

Základy Hematologie/ZHEM

Úvodní přednáška

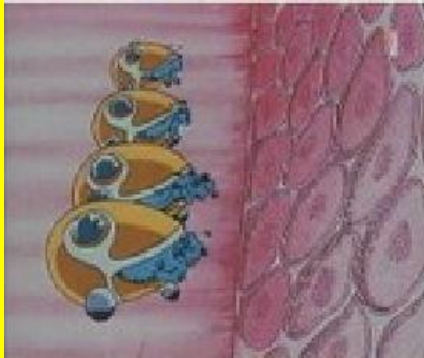


Radim Vrzal

Katedra buněčné biologie a genetiky

Hematologie – obor zabývající se studiem
krve, krvetvorných orgánů a krevních
onemocnění (ř.s. *haima* = krev, *logos* = slovo,
rozmluva)

Proč? – změna ve složení = indikace poruchy v
krvetvorných orgánech nebo v degradaci → včasná
diagnóza



- transport plynů – erytrocyty



- obrana – leukocyty



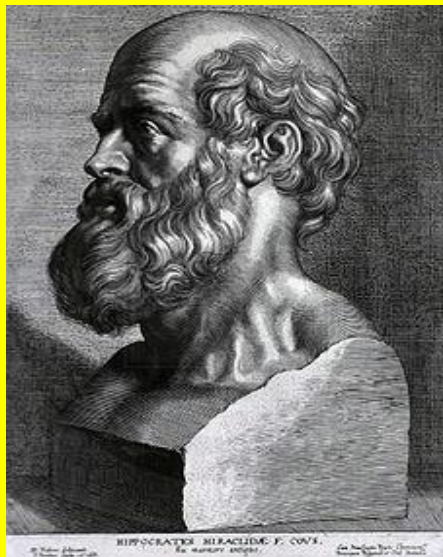
- koagulace - destičky



Historické aspekty

Starověký Egypt, Řecko – pouštění žilou „blood letting“
(někdy prospěšné, snížení hypertenze)

Dnes: flebotomie – „proříznutí žíly“
– hemochromatosa, polycytemie



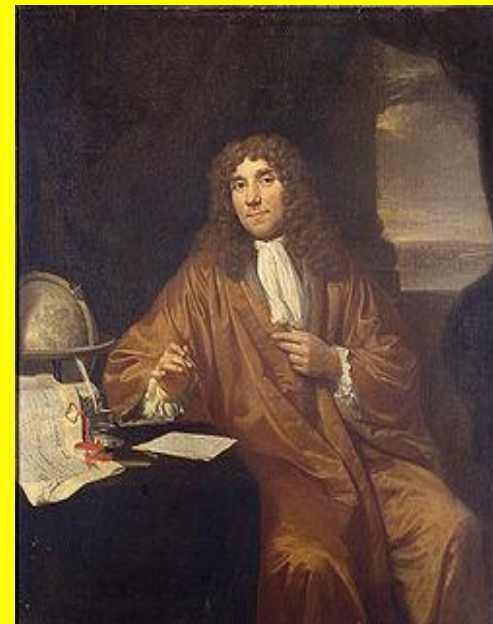
- 460-377 př.Kr. – Hippokrates a humorální teorie - vysvětlení nemoci, jako nerovnováhy mezi 4 základními tekutinami lidského těla

Historické aspekty II.



1628 – William Harvey – koncept cirkulace -
krev proudí v celém těle

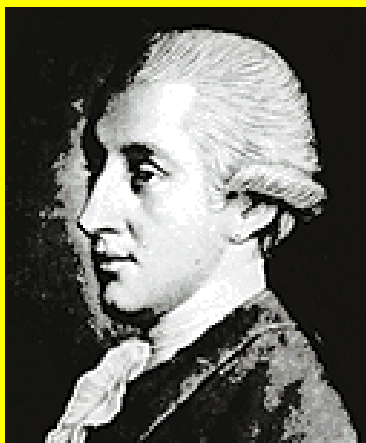
**1642 – Antonie van →
Leeuwenhoek – konstrukce
mikroskopu - rozlišení krevních
buněk**



-1656 – Christopher Wren –
první intravenosní injekce
psovi, o 6 let později člověku
(Johann Daniel Major)→



Historické aspekty III.



- **1770 – William Hewson - „otec hematologie“** - popis leukocytů a některých srážecích faktorů

- **1818 – James Blundell - první transfuze krve z člověka člověku**

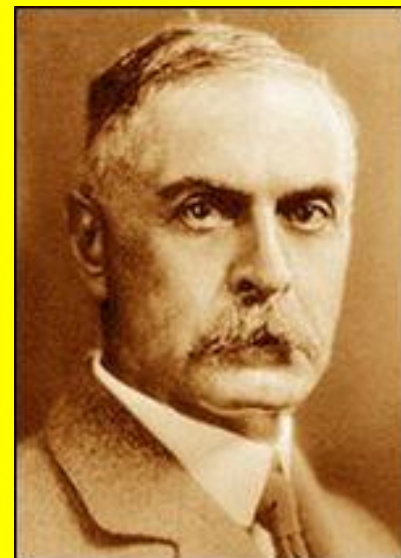
- **1842 – Alfred Donné – identifikace krevních destiček**

- **1877 - Paul Ehrlich - barvení krevních buněk**

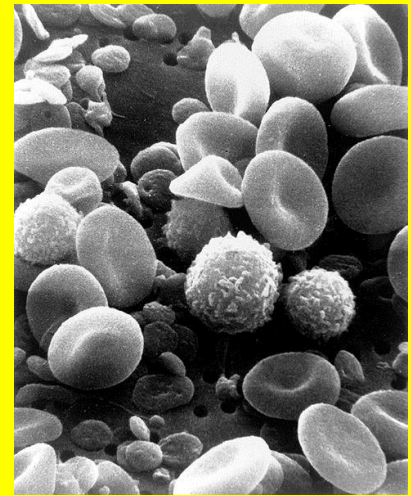
- **1901 – Karl Landsteiner – identifikace krevních skupin**

- **1914 – citrát sodný zabraňuje srážení krve (skladování krve)**

- **1936 – vznik první krevní banky (Chicago, USA)**
- **2. polovina 20. st. – použití antihemolitických faktorů, afarézy, klinické použití G-CSF, IL3, atd.**



Krev I.



Suspenze krevních elementů v plazmě

Červené krvinky = erythrocyty (*erythros* = červený, *kýtos* = buňka)

Bílé krvinky = leukocyty (*leukos* = bílý)

- polymorfonukleární – vícejaderné
- mononukleární

Krevní destičky = trombocyty (*thrombos* = sedlina, sraženina)

- **Spojuje všechny orgány a tkáně v těle**

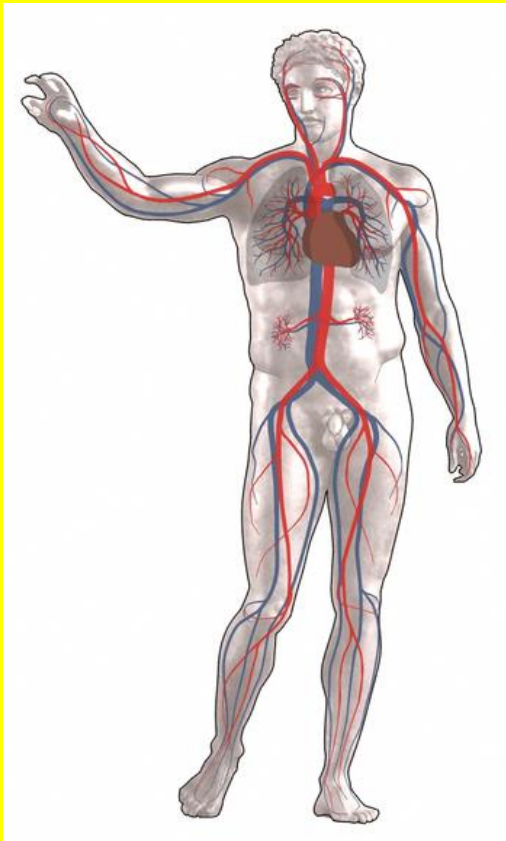
→ **udržuje homeostázu**

- **Funkce: dýchací** (CO_2 , O_2), **výživná** (cukry, proteiny, lipidy, vitamíny, minerály), **odvodná** (bilirubin, metabolity léčiv, atd.)

- Proudí v **žilách**/vénách a **tepších**/arteriích



- **Tvoří 7-10% celkové tělesné hmotnosti,**
tj. 4,5 - 6 litrů

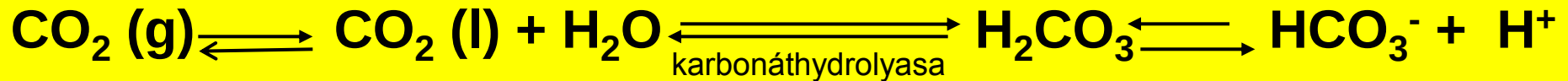


Krev II.

-Regulátor acidobazické rovnováhy (krev pH = 7,4 ± 0,04; pH < 7,36 = acidóza; > 7,44 = alkalóza)

Zajištění pH = konst. → pufrovací systémy

1) Hydrogenkarbonátový (v plazmě) – otevřený



pH dle Henderson-Hasselbachovy rovnice:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log [\text{HCO}_3^-]/[\text{H}_2\text{CO}_3], [\text{H}_2\text{CO}_3] = \alpha * \text{pCO}_2$$

α – koeficient rozpustnosti plynu v plazmě (z Henryho zákona),

$$[\text{H}_2\text{CO}_3] = 0,224 \text{ mmol/l.kPa} * 5,33 \text{ kPa} = 1,2 \text{ mmol/l}; \text{pK}_a = 6,1 (37^\circ\text{C})$$

2) Hemoglobinový (erythrocyty)



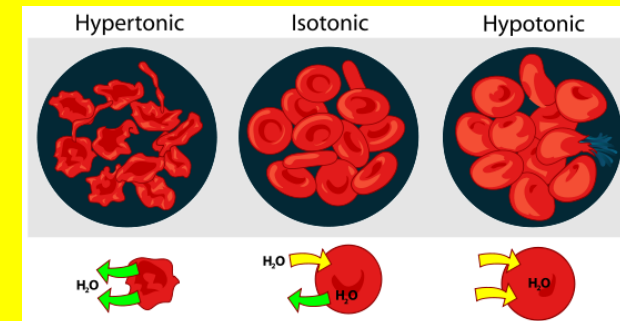
(protonizace koncového His v β -řetězcích)

3) Proteinový – disociace postranních řetězců, malý význam

4) Fosfátový – nízká koncentrace PO_4^{3-} , malý význam, uplatnění v moči

Krevní plazma I.

- Nažloutlý vodný roztok bílkovin, elektrolytů, malých organických molekul
- **Sérum** (lat. *serum* = syrovátka) = **plazma bez fibrinogenu či faktorů krevní srážlivosti**
- pH ~7,4 ($c(\text{H}^+) = 40 \text{ nM}$)
- Voda tvoří ~90%
- ~ 5% tělesné hmotnosti, tj. asi 2,8-3,5 l
- **280-300 mOsm/l** – koncentrace osmoticky aktivních látek (solí, glukosa)



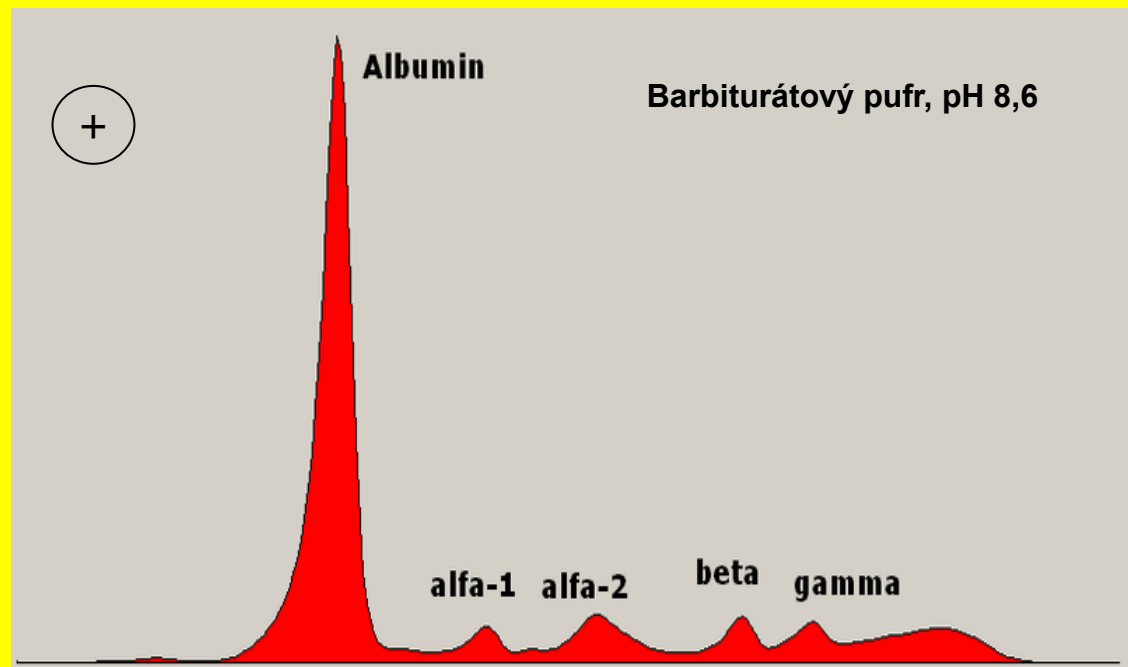
Krevní plazma II.

Anorganické ionty:

Na⁺	- 136-148 mM	- udržení stálého osmotického tlaku
Cl⁻	- 95-110 mM	- udržení osm.tlaku, tvorba HCl
HCO₃⁻	- 22-26 mM	- transport CO ₂ , pufrovací systém
K⁺	- 3.7-5 mM	- excitabilita svalů a nervů
Mg²⁺	- 0.66-0.94 mM	- tlumivé účinky na nervovou dráždivost, nezbytný pro enzymy
Ca²⁺	- 2.15-2.61 mM	- srážení krve, nervosvalový přenos
PO₄³⁻	- 0.6-1.4 mM	- pufrovací systém
Fe	- 10-27 μM	- tvorba Hb, součást enzymů
I⁻	- 275-630 μM	- tvorba hormonů štítné žlázy
Cu²⁺	- 12-22 μM	- součást enzymů, krvetvorba

Krevní plazma III.

- Bílkoviny - 65-85 g/l
 - albuminy (35-50 g/l), globuliny (30 g/l) (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ)
 - fibrinogen (4 g/l)
 - zdroje: **játra**, B-lymfocyty



- diagnostický význam (ALP, AST, ALT)

Krevní plazma IV.

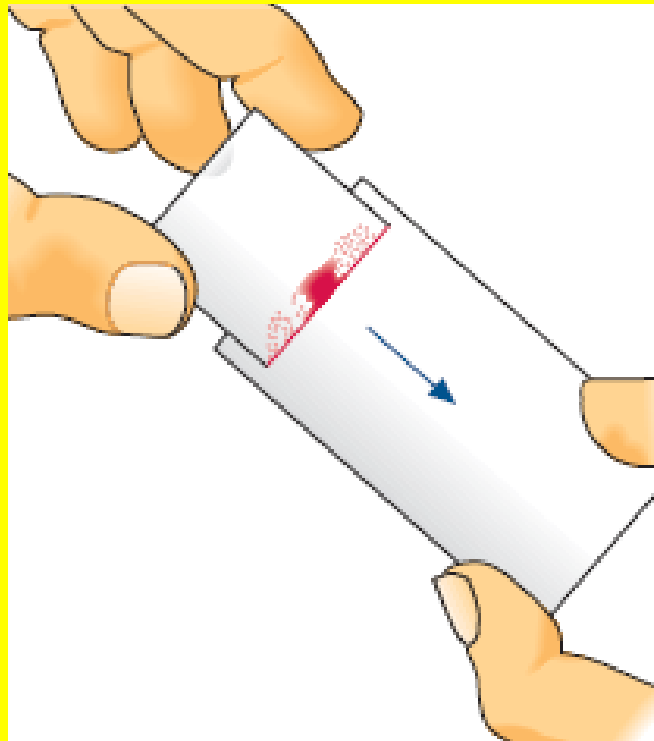
Funkce bílkovin:

- udržování stálého objemu plasmy
- onkotický tlak / ztráta proteinů → edém
- **transport** – albuminy (transport bilirubinu, mast.kyselin, léků; T3, T4, vit.A), apolipoproteiny (TGA, cholesterol), transferin (Fe), ceruloplasmin (Cu), transkortin (Cortisol), transkobalamin (B12), hemopexin (hem)
- **udržování izohydrie** – slabé kyseliny vážící H^+
- **nutriční význam**
- **proteolytické systémy** – koagulační, fibrinolytický, komplement
- **plazmatické inhibitory proteáz** (α 1-antitrypsin; antitrombin III)
- **obrana organismu proti infekci** – γ -globuliny

Ostatní organické molekuly – hormony, vitamíny, glukóza, nebílkovinné látky, lipidy

Krevní nátěr (blood smear)

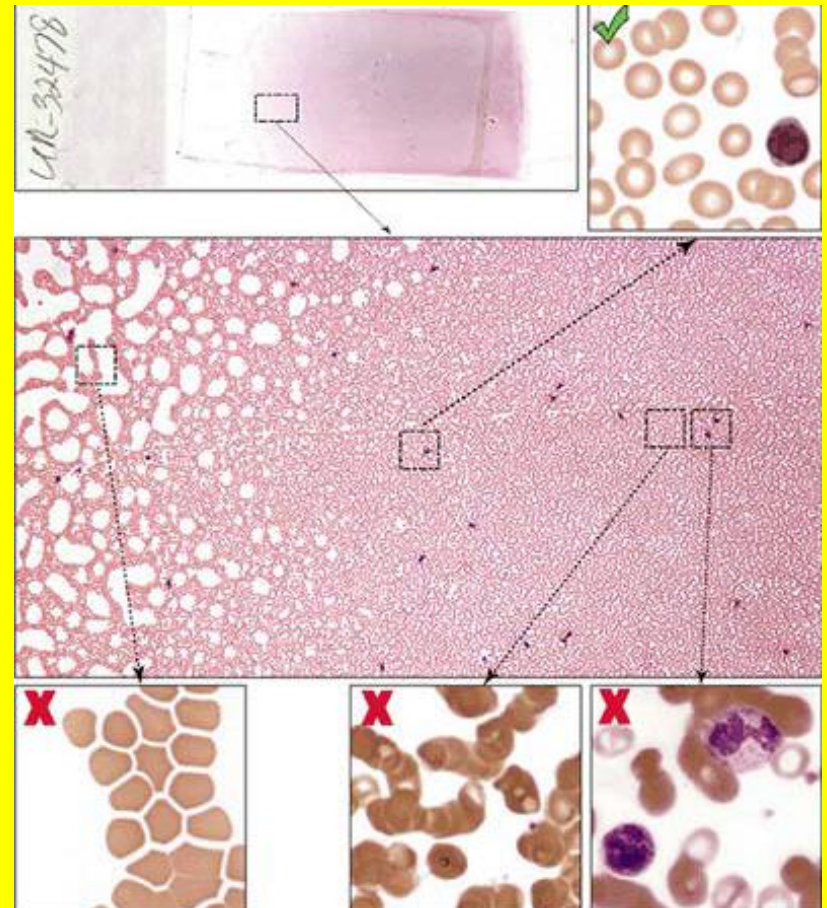
- Kapilární / venózní krev do EDTA-zkumavky **NE** více jak 3 h stará
 - sklíčka umytá v roztoku ethanol : ether = 1:1 (odmaštěná)
 - nátěr musí zaschnout, vhodná fixace methanolem
 - barvení : **Papenheimova** metoda panoptického barvení



Provedení krevního stěru

Správně nabarvený
nátěr

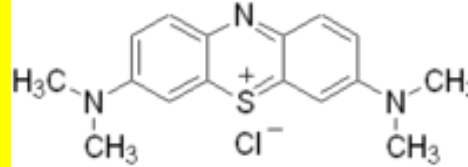
růžový



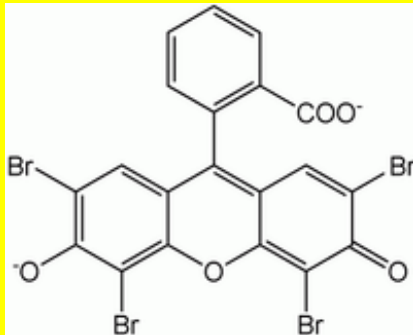
Krevní nátěr (blood smear) II.

Pappenheimovo panoptické barvení:

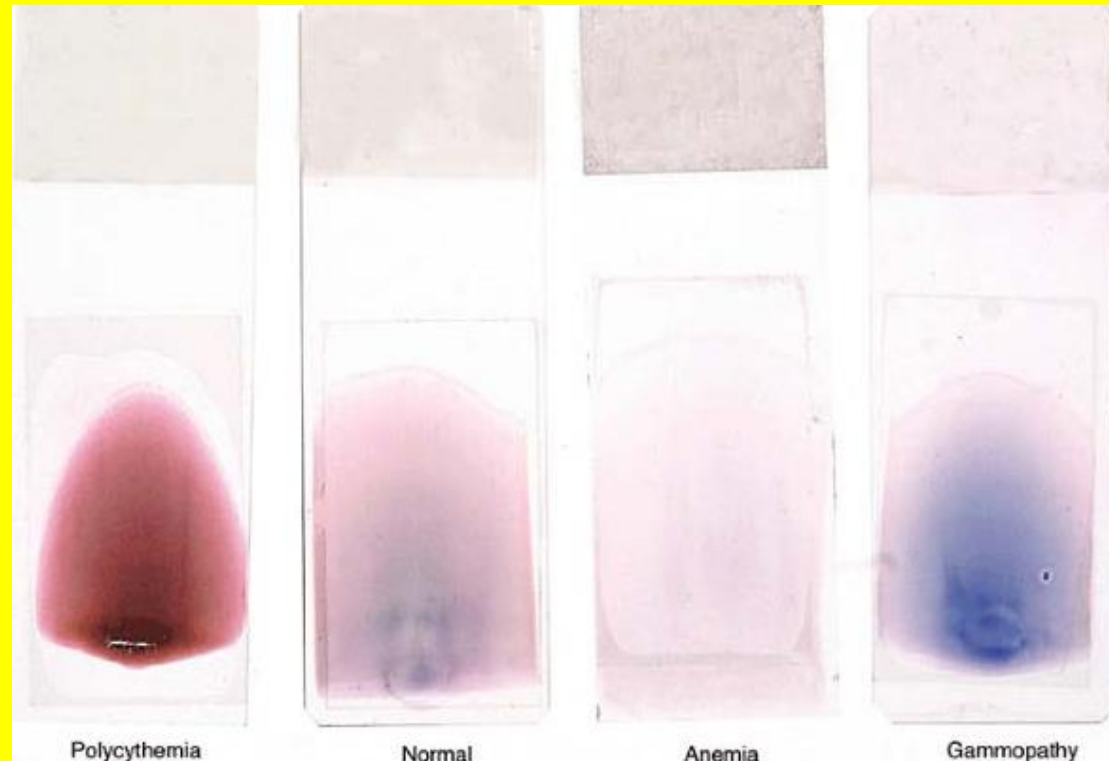
- barvicí roztok **May-Grünwald** (Eosin-Methylene Blue)
- fosfátový pufr, pH 7.3
- zředěný **Giemsa** (Azur-eosin)
- fosfátový pufr pH 6.8-7.4



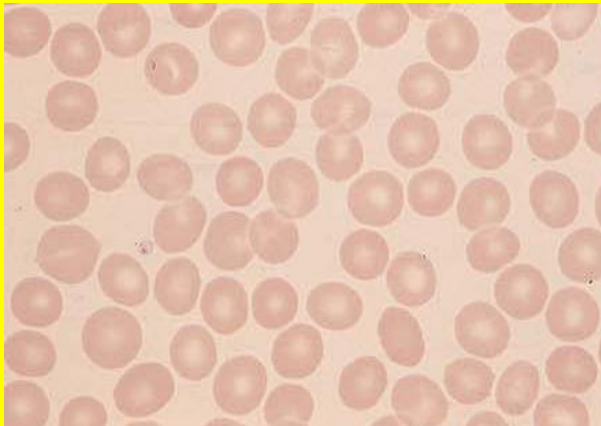
MB – zásaditý, modrá až fialová barva, afinita ke kyselým komponentám buňky (DNA/RNA, granuly basofilů s heparinem)



Eosin – kyselý, červené až oranžové zbarvení
afinita k alkalickým složkám buňky
(proteinům, Hb, granuly eosinofilů se sperminem)

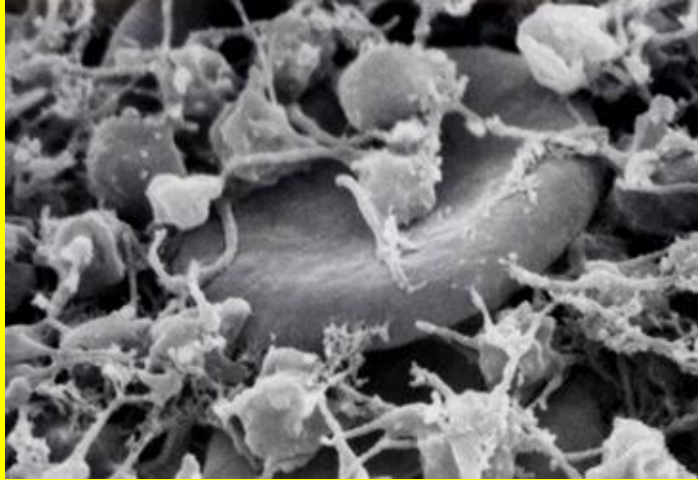


Červené krvinky/ Erythrocyty

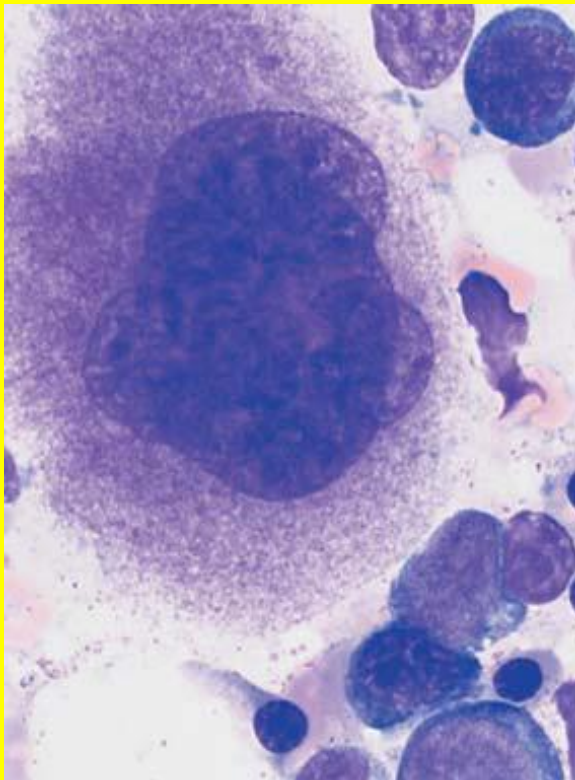


- transport dýchacích plynů – žíly, cévy
- bez organel, povrchové antigeny - krevní skupiny
- krevní barvivo hemoglobin (Hb)
- bikonkávní tvar – převaha povrchu nad objemem
- muži $4,3-5,3 \times 10^{12} / L$ ($4,3-5,3 \times 10^6 / \mu l$)
- ženy $3,8-4,8 \times 10^{12} / L$ ($3,8-4,8 \times 10^6 / \mu l$)
- normocyty, mikrocyty, makrocyty
- tvorba stimulována – **erythropoetinem** (EPO) (molekulární úroveň)
- poklesem tlaku (úroveň faktorů vnějšího prostředí)
- zdroj energie - anaerobní glykolýza
- **hemolýza** = rozpad Erytrocytů a vylití Hb do plazmy

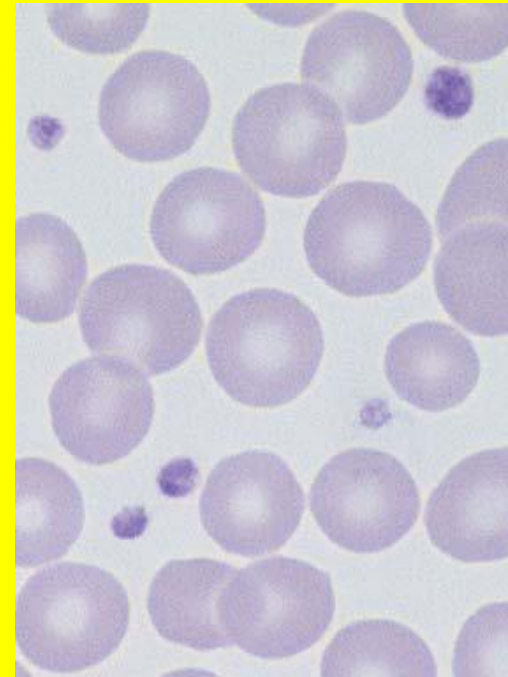
Krevní destičky (trombocyty)



- ochrana před ztrátou krve
- bezjaderné
- hladké nepravidelné disky
- **150-300 x 10⁹ / L krve (150-300 x 10³ /μl)**
- tvorba stimulována – **trombopoetinem (TPO)** (glykoproteinový hormon)
- **hemostáza** = zástava krvácení
- zdroj energie - glukosa

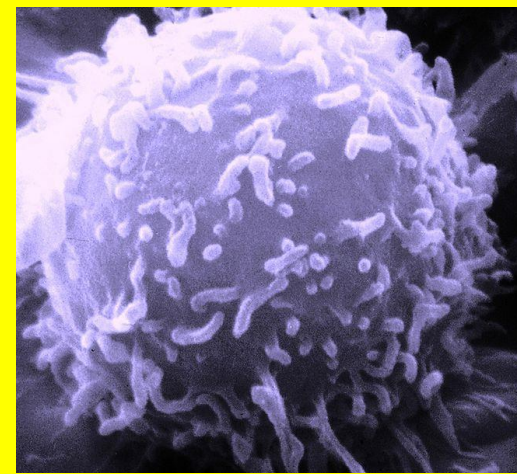


Megakaryocyt ve smíru kostní dřeně. Zakalená granulace je znak nastávající tvorby destiček



Normální hustota trombocytů mezi Ery

Bílé krvinky / Leukocyty



- obrana organismu = imunita

- $4-9 \times 10^9$ / L krve ($4-9 \times 10^3$ / μl)

- neutrofilní granulocyty – fagocytóza

- eosinofilní granulocyty – fagocytace alergen+protilátka

- basofilní granulocyty – uvolnění histaminu při alergických reakcích

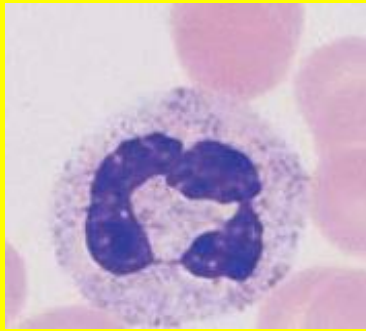
- monocyty – přeměna na makrofágy = fagocytóza, APC

- lymfocyty – B- a T-, rozpoznání antigenu a aktivace

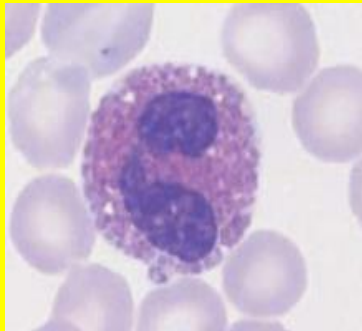
- lymfoidní orgány – slezina, kostní dřeň, mízní uzliny

- imunita - nespecifická = vrozená – profesionální fagocyty

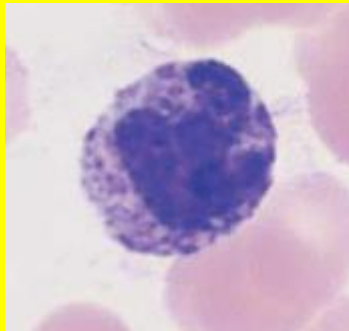
- specifická = získaná – (APC) a maturace lymfocytů



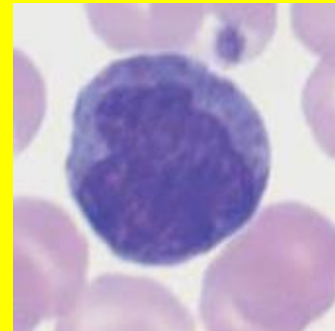
Neutrofil



Eosinofil



Basofil



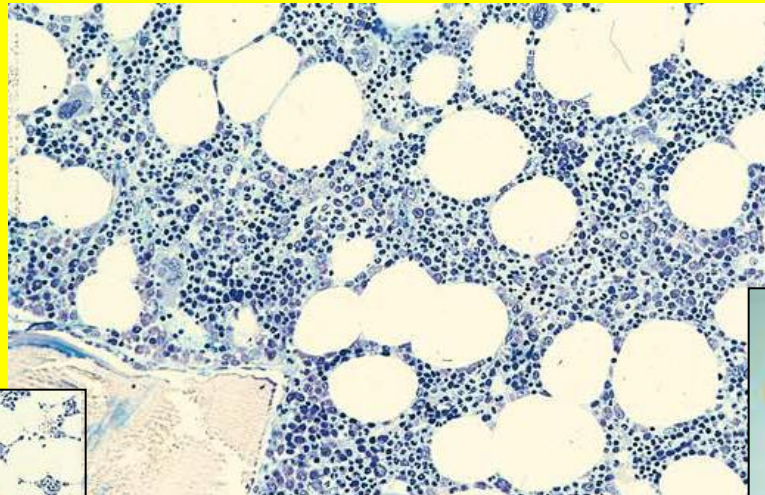
Monocyt



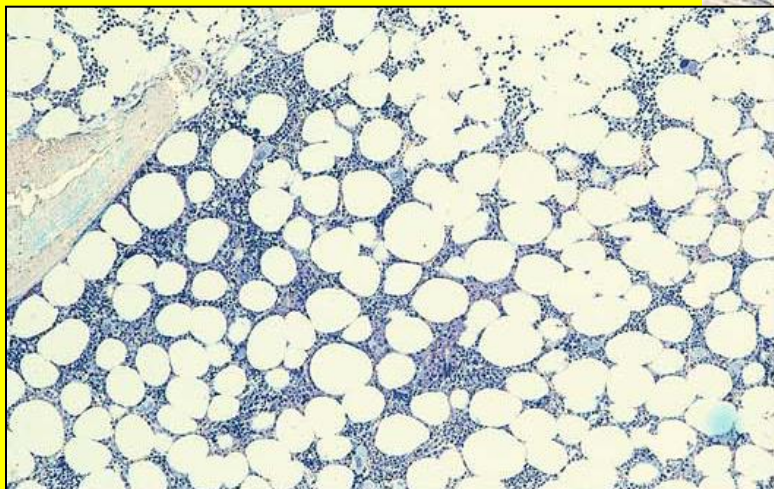
Lymfocyt

Kostní dřeň I.

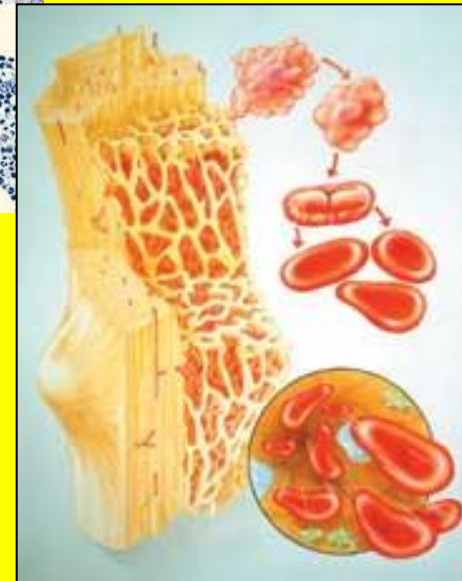
- Gelovitá tkáň - dutina kosti – místo efektivní hematopoese
- Produkce asi 6 miliard buněk na kg hmotnosti denně
- Hematopoetická (**červená**) dřeň (**Red marrow**) a **Žlutá dřeň (Yellow marrow)**
- Hematopoese v dospělosti - **lebka, obratle, rameno, pánevní kosti, hrudní kost**
- Hematopoese – kontrola skrz stimulační/inhibiční cytokiny, cell-cell kontakty
- Stroma = vše co se přímo neúčastní hematopoese
 - fibroblasty
 - makrofágy
 - adipocyty
 - osteoblasty
 - osteoklasty
 - endoteliální buňky



Red marrow



Yellow marrow

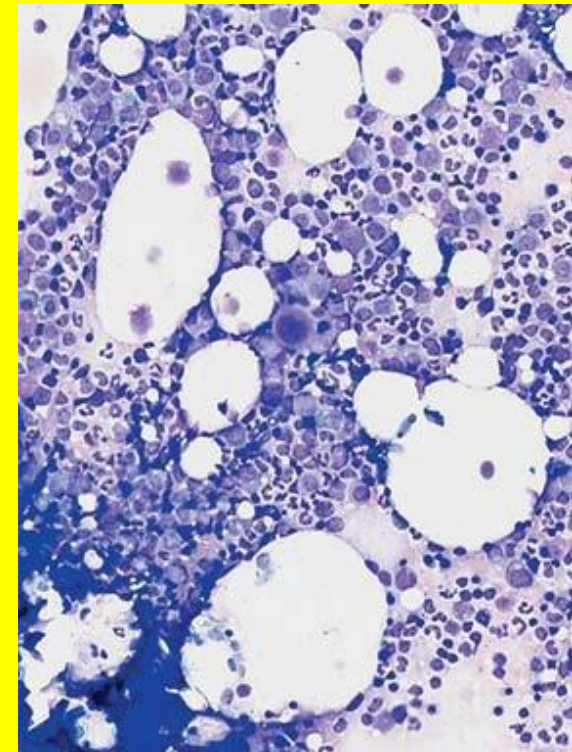


Kostní dřeň II.

- **Extracelulární matrix** – kolagen, fibronektin, hyaluronát, proteoglykany
- **Přestup krvinek do krve** – přes vrstvu endoteliálních buněk do sinusoid (malé krevní cévky s diskontinuálním endotelem)
 - Erytrocyty – po vypuzení jádra přes endotelie do cév
 - Leukocyty – diapedézou
 - Trombocyty – megakaryocyty prorůstají do endotelií
- **Punkce KD** - proč?

Základ pro diagnosu hematologických nemocí – nutno mít představu jak to pomůže, např. anemie z nedostatku železa, thalasemie, získané či zděděné anemie → vyšetření KD není nutné

- zavedena Arinkinem (1929)
- získá se aspirát = dřeňová tekutina
+ částčky KD



Normální cytologie kostní dřeně

- z aspirátu se dělá nátěr (odběr ze zadní strany kyčelní kosti)

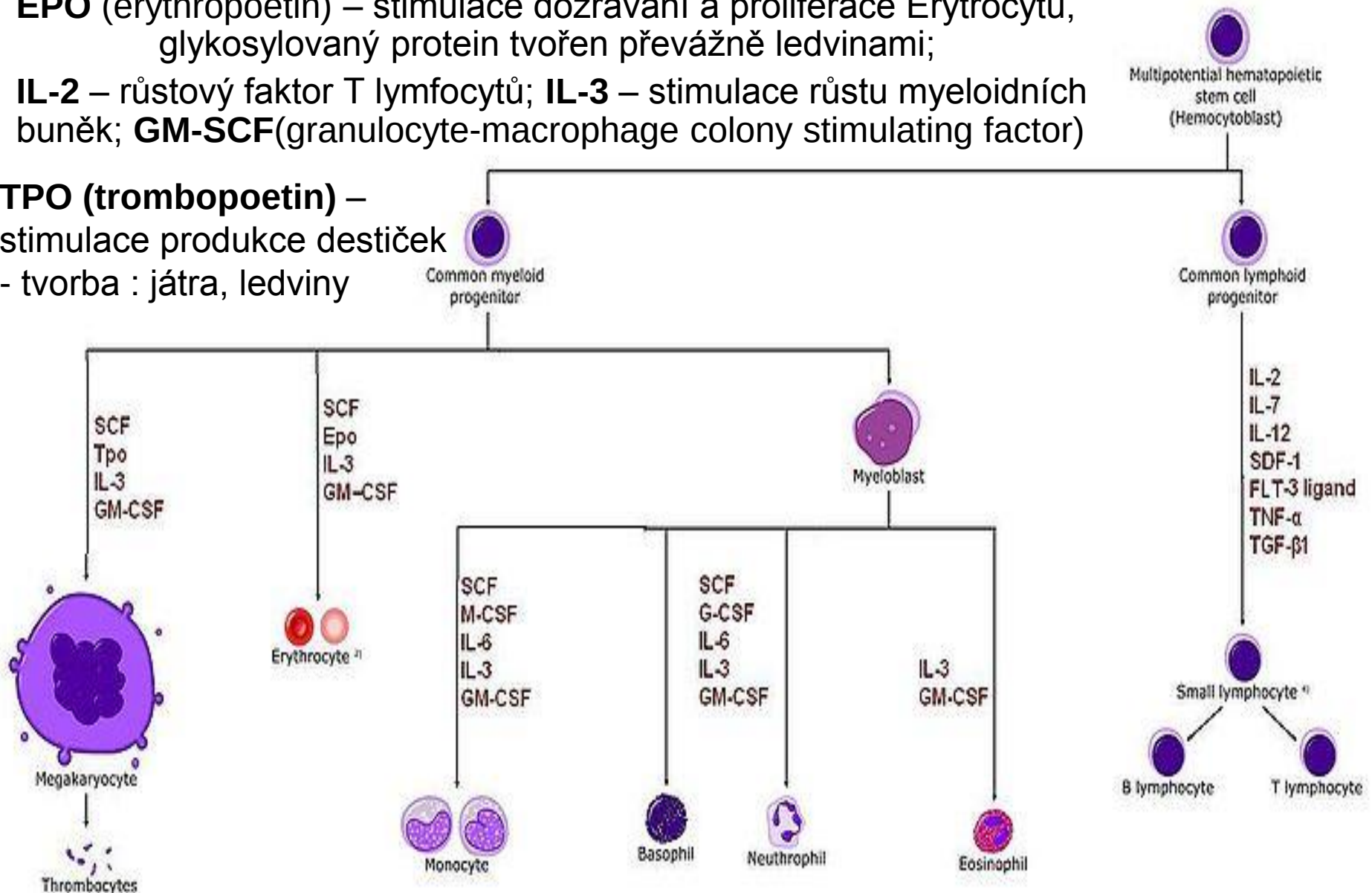
Hemopoetiny

Látky řídící tvorbu krvinek

EPO (erythropoetin) – stimulace dozrávání a proliferace Erytrocytů, glykosylovaný protein tvořen převážně ledvinami;

IL-2 – růstový faktor T lymfocytů; **IL-3** – stimulace růstu myeloidních buněk; **GM-SCF** (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)

TPO (trombopoetin) – stimulace produkce destiček
- tvorba : játra, ledviny



Parametry v hematologii I.

Proč provádět odběr krve?



- Produkuje dřeň dostatečné množství vyzrálých buněk?
- Je vývoj každé linie kvalitativně normální?

**Odběr prováděn do EDTA
naplněné zkumavky z
venozní krve**

- v minulosti - ručně v
počítacích komůrkách
- současnost -
automatizované počítače
(AP) buněk



Parametry v hematologii II.

AP určí:

- Hemoglobin – oxidace CN^- na kyanmethemoglobin
→ spektrofotometricky 540 nm
- střední buněčný objem (MCV – mean corpuscular volume) (fl),
- počet Erytrocytů

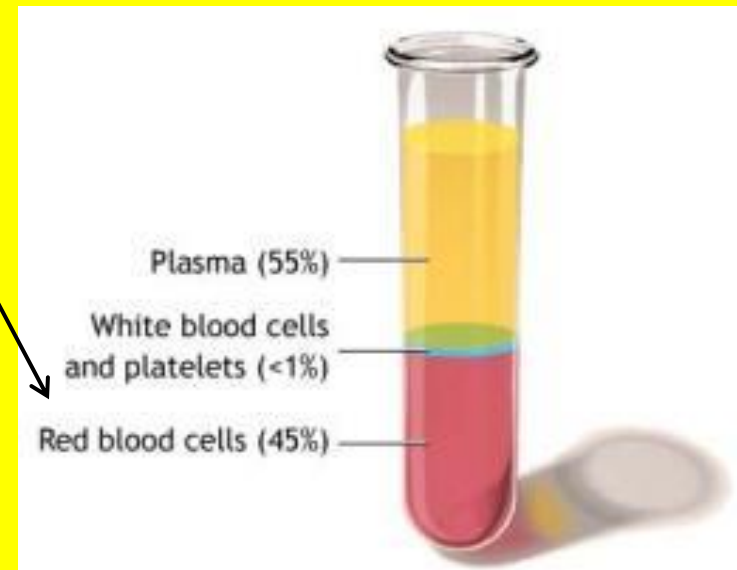
výpočet hematokrit (HCT) = $\text{MCV} \times \text{počet Ery} (10^6/\mu\text{l})$

Kvalita Erytrocytů je určena:

MCV, **MCH** (mean cell Hb content),
MCHC (mean cellular Hb concentration)

$\text{MCH (pg)} = \text{Hb (g/l)} / \text{počet Erytrocytů } (10^6/\mu\text{l})$

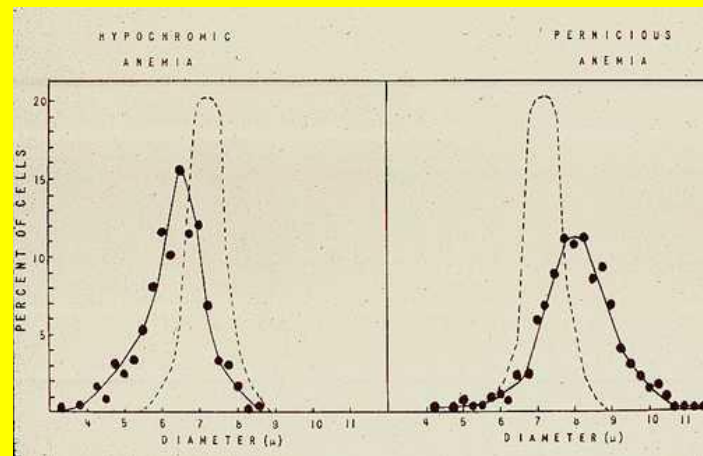
$\text{MCHC (g/dl)} = \text{Hb (g/dl)} / \text{HCT}$



Parametry v hematologii III.

- **Distribuce objemů Erytrocytů**
(RDW, Red cell distribution width)

- **Počet retikulocytů**



Počet Leukocytů - **Türkův roztok (krystalová violet' + ledová kyselina octová)**

- v AP jsou lyzovány Ery a buňky s objemem > 30fl = leukocyty

Počet Thrombocytů - **2% Novocain-Cl** ke krvi nebo
- v AP buňky v rozmezí 2-20fl = trombocyty

#	Ery 10 ⁶ / μl	Thrombo / 10 ³ / μl	Leuko / / μl	Hb (g/dl)	HCT	MCH (pg)	MCV (fl)	MCHC (g/dl)	Erytrocyty – průměr /μm
Muži	5,4	180	7000	15	0,45	29	87	33	7,5
Ženy	4,8	180	7000	13	0,42	29	87	33	7,5

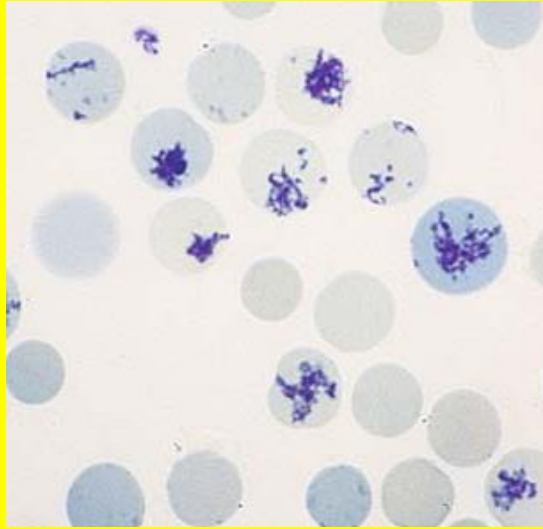


Algoritmus procedur v hematologii

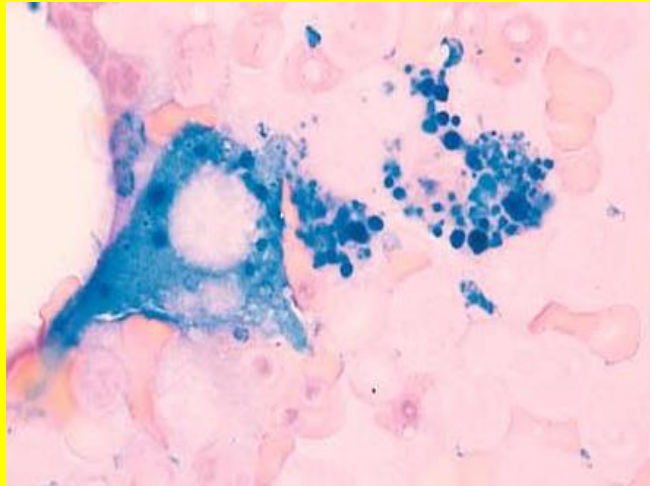
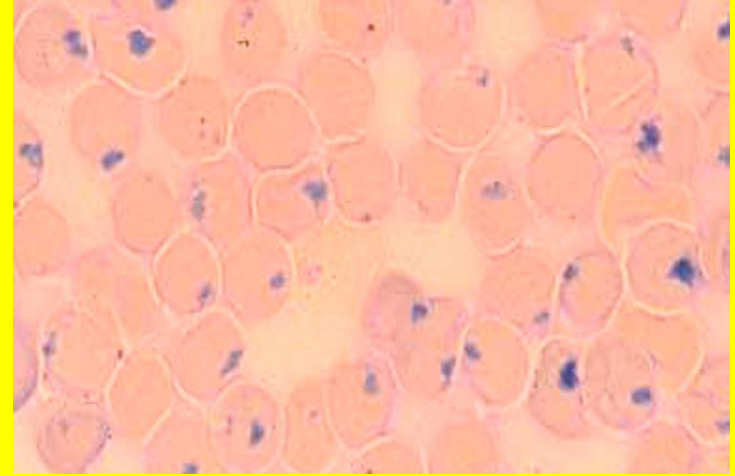
- 1) Kvantitativní určení počtu leukocytů, erytrocytů a destiček (CBC)**
- 2) Diferenciální počet (DBC) – změny v počtu Erytrocytů, Leukocytů, Thrombocytů (zvětšené mízní uzliny, splenomegalie) – změny v zastoupení leukocytů**
- 3) Morfologie erytrocytů**
- 4) Po zvážení stavu pacienta a dosud získaných výsledků – analýza složení kostní dřeně (potvrzení diagnózy za pomoci elektroforezy, ALP, esterasa, test na železo) = v případech kdy analýza krve zanechává pochyby v určení diagnózy (leukocytopenia, thrombocytopenia, monoklonální hypergamaglobulinemie)**

Chemické/Enzymatické Markery krvinek

**Heilmeyerovo
barvení
retikulocytů**
(brilliant cresyl blue)

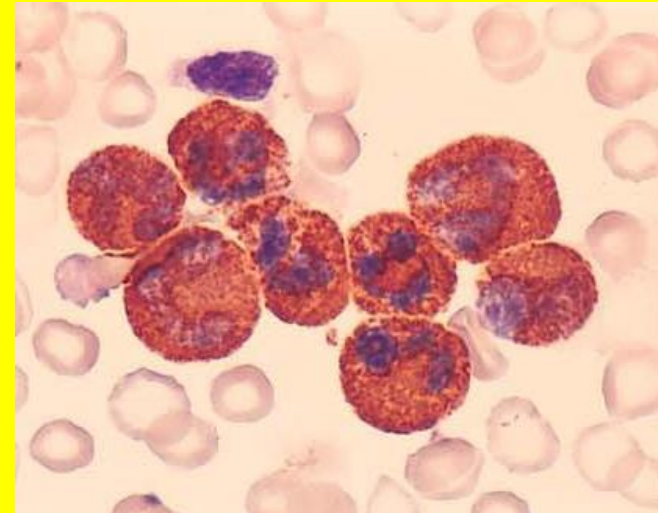


- Heinzova tělíska (Nile blue sulfate) – shluky Hb v Ery

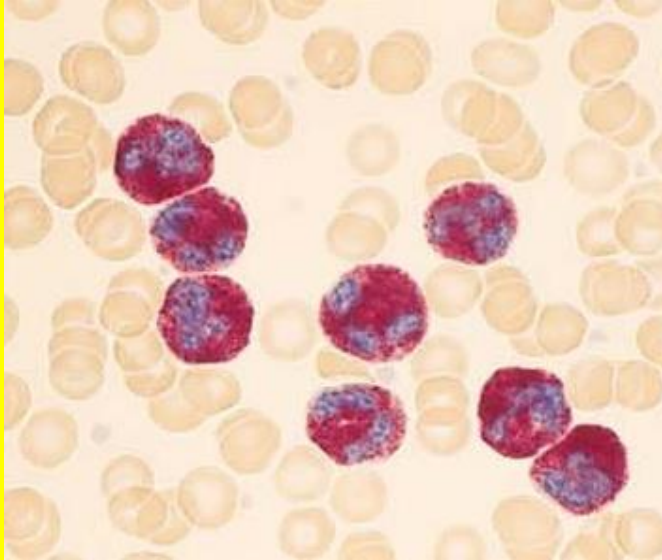


**Barvení Fe³⁺ Berlínskou
modří – železo v
cytoplasmě makrofága**

Peroxidasová reakce
(benzidine/
diaminobenzidine
+H₂O₂)
**- neutrofily,
eosinofily**

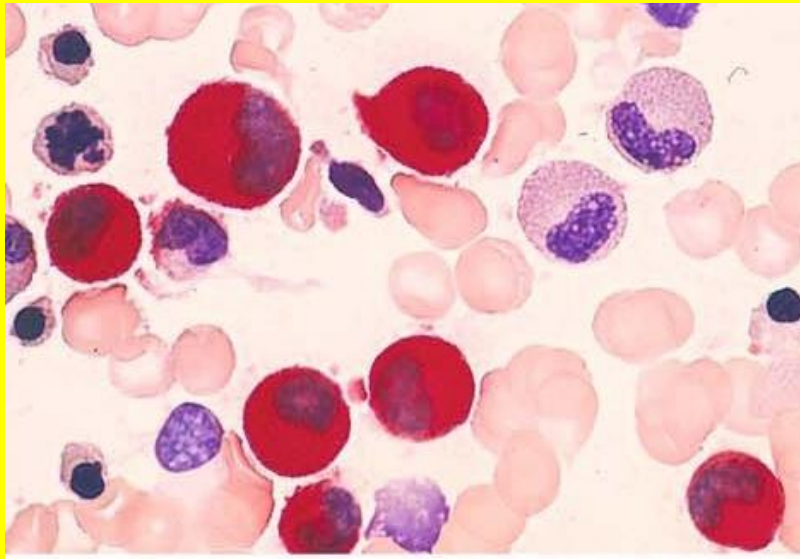


Chemické/Enzymatické Markery krvinek II.

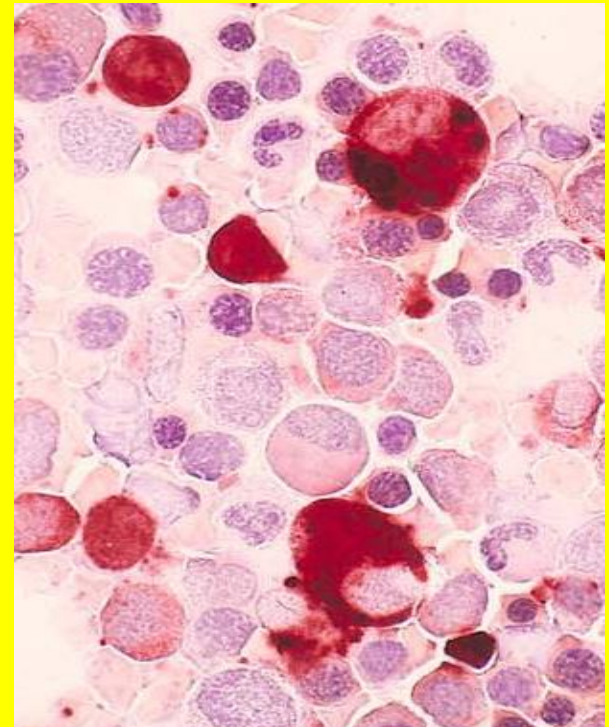


- **Leukocytová ALP** (naphtyl fosfát+ veronal sodný + variamine blue salt B) – **neutrofily** (znak vyžrálých buněk)

- **Neutrální esterasa v makrofázích** (naftyl acetát)



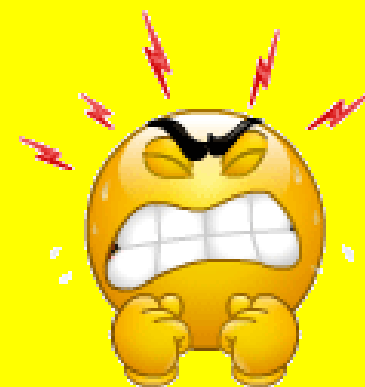
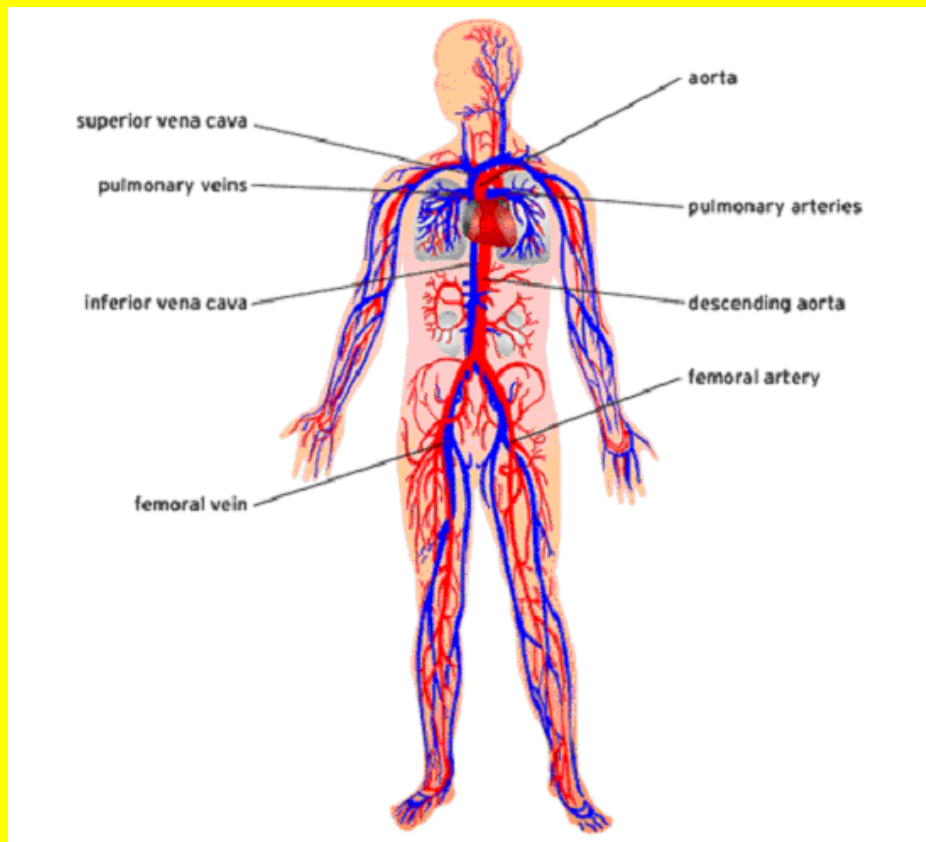
- **Naftol AS-D chloracetát esterasa (CE)** – neutrofily (+), eosinofily (-)



A slovo závěrem...



Zdraví



Nemoc

**Porozumět Hematologii = správně
diagnostikovat**