumors, Eds., IARC Pres, Lyon, 2001: 127-30

8 PRILOGA

Preglednica X: Izsledki proučevanih parametrov normalnih vzorcev venske krvi

ZDRAVI				LIMFOCITI						
vzorec	Št.Lkc 10⁹/L		Ne%	Ly	LyT%	LyB%	NK%	Mo%	Eo%	Ba%
ZA	5,8	DKS	53	36				5	5	1
		LH	60,1	27,6				7,4	4,1	0,8
		FC	63,0	21,5	16,7	1,7	3,1	7,0	4,1	0,7
ZM	5,9	DKS	48	44				7	0	1
		LH	48,4	36,4				11,6	2,7	0,9
		FC	47,7	31,9	25,7	4,2	2,0	11,8	2,4	2,2
JN	6,2	DKS	68	28				4	0	0
		LH	65,2	24,9				8,3	1,0	0,6
		FC	65,0	24,4	16,2	4,6	1,6	7,8	1,1	1,0
TK	5,5	DKS	52	39				9	0	0
		LH	50,5	37,9				9,5	1,5	0,6
		FC	51,9	31,3	28,3	2,4	0,6	9,7	1,6	0,2
SGI	9,1	DKS	67	23				7	2	1
		LH	62,4	25,1				8,7	2,6	1,2
		FC	69,1	14,9	12,1	2,3	0,5	8,6	2,8	0,8
AS	6,6	DKS	51	46				2	1	0
		LH	52,5	34,7				9,1	3,0	0,7
		FC	51,7	30,4	24,7	3,0	2,7	9,7	2,9	0,5
PJ	9,0	DKS	59	27				12	1	1
		LH	62,6	22,1				11,6	3,2	0,5
		FC	60,7	19,3	14,8	2,9	1,6	11,6	3,0	0,5
MM	8,6	DKS	59	30				6	5	0
		LH	61,2	27,4				7,5	3,4	0,5
		FC	61,2	21,1	16,3	1,5	3,3	8,2	3,7	0,2
MB	6,1	DKS	45	34				9	12	0
		LH	41,5	34,5				10,8	12,4	0,8
		FC	40,4	22,8	19,1	1,6	2,1	8,5	12,1	0,7
KP	6,7	DKS	55	32				11	2	0
		LH	63,2	26,7				7,0	2,2	0,9
		FC	62,6	25,5	22,4	2,2	0,9	6,9	2,3	0,4
BA	6,3	DKS	54	40				4	1	1
		LH	57,6	31,6				8,1	2,2	0,5
		FC	57,4	23,9	19,4	2,6	2,0	8,1	1,9	0,6
DK	8,8	DKS	65	25				6	4	0
		LH	59,4	31,2				6,5	2,6	0,3
		FC	54,3	32,6	25,2	4,6	2,8	6,9	2,1	0,4
MZ	4,4	DKS	66	23				8	2	1
		LH	58,2	31,8				8,9	0,6	0,5
		FC	58,3	25,9	21,0	2,9	2,0	9,4	0,6	0,4
JL	8,8	DKS	56	23				14	7	0
		LH	59,4	25,1				8,4	6,4	0,7
		FC	59,9	21,5	17,5	3,4	0,6	8,8	4,5	0,5
AB	6,7	DKS	53	41				2	3	1
		LH	54,6	34,9				6,9	3,2	0,4
		FC	65,1	17,9	15,3	1,8	0,8	7,0	3,5	0,4

Preglednica XI: Izsledki proučevanih parametrov pri vzorcih bolnikov z ML

KLL				LIMFOCITI							
vzorec	Št.Lkc 10 ⁹ /L		Ne%	Ly%	LyT%	LyB%	NK%	Mo%	Ba%	Eo%	opombe
SS	31,8	DKS	32	66				2	0	0	
		LH	21	72,9				5,5	0,3	0,3	atipični Ly, limfocitoza monocitoza
		FC	28,7	63,5	7,7	55,1	0,7	1,8	0,1	0,3	
LM	12,4	DKS	23	71				3	3	0	Gumprechtove sence
		LH	19,5	72,2				5,9	2,0	0,4	limfocitoza
		FC	19,9	69,7	12,6	56,2	0,9	5,6	0,4	1,4	
KF	26,9	DKS	12	87				1	0	0	Gumprechtove sence
		LH	9,6	88,6				0,2	0,6	1,0	Ly blasti, različni Ly, limfocitoza
		FC	9,6	85,4	8,1	75,7	1,6	0,8	0,0	0,5	
DM	57,7	DKS	29	69				2	0	0	Gumprechtove sence
		LH	25,7	72,7				1,2	0,2	0,2	Limfocitoza, levkocitoza
		FC	20,1	77,2	2,7	74,5	0,0	1,3	0,1	0,2	
DH	14,0	DKS	25	68				3	3	1	
		LH	27,3	67,2				3,5	1,8	0,2	limfocitoza
		FC	28,2	62,1	8,7	52,5	1,9	3,1	0,3	1,3	
GD	21,1	DKS	19	62				0	0	0	veliki limfociti z vidnim nukleolom(19) Gumprechtove sence
		LH	15,0	80,6				1,8	0,4	2,2	limfocitoza
		FC	16,4	75,2	7,2	67,6	0,6	1,5	0,6	0,2	
KA	4,0	DKS	38	58				0	4	0	
		LH	33,6	63,8				1,2	1,2	0,2	
		FC	33,4	60,1	7,2	52,6	0,3	1,2	0,1	1,5	
CM	35,3	DKS	5	94				1	0	0	Gumprechtove sence
		LH	13,8	80,9				2,0	0,1	3,2	atipični Ly, limfocitoza
		FC	4,1	89,4	2,4	85,8	0,2	1,0	0,7	0,1	
PE	46,2	DKS	10	56				8	0	0	veliki limfociti z vidnim nukleolom(23) Gumprechtove sence
		LH	5,8	78,2				12,7	0,0	3,3	Ly blasti, limfocitoza, monocitoza
		FC	5,2	88,1	7,6	79,4	1,1	3,5	0,1	0,2	
BS	183,7	DKS	0	100				0	0	0	Gumprechtove sence
		LH	3,6	89,6				5,9	0,1	0,8	Mo blasti, atipični ly
		FC	0,1	97,3	0,9	96,3	0,1	0,1	0,0	0,0	
LT	132,9	DKS	4	95				1	0	0	Gumprechtove

											sence
		LH	6,3	85,2				6,0	0,2	2,3	atipični Ly, limfocitoza
		FC	3,4	93,0	0,9	91,7	0,4	1,0	0,1	0,2	
ZL	45,5	DKS	26	74				0	0	0	Gumprechtove sence
		LH	11,8	84,6				2,8	0,4	0,4	atipični Ly, limfocitoza, levkocitoza
		FC	19,2	79,9	5,5	72,2	1,2	1,1	0,1	0,2	
TZ	21,2	DKS	15	83				1	0	1	Gumprechtove sence
		LH	14,4	82,5				2,6	0,4	0,1	atipični Ly, limfocitoza
		FC	12,7	83,8	13,4	70,1	0,3	1,0	0,1	0,1	
SA	17,0	DKS	13	79				2	0	0	veliki limfociti z vidnim nukleolom(6) Gumprechtove sence
		LH	20,1	76,6				2,8	0,3	0,2	atipični Ly, limfocitoza
		FC	24,4	72,5	8,2	63,3	1,0	1,3	0,1	0,2	
NHL					LIMFOCITI						
vzorec			Ne%	Ly%	LyT%	LyB%	NK%	Mo%	Ba%	Eo%	
NK	11,9	DKS	27	45				3	2	0	limfociti z rahlo strukturo kromatina in vidnim nukleolom(23)
		LH	21,3	54,5				21,9	2,0	0,3	Ly blasti, atipični ly
		FC	25,0	65,5	11,4	51,6	2,5	5,3	0,5	2,1	
VR		DKS	32	38				5	0	2	atipično veliki limfociti(9)
		LH	27,6	55,8				15,9	0,1	0,6	Ly blasti, pomik do mielocita
		FC	30,0	62,3	16,1	43,1	3,1	4,2	0,5	0,2	
DCL											
VD		DKS	37	57				2	1	0	
		LH	40,9	53,4				4,4	1,1	0,2	
		FC	38,5	47,0	40,7	4,5	1,8	2,5	3,5	0,7	

Preglednica XII: Izsledki proučevanih parametrov pri vzorcih bolnikov z AL

AML													
vzorec	metoda	Blast %	Prom %	Mielo %	Meta %	Pal Gran.%	Ne%	Ly%	Mo%	Nrbc %	Eo %	Ba %	opomba
PM	DKS	5	0	0	0	0	67	19	8	0	1	0	
	LH	/					66,4	24,4	6,9	1,9	0,4	0,0	
	FC	3,0	0,1				66,9	19,4	6,9	1,9	0,1	/	
SN	DKS	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	LH	/					39,8	2,0	58,1	0,1	0,0	0,0	Mo blasti pomik do mielocita

	FC	68,9	8,2				0,4	13,9 lyB	0,1	0,5	1,0	/	
GB	DKS	72	0	5	1	1	8	6	3	4	0	0	
	LH	/					91,6	7,8	0,4	0,2	0,0	0,0	Ne blasti, pomik do mielocita
	FC	43,0	7,4				14,6	16,6	20,7	1,0	0,1	/	
UMU	DKS	40	3	0	0	0	1	48	4	3	1	0	
	LH	/					38,5	35,7	25,3	0,3	0,2	0,0	Mo blasti
	FC	56,2	1,5				1,8	34,8	2,0	2,2	1,2	/	
KJ	DKS	25	51	0	0	0	16	6	0	2	0	0	
	LH	/					22,0	6,5	70,7	0,7	0,1	0,0	Mo in Ne blasti, pomik do mielocita
	FC	30,5	41,8				18,0	7,8	0,4	0,6	0,3	/	
SU	DKS	18	71	0	0	0	4	7	0	0	0	0	
	LH	/					89,8	3,9	6,2	0,1	0,0	0,0	Mo blasti pomik do mielocita
	FC	30,1	62,7				2,2	2,2	0,4	0,1	0,0	/	
GT	DKS	4	0	1	1	2	1	1	90	0	0	0	
	LH	/					30,2	3,7	66,1	0,0	0,0	0,0	Mo blasti pomik do mielocita
	FC	2,9	0,4				3,9	3,2	68,8 15,1	0,9	0,0	/	
ZR	DKS	31	5	15	3	1	14	16	13	2	0	0	
	LH	/					50,8	15,0	33,8	0,2	0,2	0,0	Ly in Ne blasti, pomik do mielocita
	FC	30,8	28,9				12,3	13,6	8,9	0,9	0,0	/	
NB	DKS	0	3	11	14	10	8	14	37	/	3	0	
	LH	/					44,9	14,1	39,2	1,5	0,3	14,6	Mo blasti pomik do mielocita
	FC	1,7	30,7				16,1	12,2	35,7	2,2	0,1	/	
ALL													
PD	DKS	97	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	
	LH	/					65,2	23,7	11,1	0,0	0,0	0,0	Mo blasti pomik do mielocita
	FC	95,2 B- blasti	0,0				0,2	0,4	0,0	0,1	1,8	/	
ZZ	DKS	67	0	0	0	1	13	15	0	0	1	1	
	LH	/					20,9	75,9	2,2	0,3	0,7	0,0	Ly blasti, pomik do mielocita
	FC	66,7 B- blasti	1,5				19,5	5,5	0,6	0,4	0,3	/	

Preglednica XIII: Izsledki proučevanih parametrov pri ostalih vzorcih

			LIMFOCITI							
OSTALO	metoda	Ne%		LyT%	LyB%	NK%	Mo%	Ba%	Eo%	opombe
IF-GU Infektivna mononukleozna	DKS	33	40				6	0	0	20 virociti
	LH	33,7	59,0				6,1	0,6	0,6	Mo blasti
	FC	25,5	62,3	60,9	0,8	0,6	4,5	0,5	1,2	/
AT-KR Avtoimunska trombocitopenija	DKS	29	56				6	7	2	/
	LH	32,6	49,9				9,8	6,0	1,7	/
	FC	30,8	38,1	31,6	5,4	1,1	8,3	1,8	6,3	/
S-GA sarkoidoza	DKS	91	9				0	0	0	/
	LH	90,4	7,7				1,9	0,0	0,0	/
	FC	90,7	5,2	2,9	2,0	0,3	1,7	0,0	0,0	/
L-KL levkopenija	DKS	34	56				4	2	4	/
	LH	38,4	46,4				11,9	2,5	0,8	/
	FC	37,5	45,8	34,4	2,6	8,8	10,7	1,4	2,4	/
MA-GL Mikrocitna anemija	DKS	59	27				6	6	2	/
	LH	61,9	26,0				7,0	4,5	0,6	/
	FC	61,6	23,1	11,0	1,5	10,7	5,6	1,0	4,1	/

OSTALO													
vzorec	metoda	Blast %	Prom %	Mielo %	Meta %	Pal Gran.%	Ne%	Ly%	Mo%	Nrbc %	Eo %	Ba %	opomba
KML-BA	DKS	2	1	19	19	12	39	0	1	5	0	2	
	LH						94,1	2,8	1,6	1,5	0,0	2,0	Pomik do mielocita
	FC	2,2	45,1				37,7	3,5	5,0	6,9	0,0	/	