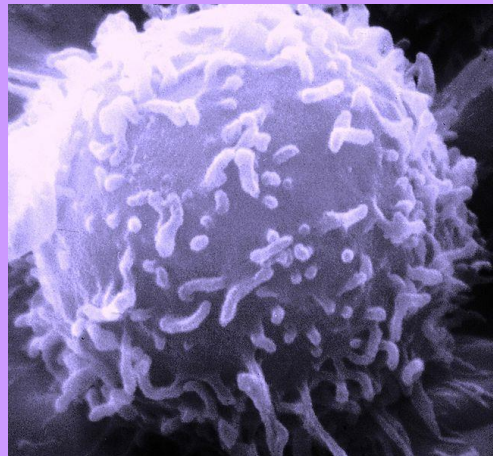
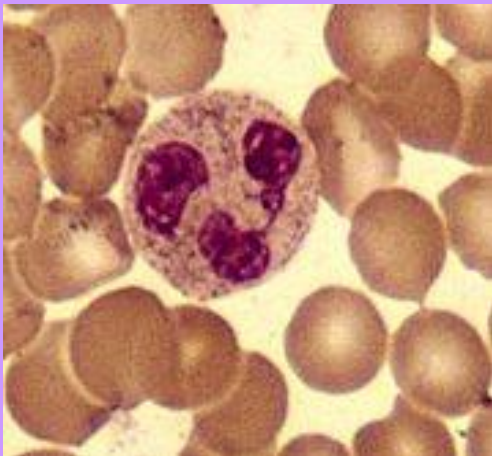


Základy Hematologie/ZHEM

Fyziologie leukocytů

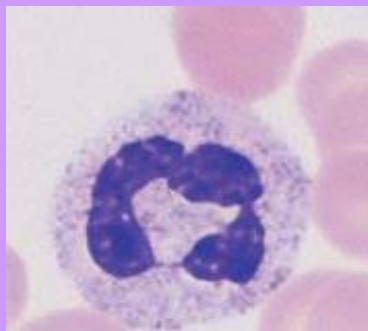


Radim Vrzal

Fyziologie leukocytů

Leukocyty = bílé krvinky – součást imunitního systému

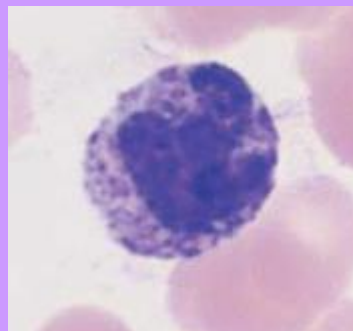
druh	Počet/1l krve (.10 ⁹)	Rozměr (μm)	barvení	Charakteristické znaky
Neutrofilní granulocyty	3-6	10-12	Drobná růžová granula	Segmentované jádro (2-5 segmentů)
Eosinofilní granulocyty	0,05-0,25	13-14	Červená hrubá granula	Dvojlaločnaté jádro
Basofilní granulocyty	0,0-0,1	9-10	Tmavofialová kulatá granula	Esovité jádro
Lymfocyty	1,5-3,0	6-8	Modrá plasma, tmavé jádro	Velké okrouhlé jádro, úzký lem cytoplasmy
Monocyty	0,3-0,5	15-25	Modrá plasma i jádro	Ledvinovité velké jádro, mnoho cytoplasmy



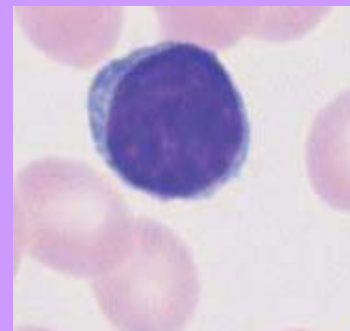
Neutrofil



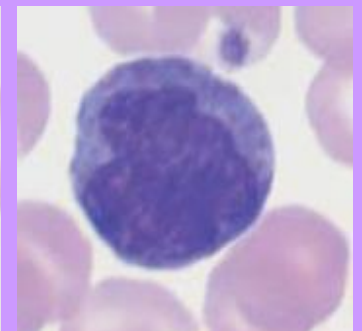
Eosinofil



Basofil



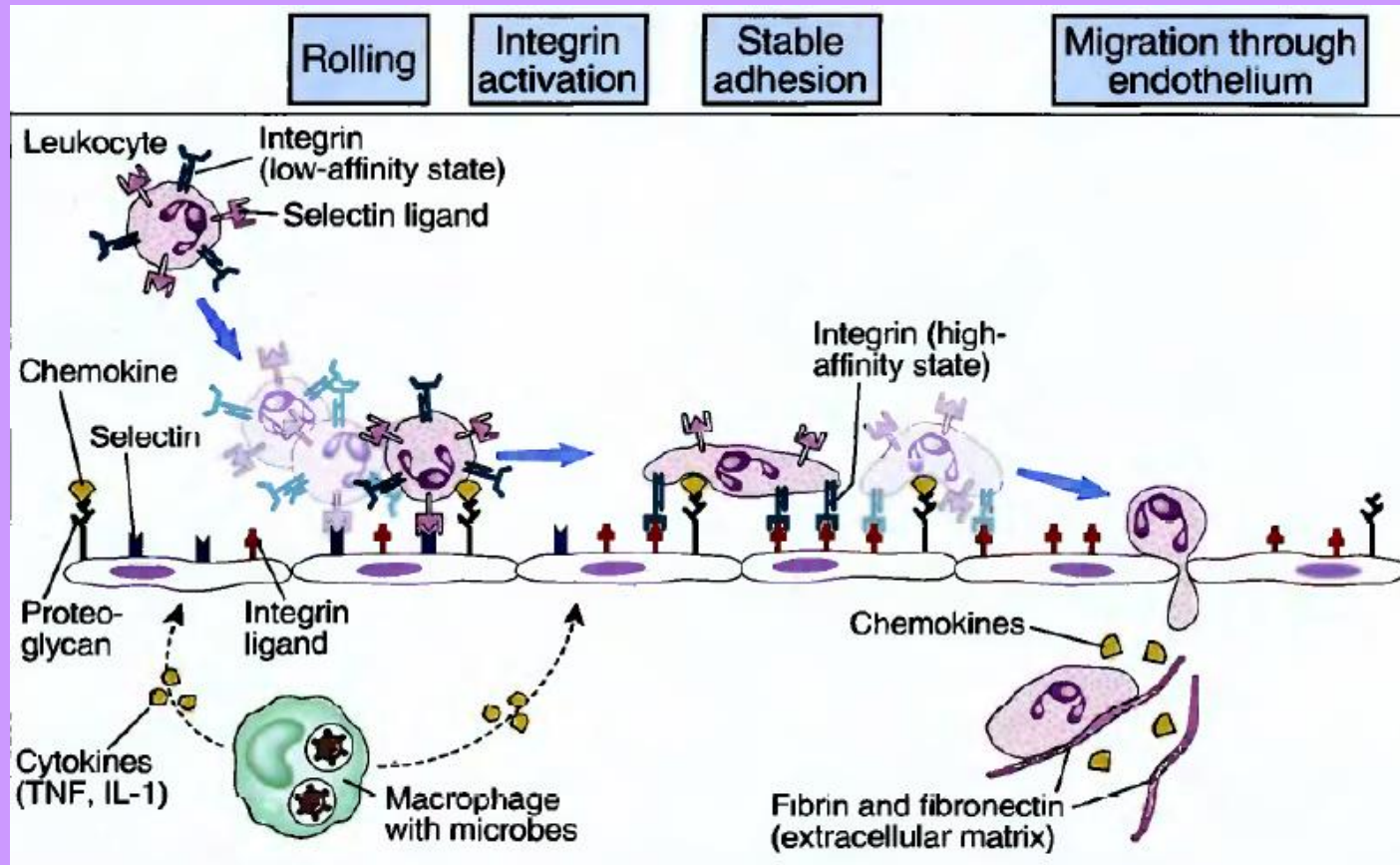
Lymfocyt



Monocyt

Pohyblivost a věci s tím spojené

- Adhezivita = schopnost přilnout k povrchům (selektiny – adhezní molekuly, integriny - receptory)
- Diapedéza = **leukocytová extravazace** – na základě chemických signálů (chemokiny)

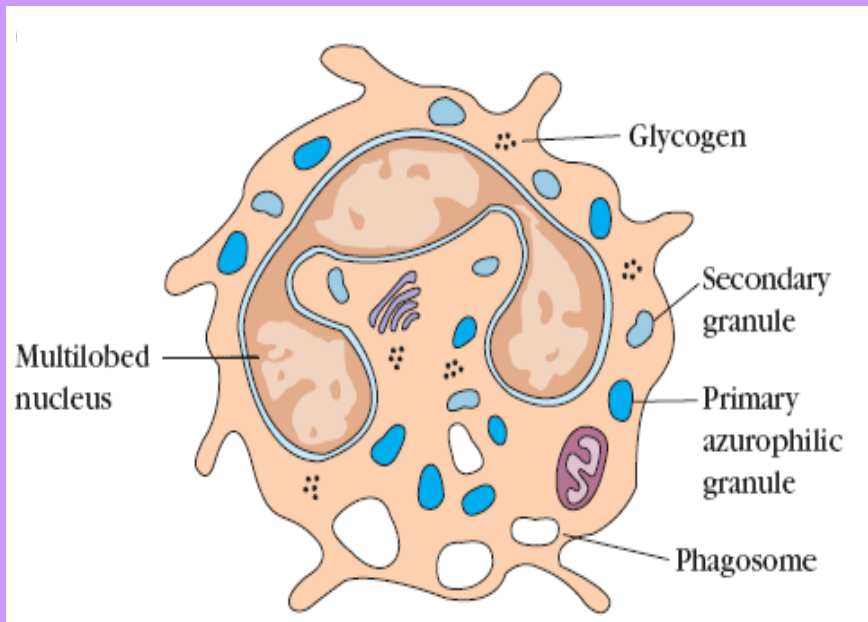
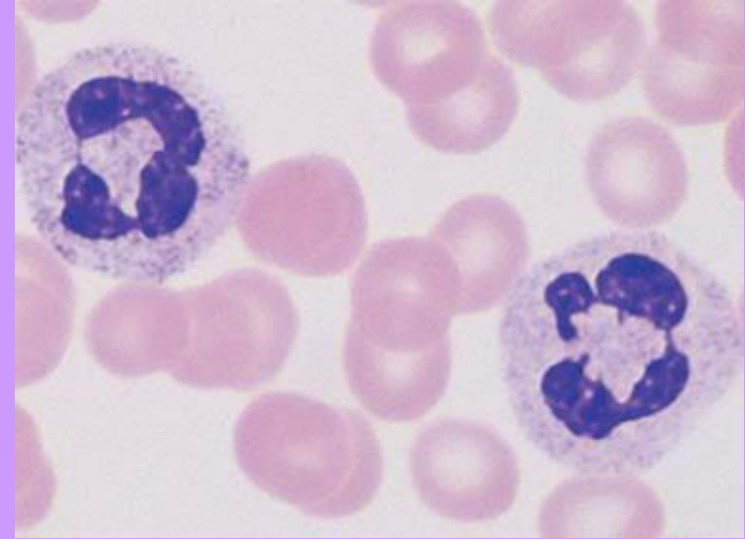


Monocyty, lymfocyty
- spontánně

Neutrofily, eosinofily
- stimulace

Neutrofilní granulocyty

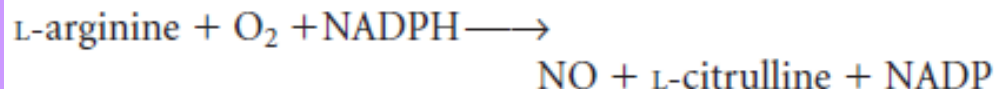
- Barví se kyselými a zásaditými barvivy
- Segmentované jádro → polymorfonukleární leukocyty (PMN)
- Fagocytosa, extravazace
- 50-70% cirkulujících bílých krvinek



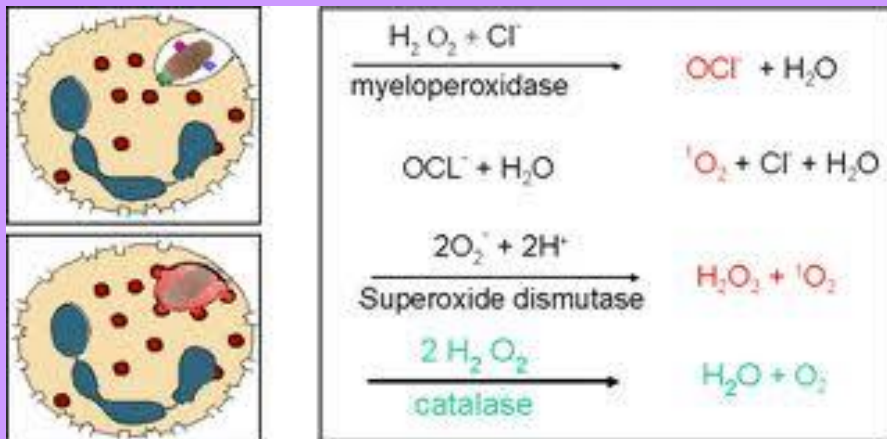
- Vznik : kostní dřeň
- 7-8h v krvi, pak 4-5 dní v tkáních
- „1st line of defense“ → transientně zvýšený počet = **leukocytosa** – znak zánětu

Neutrofilní granulocyty II.

- Primární a sekundární granula – lytické enzymy
- V průběhu fagocytózy - **Oxidační vzplanutí** (respiratory burst) – ROS a RNS - (myeloperoxidasa – produkce chlornanu z Cl^- a peroxidu vodíku, NOS (synthetasa oxidu dusnatého) – produkce NO z L-Arg)



- Produkce více ROS a RNS než makrofágy



Oxygen-dependent killing

Reactive oxygen intermediates

$\text{O}_2^{\bullet -}$ (superoxide anion)

OH^\bullet (hydroxyl radicals)

H_2O_2 (hydrogen peroxide)

ClO^- (hypochlorite anion)

Reactive nitrogen intermediates

NO (nitric oxide)

NO_2 (nitrogen dioxide)

HNO_2 (nitrous acid)

Others

NH_2Cl (monochloramine)

Oxygen-independent killing

Defensins

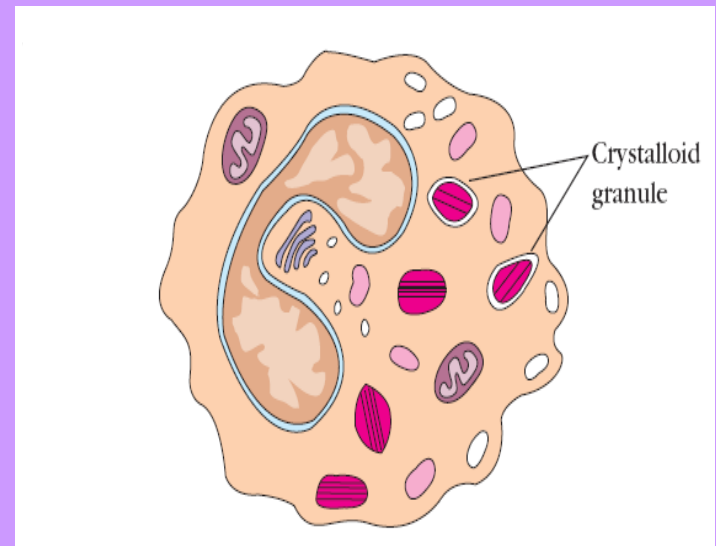
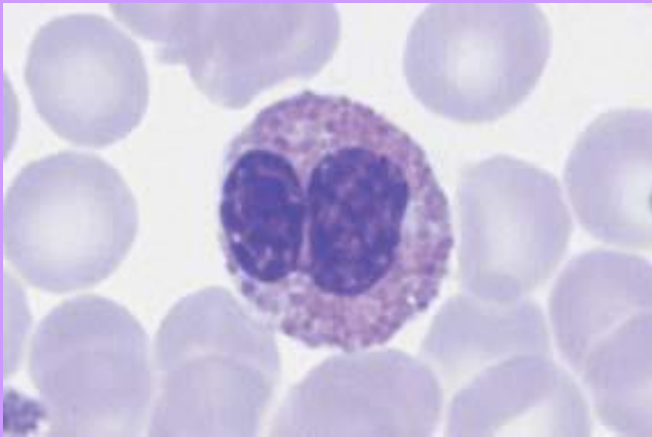
Tumor necrosis factor α
(macrophage only)

Lysozyme

Hydrolytic enzymes

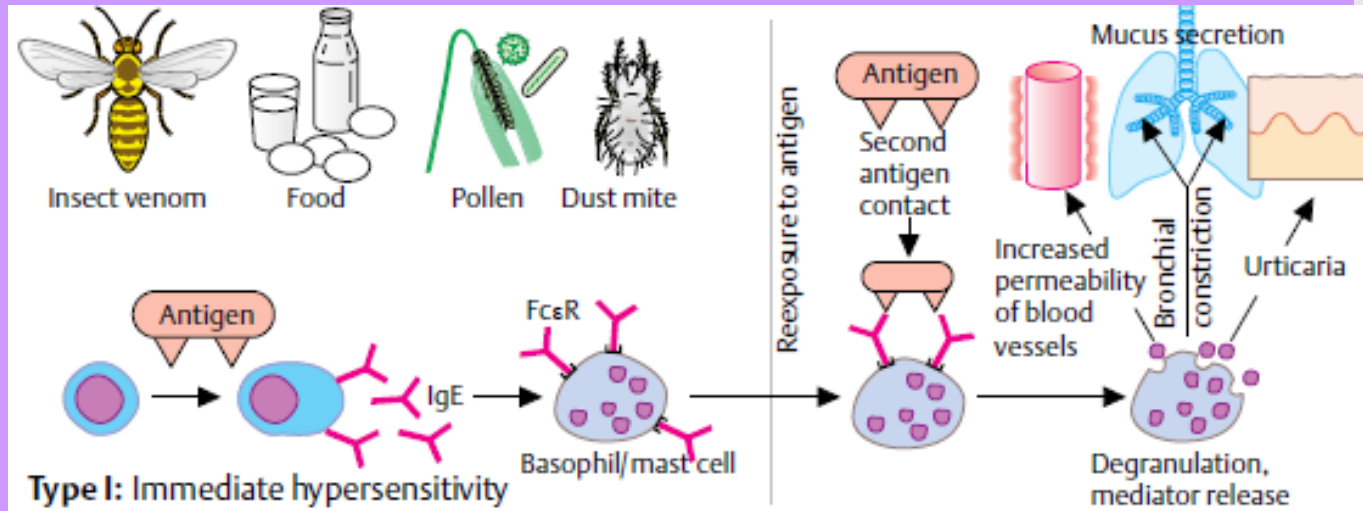
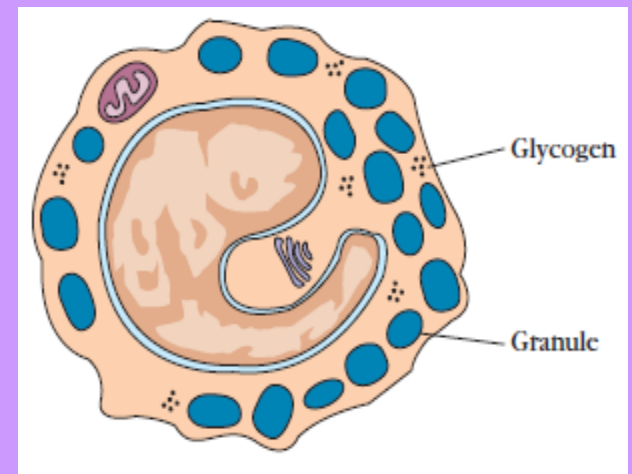
Eosinofilní granulocyty

- Jádru segmentované na 2 části
- Plasma naplněna eosinofilními zrny
- Slabá Fagocytosa, extravazace
- Uplatnění při parazitárních a alergických reakcích
- Fagocytace komplexů alergen-protilátka



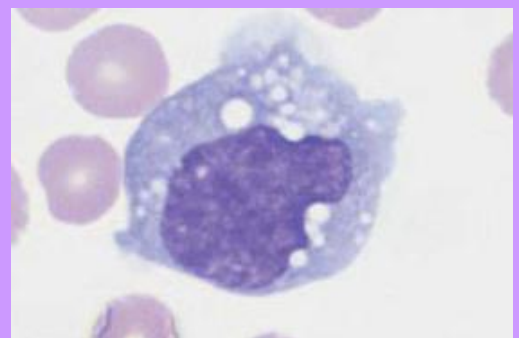
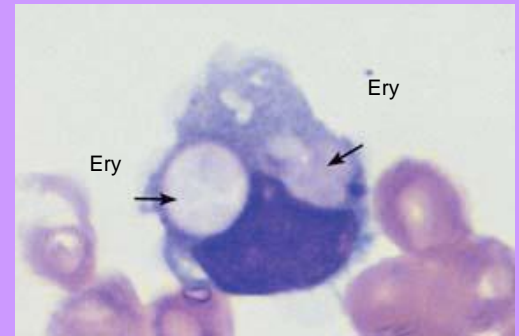
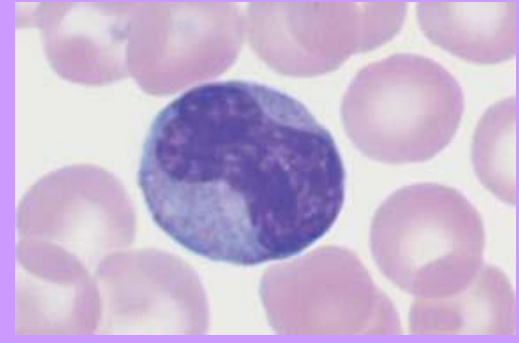
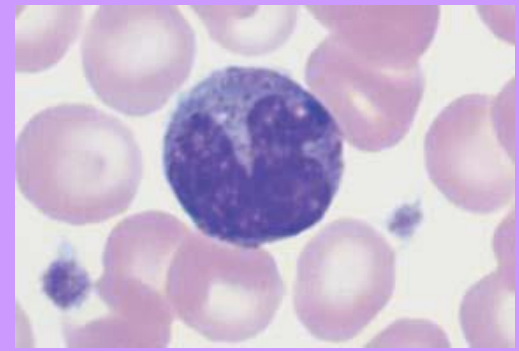
Basofilní granulocyty

- Málo pohyblivé, nefagocytují
- Granula s obsahem heparinu, histaminu, směs leukotrienů → **vasodilatace, zvýšená permeabilita cév**
- V membráně receptory pro IgE
- Uplatnění při alergických reakcích



Monocyty – Makrofágy I.

- Největší morfologická variabilita mezi leukocyty
- Vejčité jádro, nepravidelné kontury, invaginace, pseudopodiím podobné cytoplasmické procesy
- Nárůst populace nad $850/\mu\text{L}$ indikuje imunitní obrannou reakci
- Součástí mononukleárního fagocytárního systému (MFS, dříve RES) – monocyty - krev, makrofágy – tkáň
- Nemají zvláštní prekurzor s diagnostickou hodnotou



Monocyty – Makrofágy II.

-Tvorba – kostní dřeň - vstup do krve (cirkulace cca ~8h) - následně migrace do tkání → zvětšení (5-10x) a nárůst počtu a komplexity organel (lysozymů, mitochondrií)

- Některé vázané v tkáních:

alveolární makrofágy - plíce

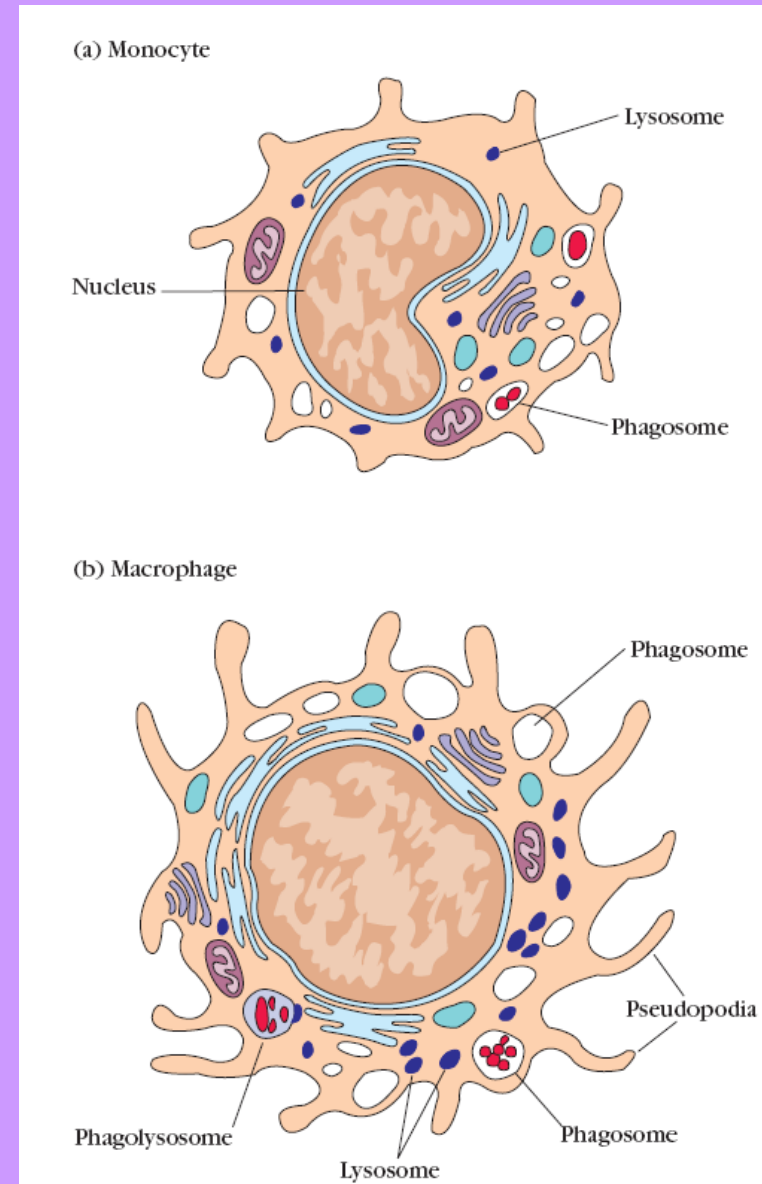
histiocyty – pojivové tkáně

kupferovy buňky – játra

mikroglie – mozek

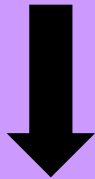
osteoklasty – kosti

- Volné – ameboidní pohyb v tkáních

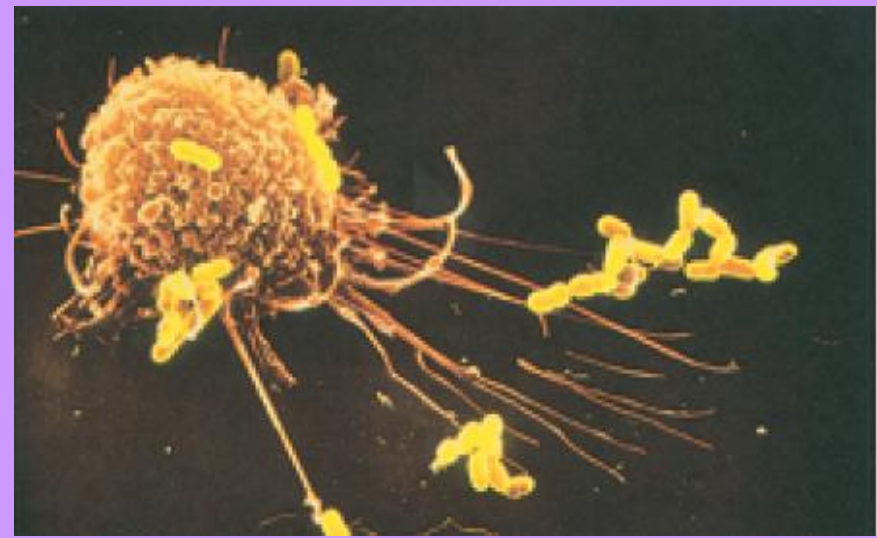


Monocyty – Makrofágy III.

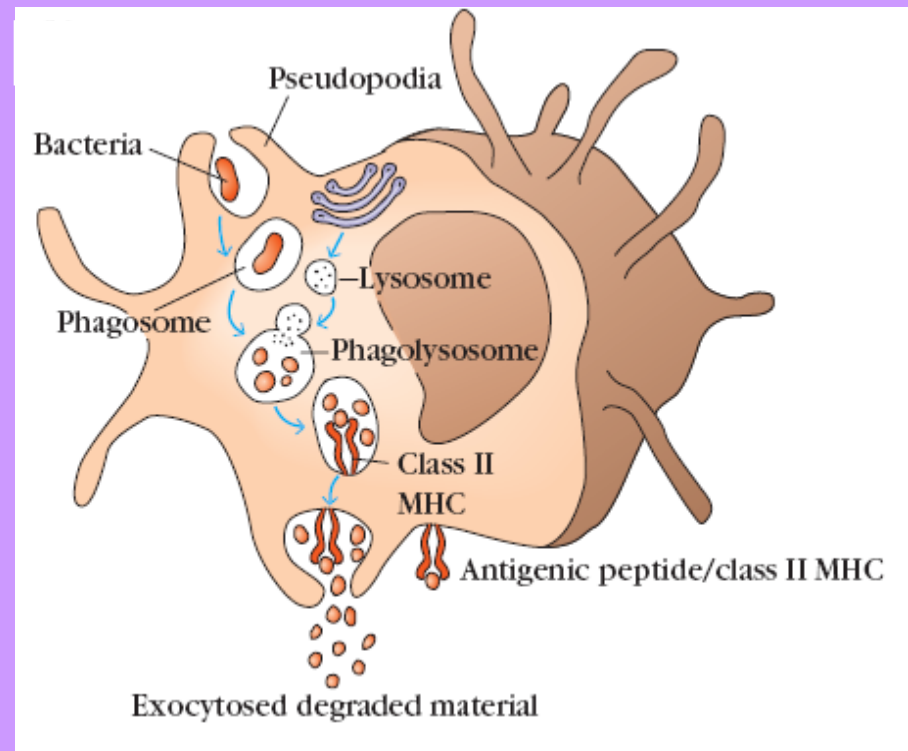
Fagocytosa – strávení exogenních antigenů, nerozpustných částic, mrtvých buněk



- 1) Chemotaxe (dle gradientu látek tvořených poškozením tkáně, imunitní reakcí)
- 2) Přilnutí antigenu na makrofága
- 3) Obalení pseudopodii = tvorba fagosomu
- 4) Fúze s lysosomem = fagolysosom – digesce pohlceného antigenu
- 5) Exocytosa



Proces přilnutí bakterie a obalení pseudopodii



Monocyty – Makrofágy IV.

Aktivované makrofágy

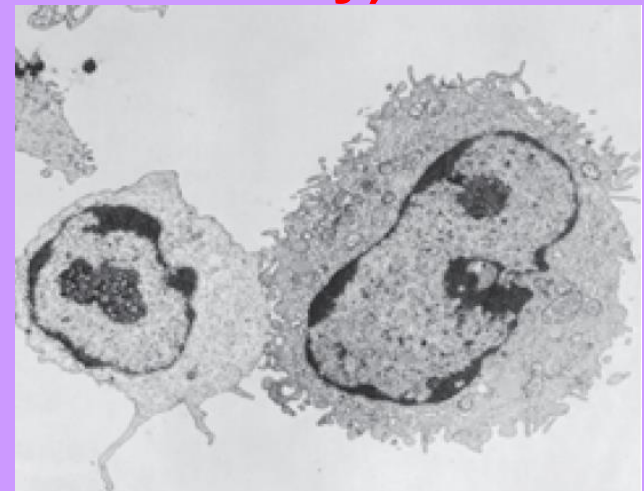
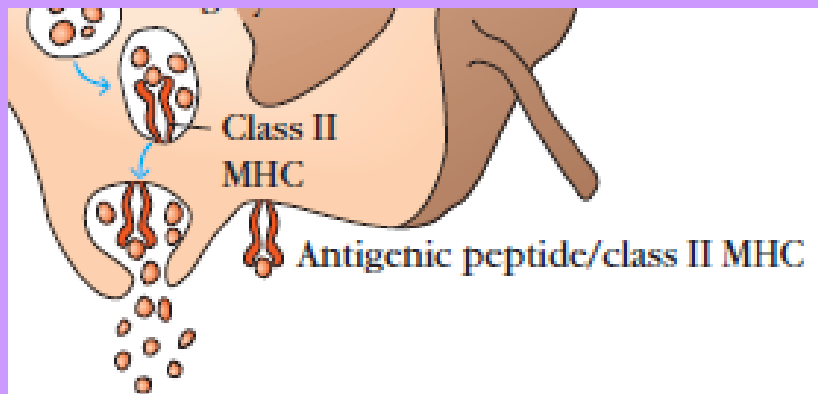
-fagocytosa

O_2 -závislé (oxidativní vzplanutí) mechanismy – ROS,
RNS

O_2 - nezávislé mechanismy – defensiny, lysozym

- aktivované T_H lymfocyty → sekrece cytokinů (IFN- γ) → další
zvýšení aktivity

- **Antigen-Presenting Cells (obsahují MHC II. třídy) - APC**



T-lymfocyt s APC (makrofágem)

Lymfocyty I.

- Přítomné v krvi, lymfě, lymfatických orgánech
- Dělí se do 3 subpopulací na základě funkce a membránových složek:

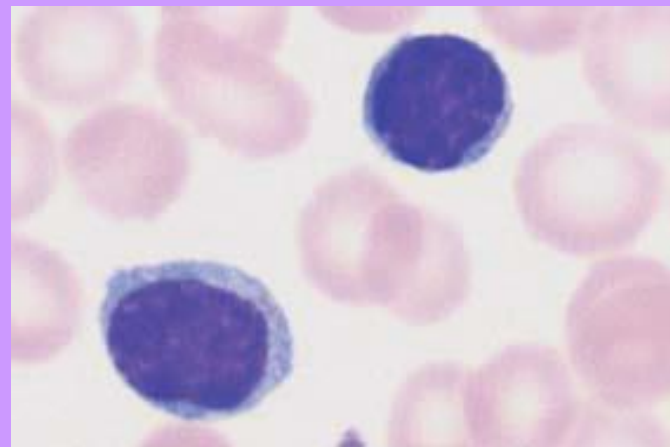
T-lymfocyty – dozrávání thymus

B-lymfocyty – dozrávání břeň (bone marrow; Fabriciova burza) - konečné stadium = plasmocyt

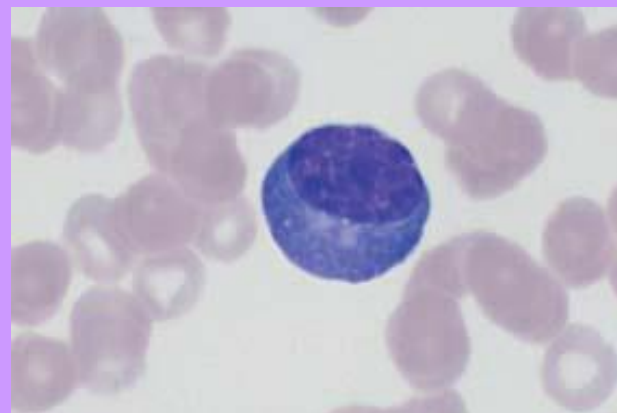
- malé, nefagocytující, naivní, G_0 buněčného cyklu, „malé“ lymfocyty – 6 μm v průměru

Nerozlišitelné na základě morfologie !!!

NK-buňky – velké, granulární, bez exprese škály povrchových markerů jako u B- a T-



Lymfocyty v krvi



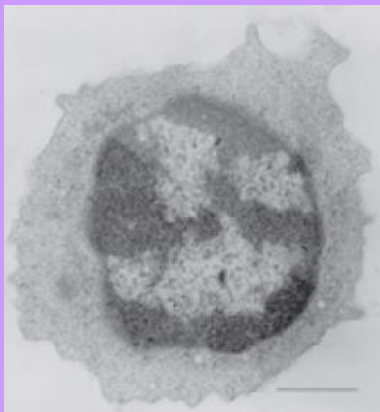
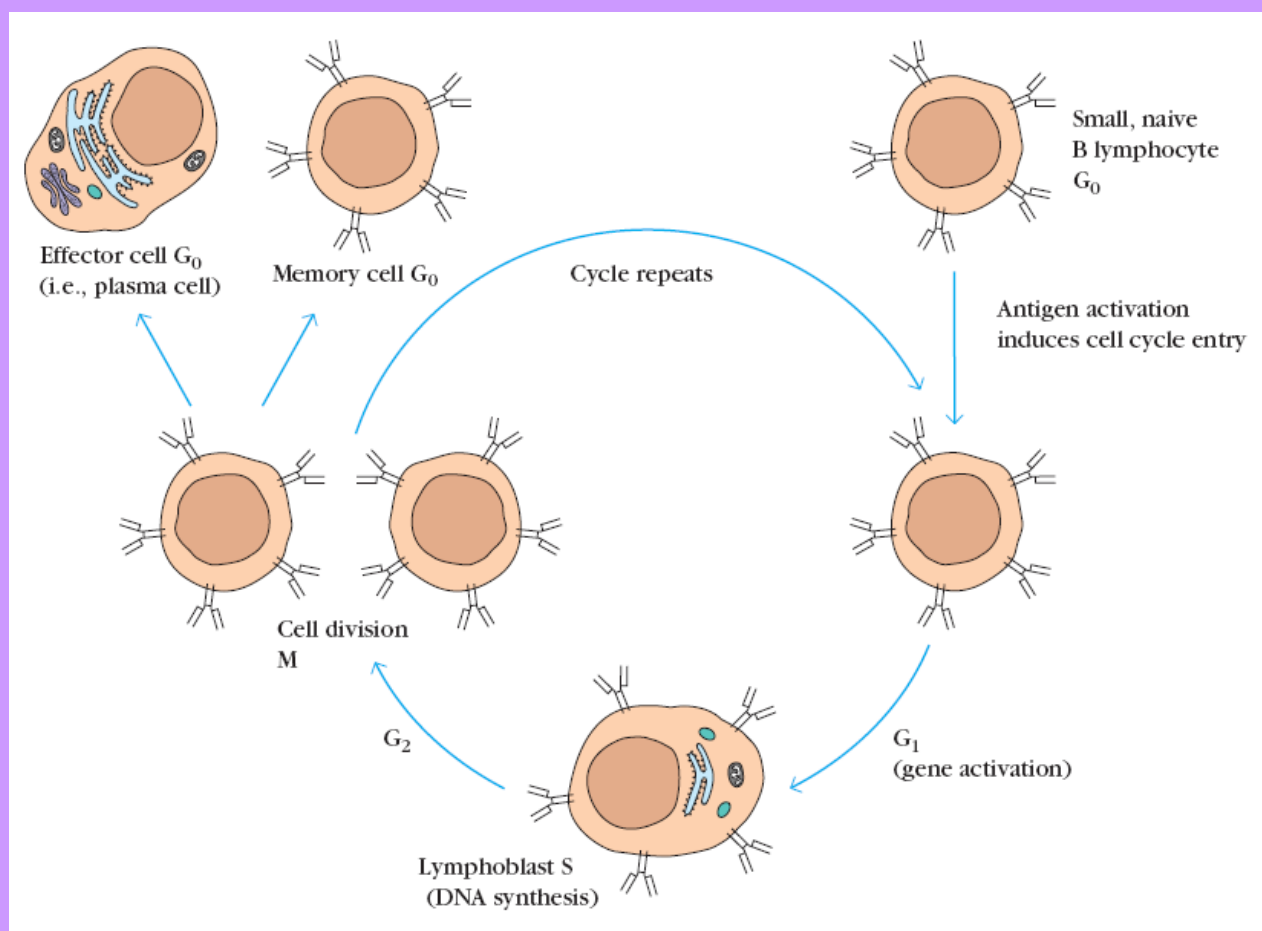
Plasmocyt

Lymfocyty II.

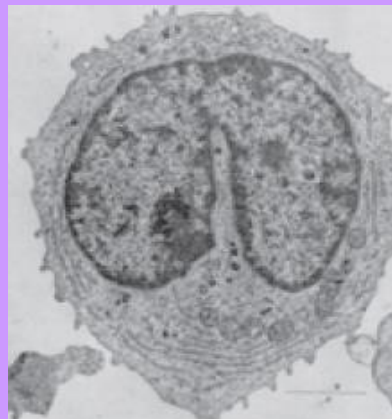
Neustále recirkulují mezi krví a lymfou

Lymfocyt → Lymfoblast (cca 15 μm) – proliferace do efektorových či paměťových buněk

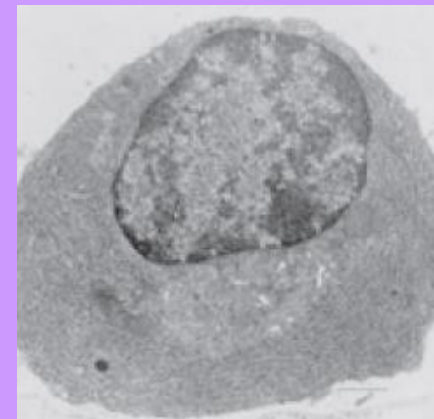
Plasmatické buňky - rozšířené ER, excentricky umístěné jádro



Malý lymfocyt (6 μm)



Lymfoblast (15 μm)



Plasmatická buňka (15 μm)

Lymfocyty III.

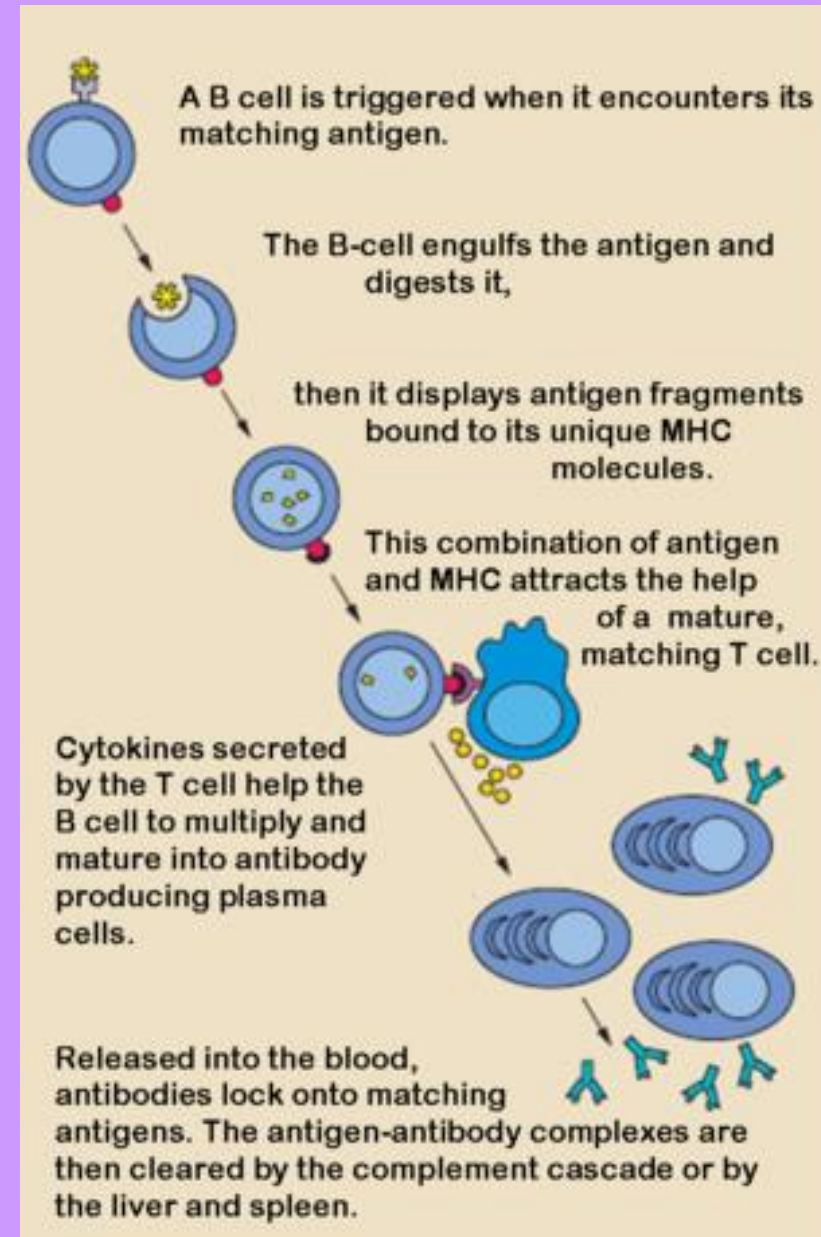
Rozdílná stádia vývoje a vývojové řady – rozlišení na základě membránových molekul reagujících s určitou monoklonální protilátkou (mAb) = CD markery – mAb reagující s membránovou molekulou

CD designation*	Function	B cell	T CELL		NK cell
			T _H	T _C	
CD2	Adhesion molecule; signal transduction	–	+	+	+
CD3	Signal-transduction element of T-cell receptor	–	+	+	–
CD4	Adhesion molecule that binds to class II MHC molecules; signal transduction	–	+	–	–
			(usually)	(usually)	
CD5	Unknown	+	+	+	–
			(subset)		
CD8	Adhesion molecule that binds to class I MHC molecules; signal transduction	–	–	+	+
			(usually)	(usually)	(variable)
CD16 (FcγRIII)	Low-affinity receptor for Fc region of IgG	–	–	–	+
CD21 (CR2)	Receptor for complement (C3d) and Epstein-Barr virus	+	–	–	–
CD28	Receptor for co-stimulatory B7 molecule on antigen-presenting cells	–	+	+	–
CD32 (FcγRII)	Receptor for Fc region of IgG	+	–	–	–
CD35 (CR1)	Receptor for complement (C3b)	+	–	–	–
CD40	Signal transduction	+	–	–	–
CD45	Signal transduction	+	+	+	+
CD56	Adhesion molecule	–	–	–	+

Lymfocyty IV.

B-lymfocyty:

- B (bone marrow – kostní dřeň; Fabriciova burza u ptáků)
- rozlišení od ostatních lymfocytů -
expresí membránově vázaných
imunoglobulinů (protilátek) (MVI) –
receptory pro antigen
- cca 1.5×10^5 protilátek = identické
vazebné místo pro antigen
- Interakce MVI s antigenem, s T-
lymfocytem či makrofágem → aktivace a
diferenciace klonů odpovídající specifity
→ paměťové buňky a plasmatické
buňky (plasmocyty) = sekrece protilátek
→ inhibice toxinů, opsonizace
- funkce jako APC (antigen-presenting
cell)



Lymfocyty V.

T-lymfocyty:

- T (thymus - brzlík)

- Expresí membránově vázaných receptorů (TCR) strukturně podobných imunoglobulinům

- TCR nerozpozná volný antigen (interakce s MHC II. třídy – APC)

- rozlišeny na základě:

CD4 (pomocné, T_H , vazba s MHC II.)

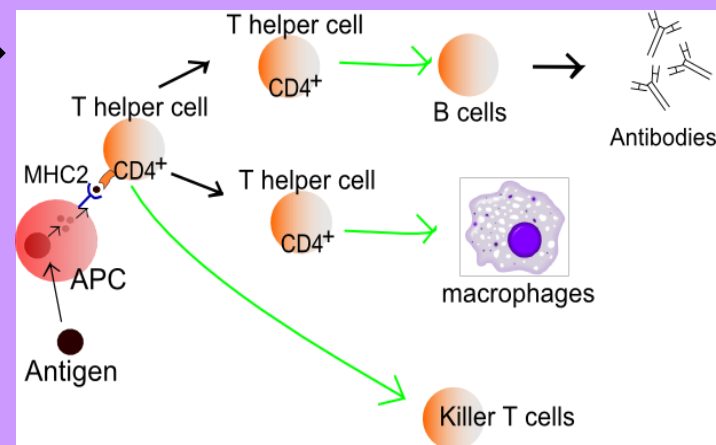
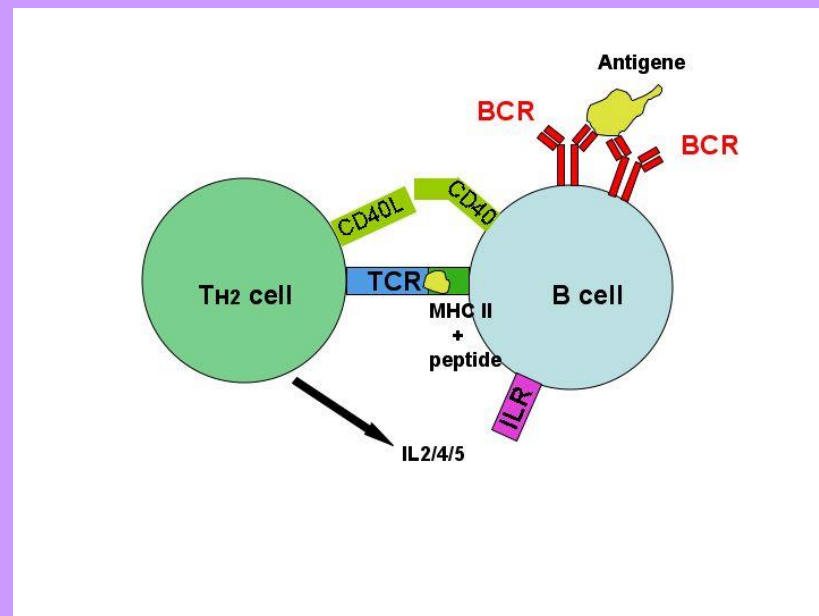
CD8 (cytotoxické, T_C , vazba s MHC I.)

- T_H aktivace rozpoznáním komplexu antigenu s MHC II. třídy → pomnožení → sekrece cytokinů

→ H_1 – T-buňky a makrofágy

→ H_2 – B-buňky a produkce protilátek

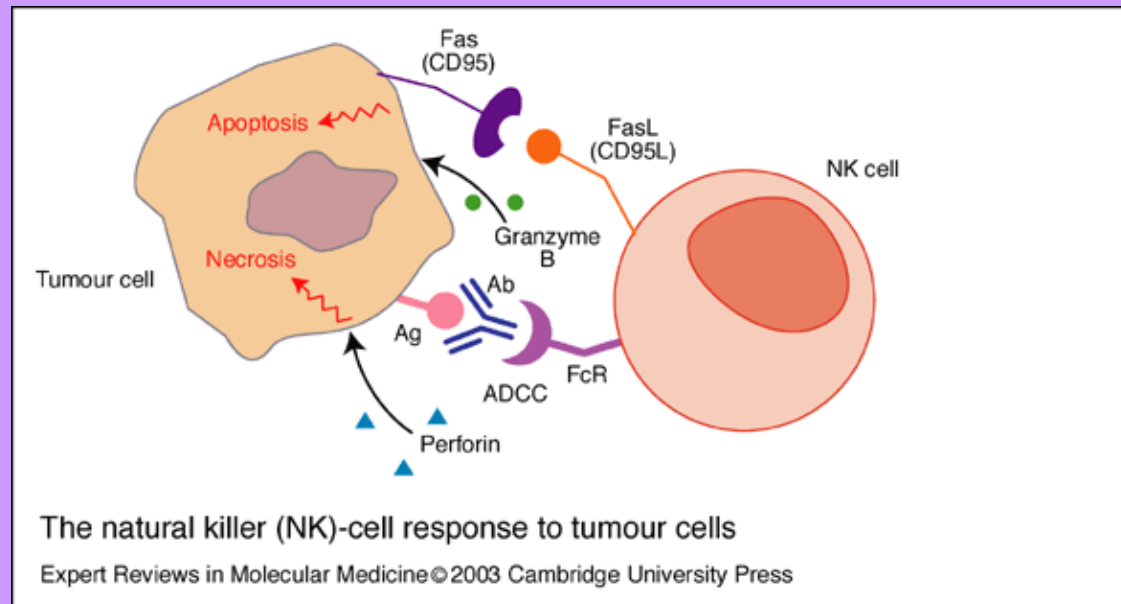
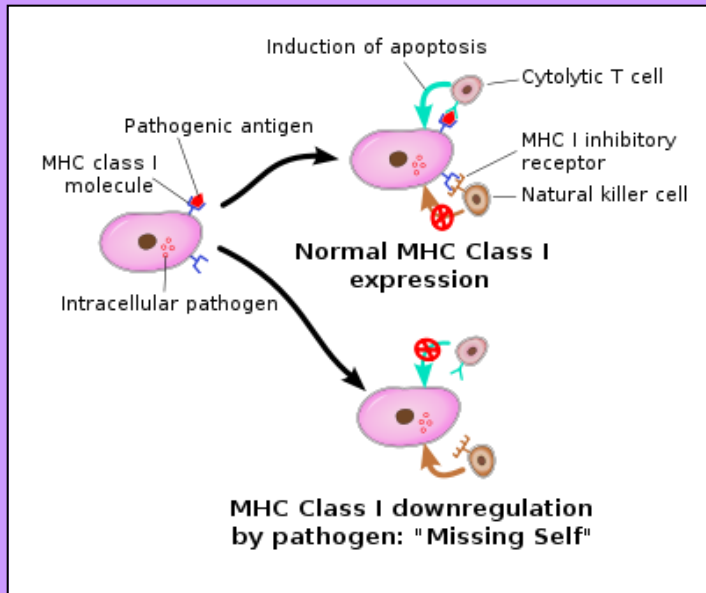
- T_C aktivace rozpoznáním komplexu antigen-MHC I. třídy (nádorové buňky, buňky změněné virem)



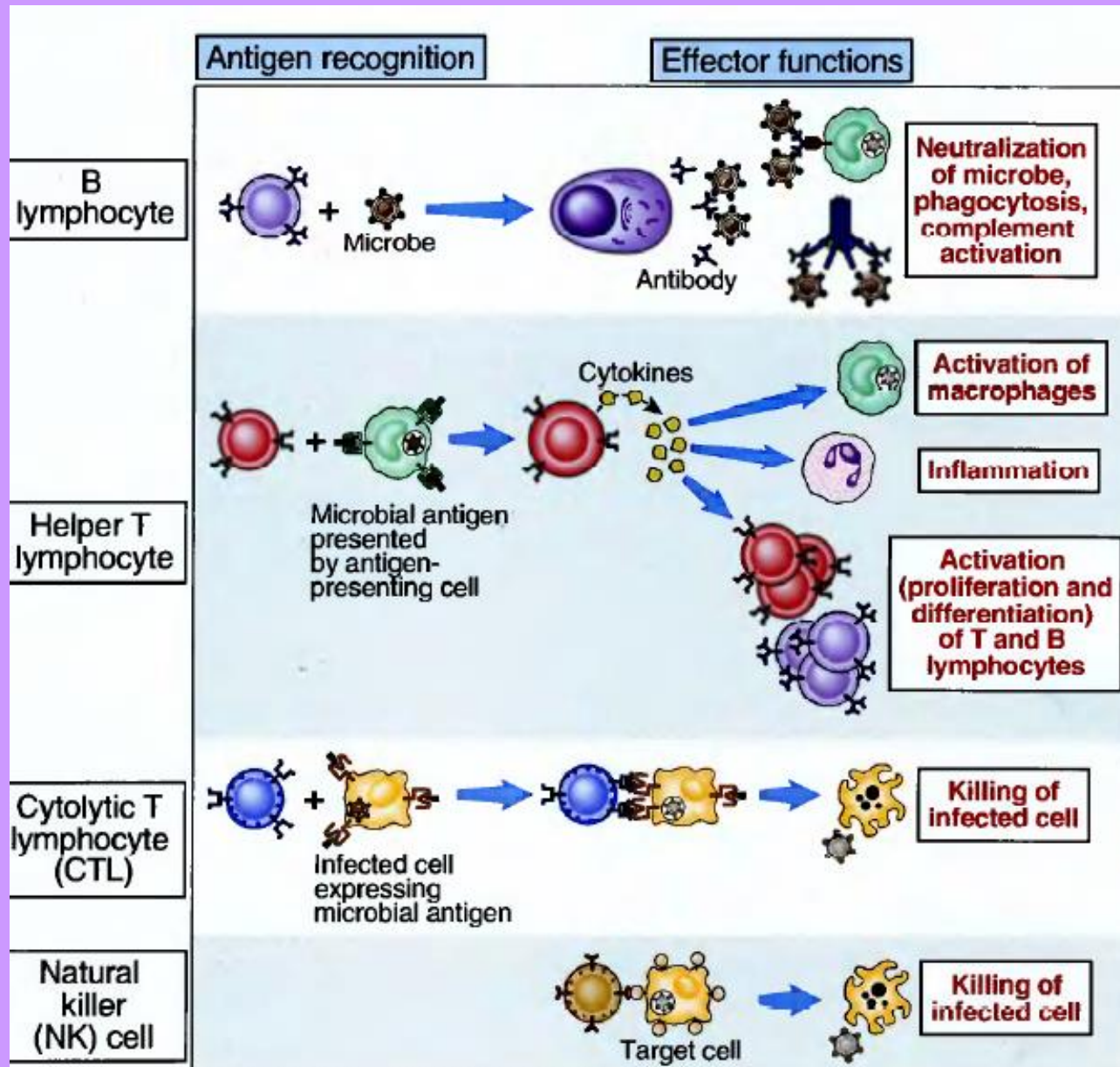
Lymfocyty VI.

NK-buňky:

- velké granulární lymfocyty
- cytotoxické bez předchozí imunizace, vůči nádorovým buňkám či buňkám pozměněných virem
- neexprimují proteiny typické pro T- či B-buňky
- rozpoznání pozměněných buněk na základě – sníženého počtu MHC I. třídy, nezvyklého profilu povrchových antigenů, vazbu na karboxy terminální část protilátek (vzniklé jako reakce na přítomnost viru či nádoru) přichycených na antigen vystavený na povrchu pozměněné buňky



Přehled základních druhů lymfocytů



Vrozená imunita

Imunita – stav ochrany před infekčními chorobami (lat. immunis – vyjmutý, vyloučený)

Vrozená (Innate) imunita - Složky přítomné před nástupem infekce, - „1st line of defense“ - nespecifické k patogenu

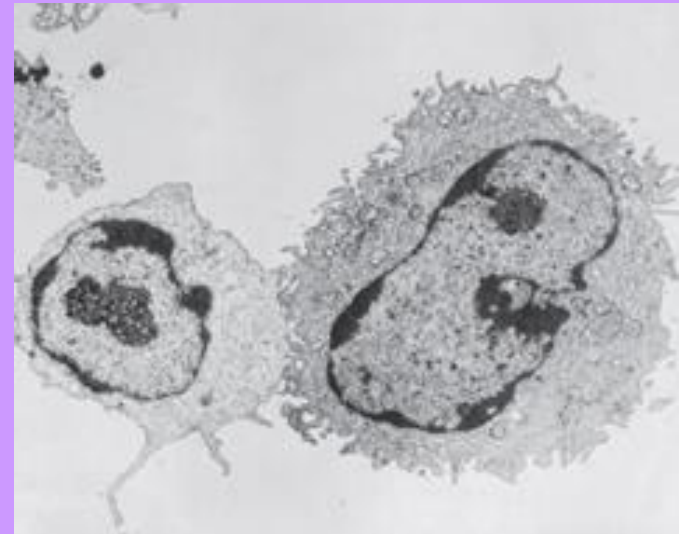
Type	Mechanism
<u>Anatomic barriers</u>	
Skin	Mechanical barrier retards entry of microbes. Acidic environment (pH 3–5) retards growth of microbes.
Mucous membranes	Normal flora compete with microbes for attachment sites and nutrients. Mucus entraps foreign microorganisms. Cilia propel microorganisms out of body.
<u>Physiologic barriers</u>	
Temperature	Normal body temperature inhibits growth of some pathogens. Fever response inhibits growth of some pathogens.
Low pH	Acidity of stomach contents kills most ingested microorganisms.
Chemical mediators	Lysozyme cleaves bacterial cell wall. Interferon induces antiviral state in uninfected cells. Complement lyses microorganisms or facilitates phagocytosis. Toll-like receptors recognize microbial molecules, signal cell to secrete immunostimulatory cytokines. Collectins disrupt cell wall of pathogen.
<u>Phagocytic/endocytic barriers</u>	
	Various cells internalize (endocytose) and break down foreign macromolecules. Specialized cells (blood monocytes, neutrophils, tissue macrophages) internalize (phagocytose), kill, and digest whole microorganisms.
<u>Inflammatory barriers</u>	
	Tissue damage and infection induce leakage of vascular fluid, containing serum proteins with antibacterial activity, and influx of phagocytic cells into the affected area.

Specifická (Adaptive) imunita

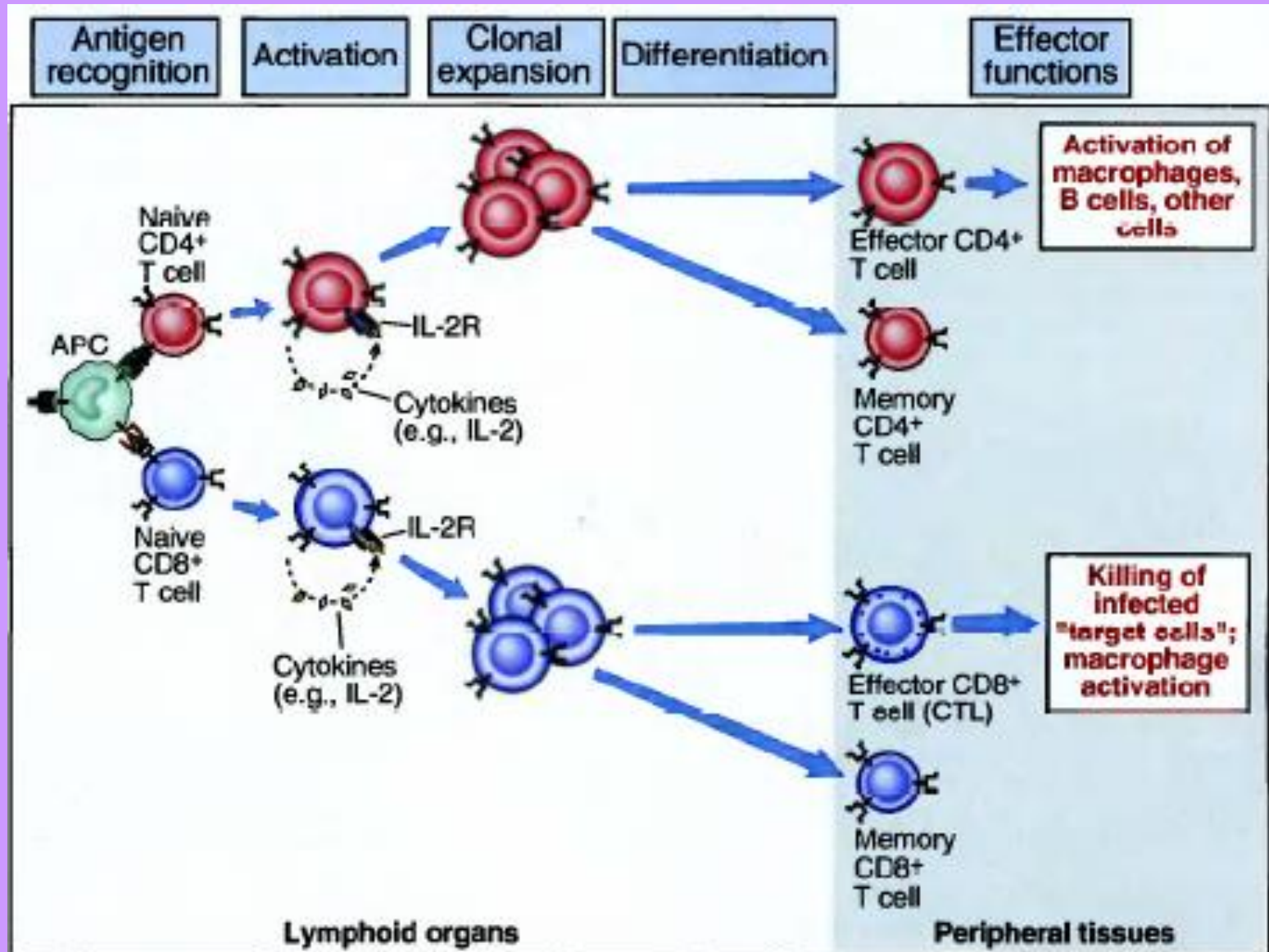
- Rozpoznání a eliminace cizích mikroorganismů a molekul (antigenů)
- Antigenní specifita - schopnost rozpoznat rozdílné proteiny
- Diversita – produkce obrovského množství rozpoznávacích molekul
- Imunologická paměť – opakované setkání s antigenem produkuje silnější imunitní reakci
- Schopnost rozpoznat cizí od vlastního
- Nutnost kooperace mezi Lymfocyty a APC (makrofágy)

B-lymfocyty – MVI, po interakci s patogenem – dělení a diferenciaci do paměťových B-lymfocytů a plasmatických buněk (sekrece protilátek)

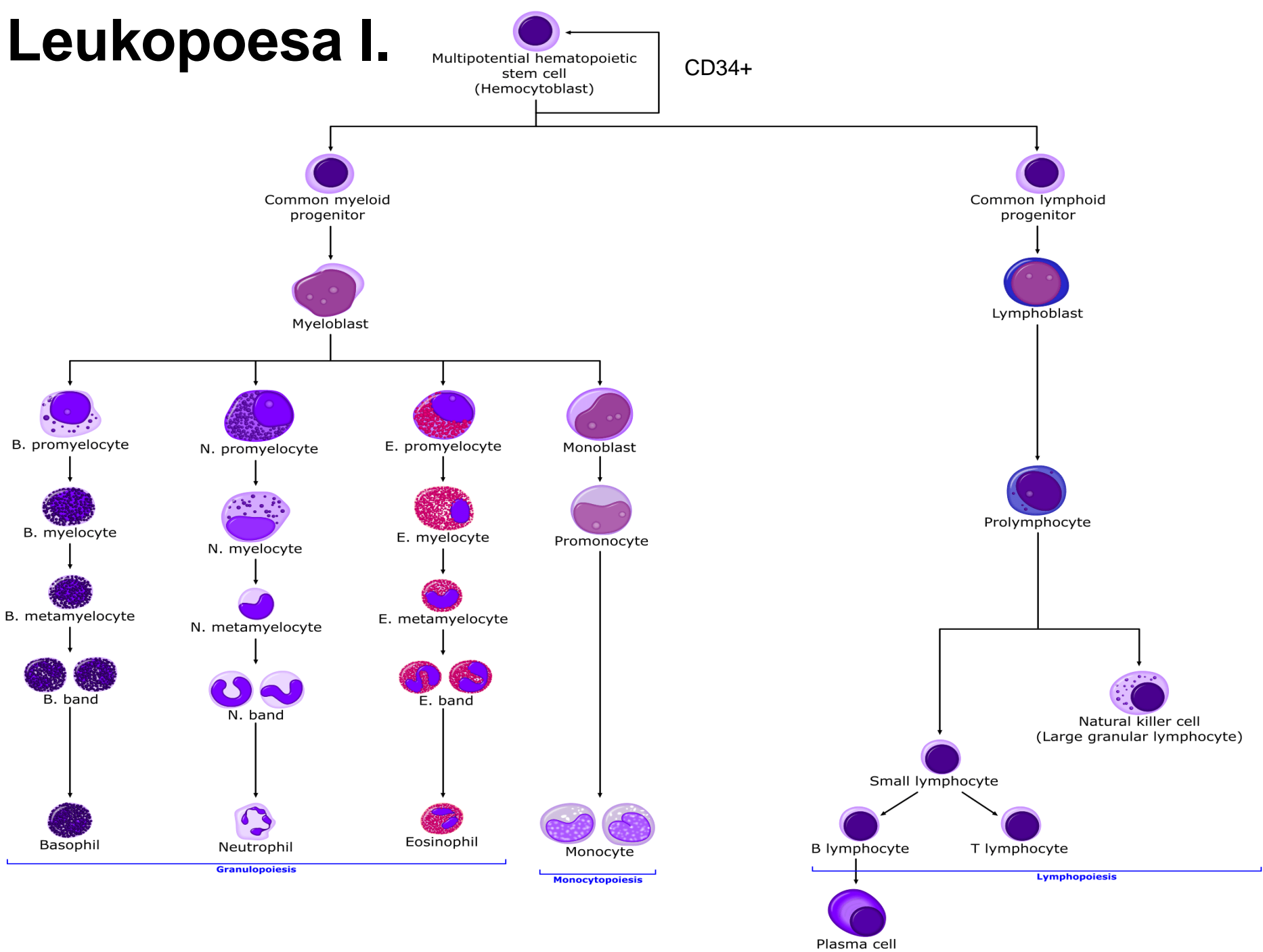
T-lymfocyty – exprese TCR (strukturně podobné protilátkám), rozpoznává pouze komplex Antigen-MHC (prezentace antigenu); interakce s APC (makrofágy, B-lymfocyty)



Specifická imunita II.

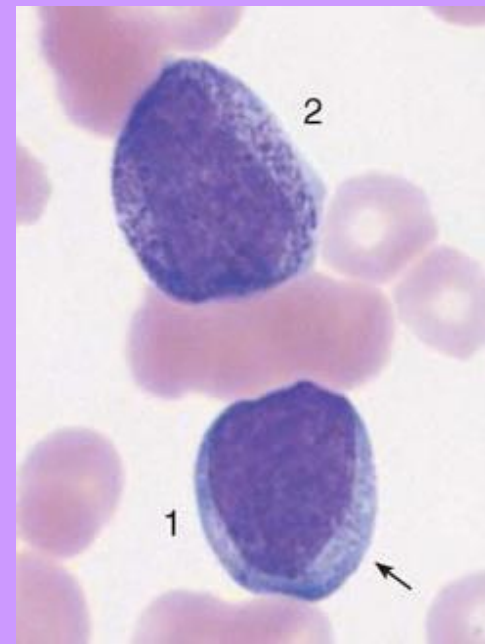


Leukopoiesis I.



Leukopoesa II.

1-myeloblast (začátek azurofilní granulace), 2-promyelocyt (mnohá velká azurofilní granula)



Myeloblast – první rozpoznatelný, kulatá až oválná buňka, v krvi jen při patologii; úzká vrstva lehce basofilní cytoplasmy; jemná mřížkovitá jaderná struktura, 14-20 μ m, 1-5% v dřeni



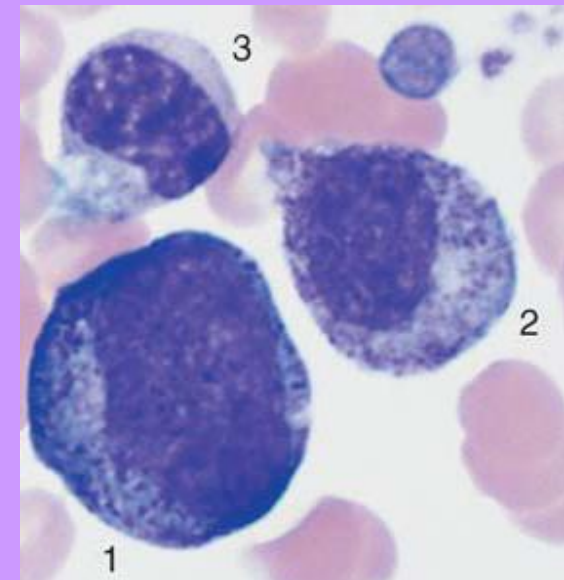
Promyelocyt – široká vrstva basofilní cytoplasmy s azurofilními granuly obsahující peroxidasy, hydrolasy, atd., až 27 μ m, vedle megakaryocytu největší v dřeni, 1-8% v dřeni



Myelocyt – menší než promyelocyt, světlejší cytoplasma, asi 18 μ m, široká variabilita morfologie, 15-20% v dřeni



Metamyelocyt – „mladé granulocyty“, jádro se pomalu mění na ledvinovité, neschopné se dělit, následuje už jen vyzrávání, kontrakce jádra, 12% ve dřeni,

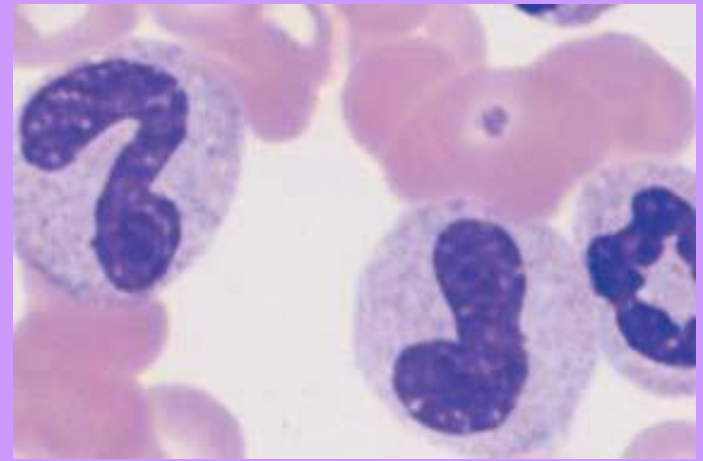


1-promyelocyt, 2-myelocyt, 3-metamyelocyt

- Výskyt v krvi jen při stresu, infekci.

Leukopoesa III.

Malý granulocyt (band cell, tyčka, nesegmentovaný granulocyt) – termín band cell použit jen když všechny jaderné sekce přibližně stejné šířky, nečleněné jádro tvaru paličky, nebo tyčky, velké množství cytoplasmy vůči jádru

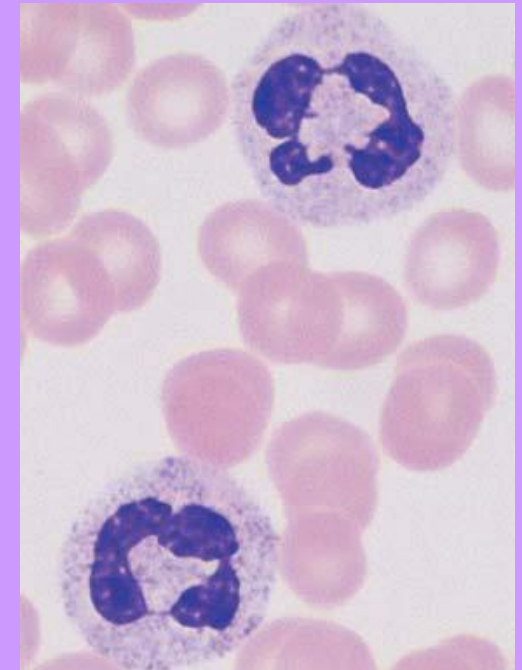


Segmentovaný neutrofil – tvoří se rostoucí kontrakcí jádra, v konečné fázi jsou jaderné segmenty spojeny pouze úzkými můstky jaderného chromatinu, cytoplasmata se barví od skoro bezbarvé do jemně růžové či fialové, granuly často stěží viditelné tečky, počet segmentů roste s věkem buňky

normální distribuce: 10-30% - 2 segmenty, 40-50% - 3 segmenty, 10-20% - 4 segmenty, 0-5% - 5 segmentů,

posun doleva k menšímu počtu segmentů → reaktivní aktivace

posun doprava → nedostatek B12 či kyseliny listové

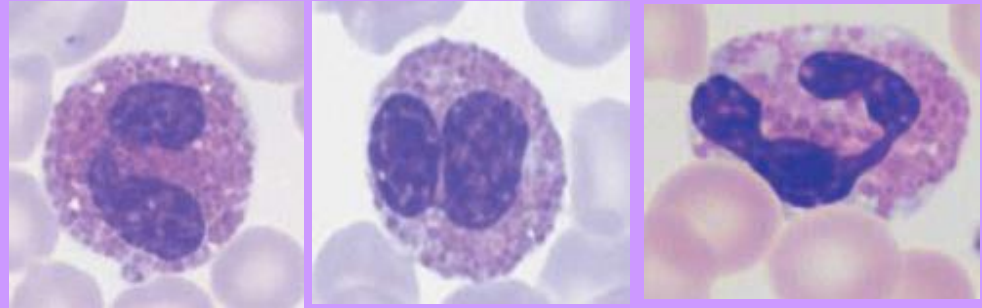


Segmentované neutrofilní granulocyty

Leukopoesa IV.

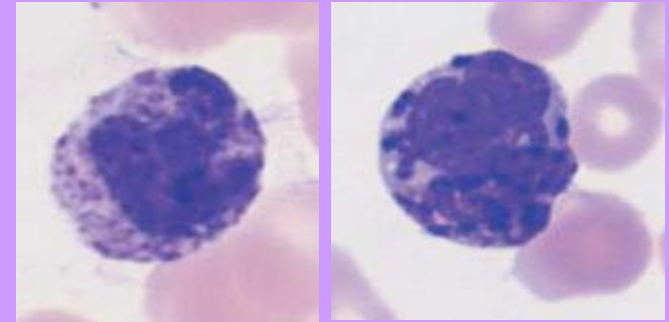
Eosinofilní granulocyty –

rozpoznatelný v dřeni ve stadiu promyelocytu, velká granula barvící se modro červeně, jádro většinou 2 segmenty, zvýšený počet u alergií, parazitárních nemocí

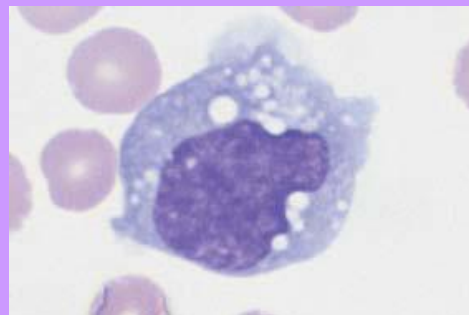
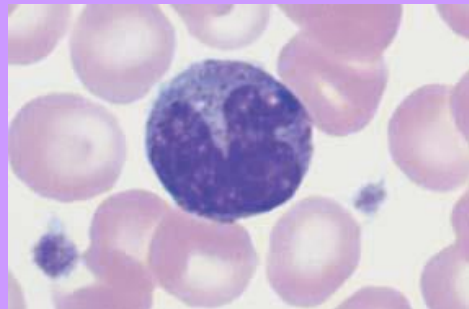


Basofilní granulocyty – rozpoznatelný v dřeni ve

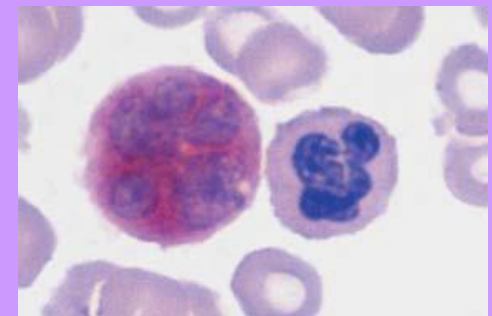
stadiu promyelocytu, velká granula barvící se černo-fialově, jádro překryto bazofilními zrnky, zvýšené množství u hypersenzitivních reakcí



Monocyty – nejrozmanitější ze všech buněk, vejčité jádro, 20-40 μm , charakterizace monocytu se liší dle polohy odečtu z nátěru, nemají prekursor, který by se dal použít s diagnostickou relevancí – nárůst = imunitní reakce, pokles = leukemie



Fagocytující monocyty

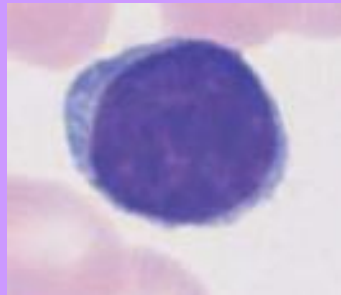
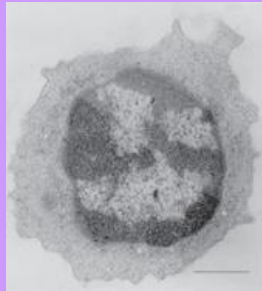


Barvení na esterasu, marker pro monocyty

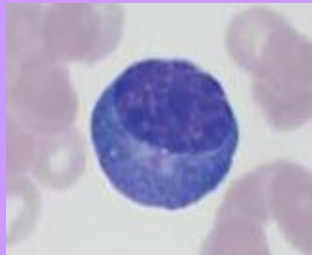
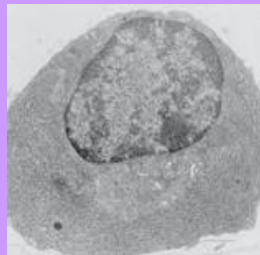
Leukopoesa V.

Lymfocyty – produkovány v mízních uzlinách, slezině, kostní dřeni

- nezralé prekursorů nejsou vypouštěny do krve → nemají diagnostickou hodnotu
- maximálně lze najít „malé lymfocyty“ s oválným až kulatým jádrem s 6-9 μm v průměru, hustý, hrubý chromatin, cytoplasma se ovíjí kolem jádra a je slabě zásaditá
- nerozlišitelné na základě morfologie
- velké lymfocyty“ jsou většinou NK buňky
- plasmatické buňky se nachází jen zřídka v krvi

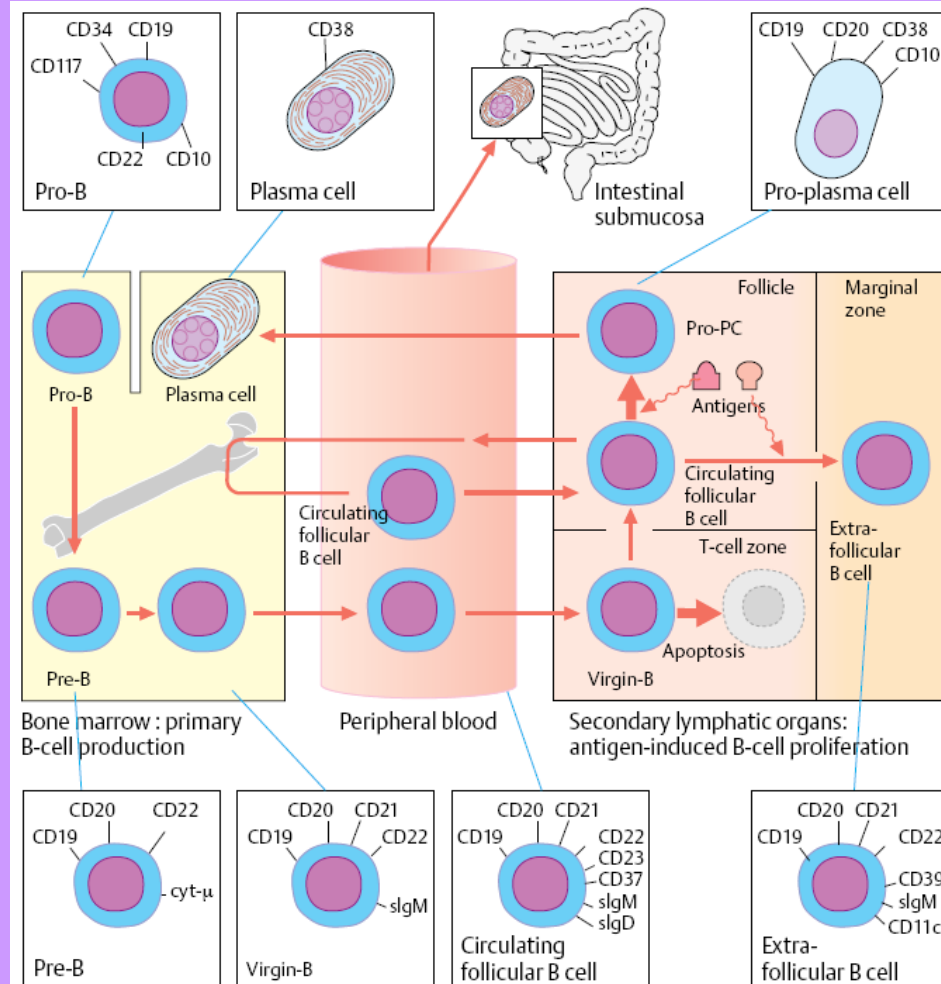
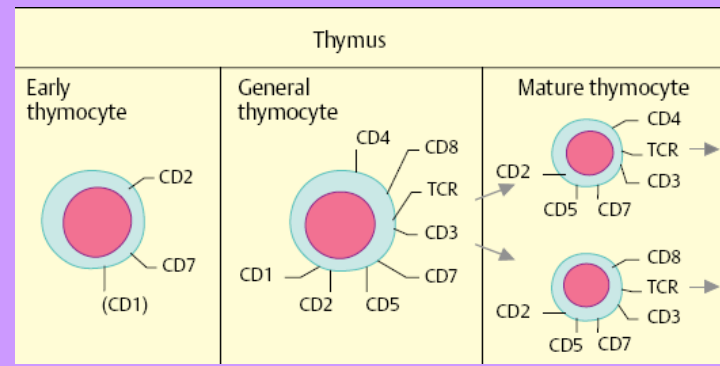
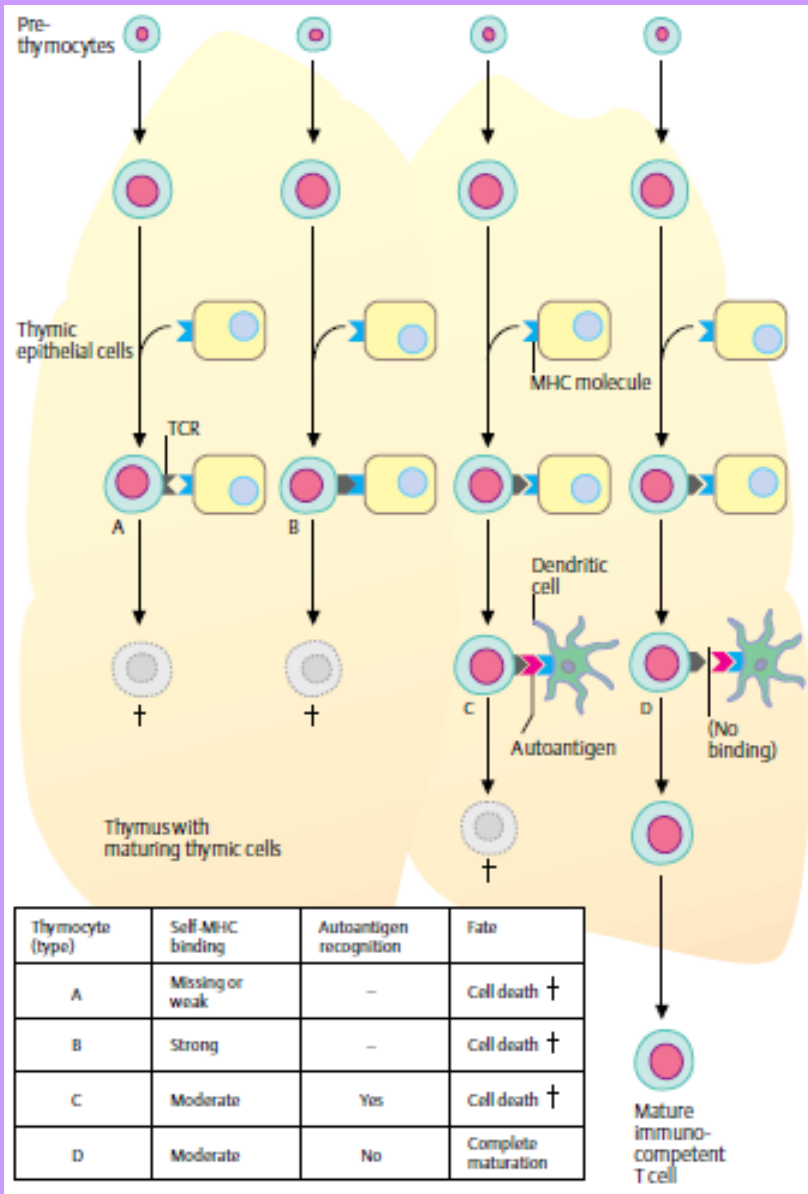


Malý
lymfocyt



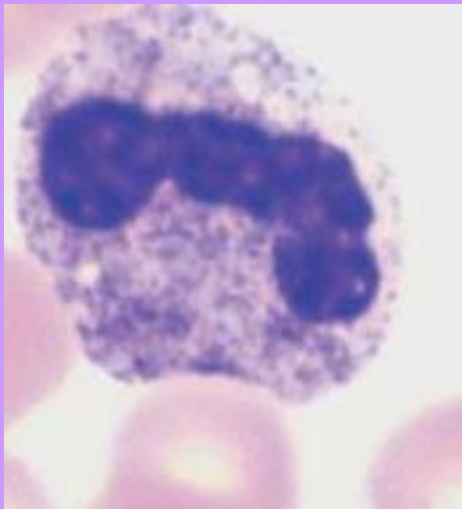
Plasmatická
buňka

Leukopoesa VI.

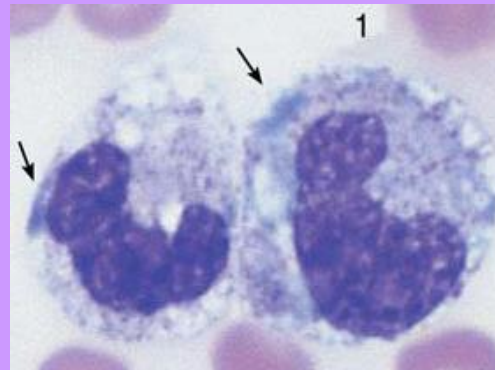


Úkazy v barvení leukocytů

Toxická granulace – normálně slabě barvená granula se barví rudě až fialově = následek akce proti bakteriím, proteinům v důsledku infekce, autoimunitní choroby (chronická polyarthritida) → následek je nález cytoplasmatických vakuol = konečné stadium fagocytosy (**Döhle bodies**)

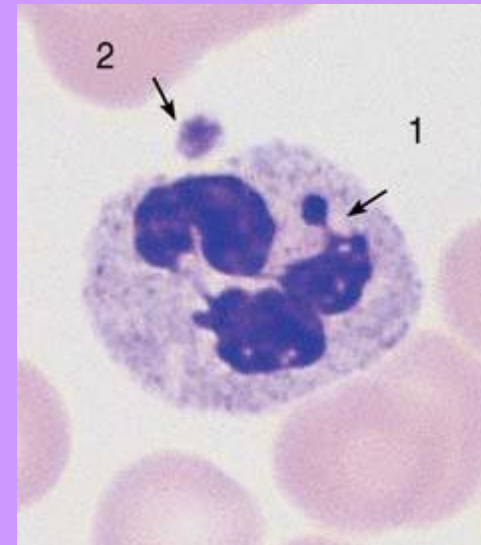


Toxická granulace neutrofilního granulocytu



Sepse s toxickou granulací, vakuoly a Döhlova tělíska

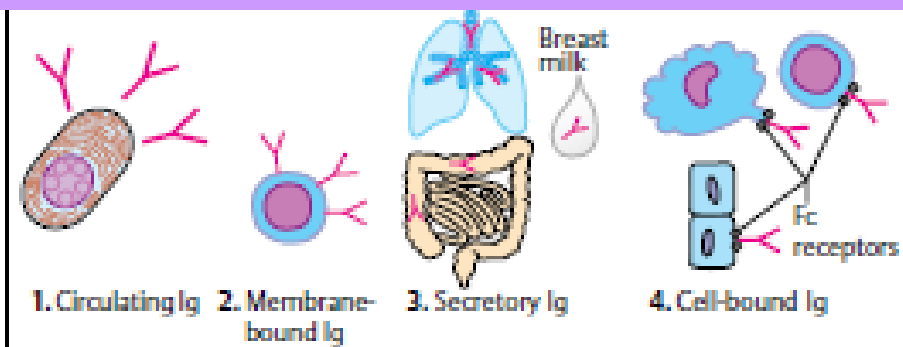
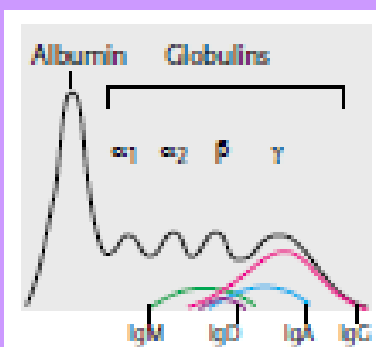
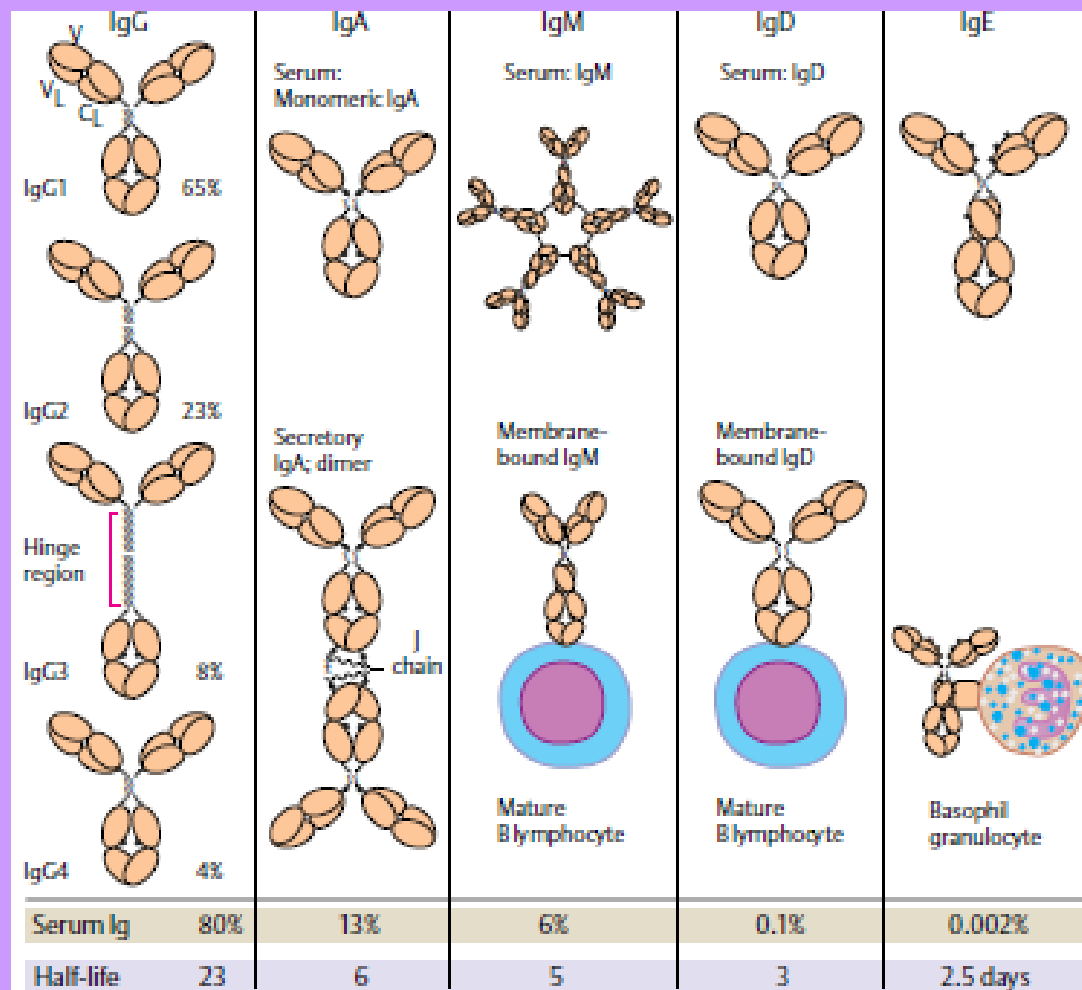
Jaderné přívěsky – drobná chromatinová tělíska zůstávající připojena přes tenký most, vypadají jako palička na buben, přisedlá kulička, malá tenisová raketa. Pouze palička odpovídá X-chromosomu (sexchromatin), který se oddělil v procesu segmentace. Minimum 6 z 500 granulocytů s tímto znakem naznačuje ženské pohlaví



1 - bubnová palička, 2 - trombocyt

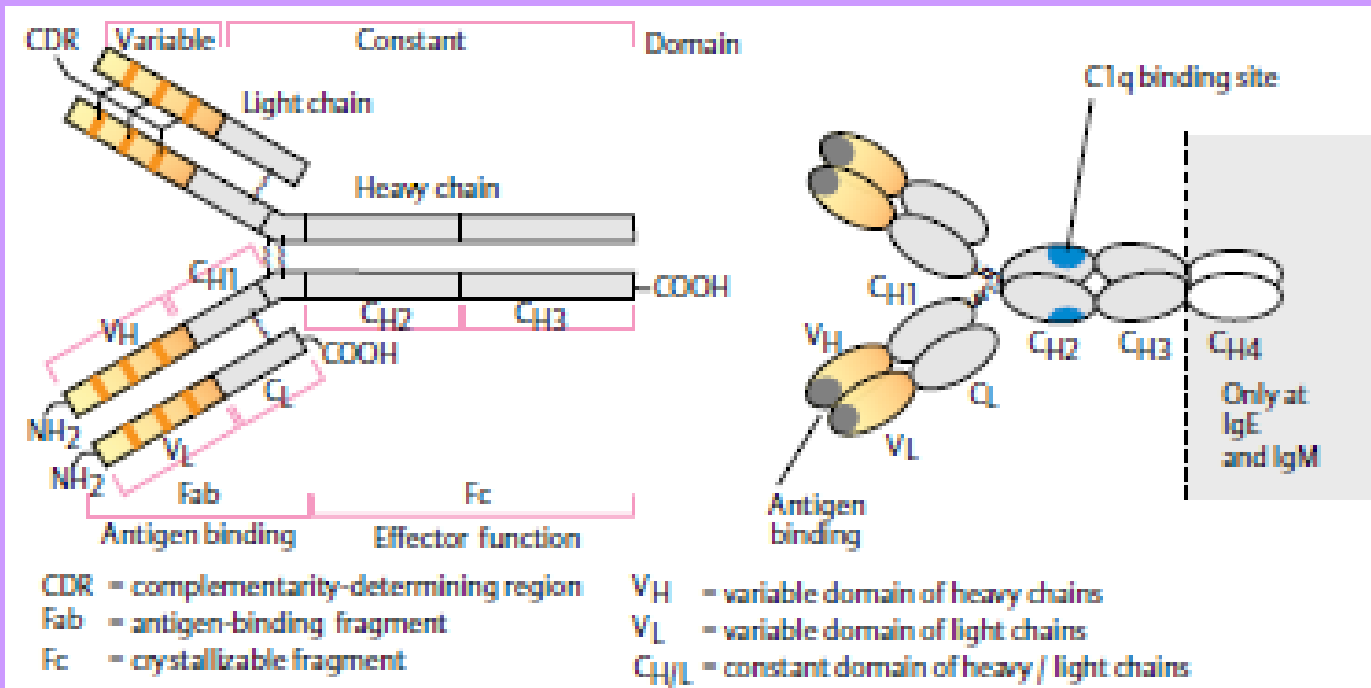
Protilátky

- Glykoproteiny, produkty plasmatických buněk
- dle těžkých řetězců → 5 tříd (izotypů)
- v B-lymfocyty IgM, IgD membránově vázané (MVI)
- opsonizace, aktivace komplementu

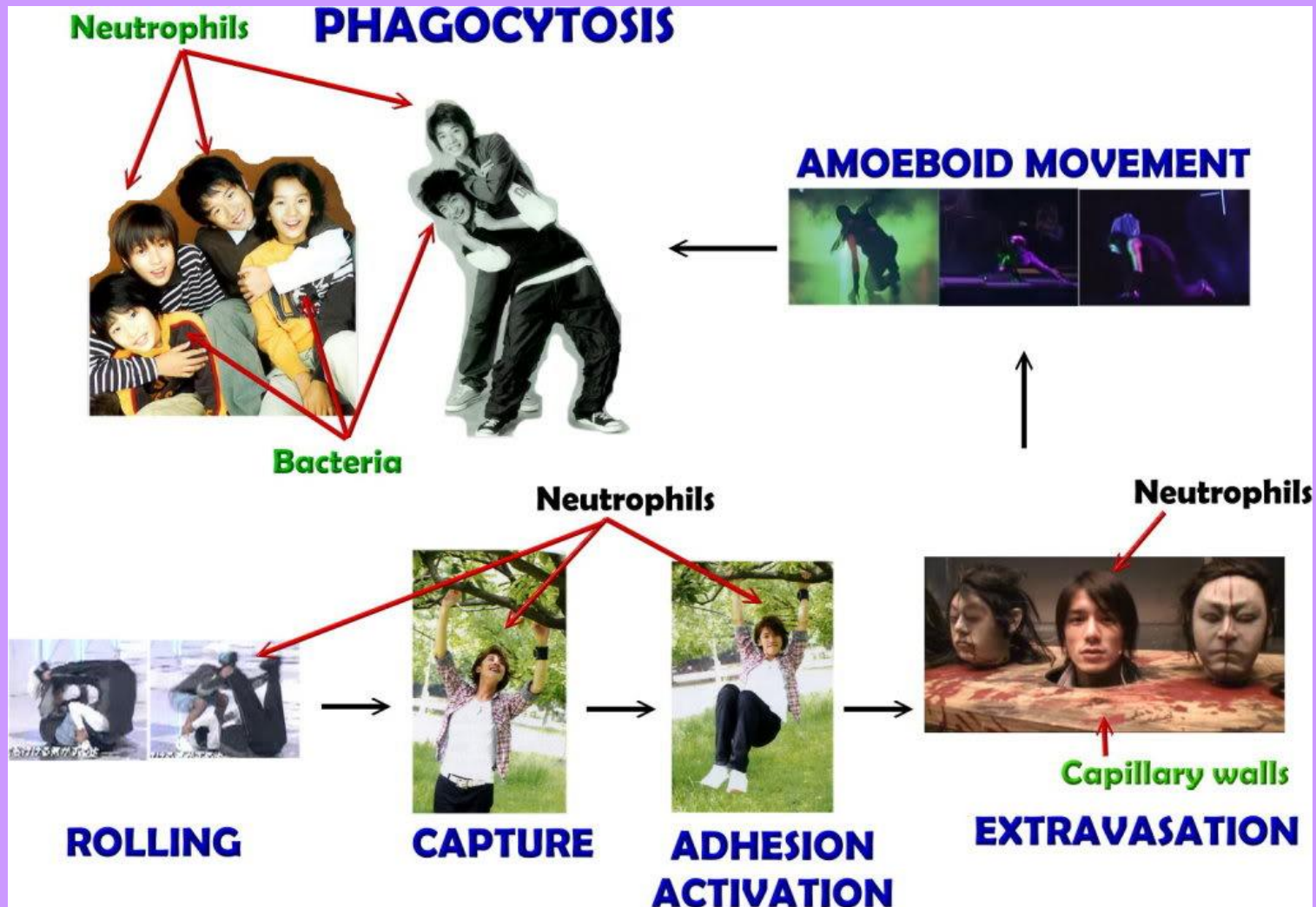


Protilátky II.

- 50-70 kDa těžký řetězec, 25 kDa lehký řetězec
- izotypový přesmyk na IgG v průběhu maturace, po setkání s antigenem
- antigen – molekula, se kterou se váže protilátka
- epitop – struktura na povrchu antigenu, na kterou se váže věřit



Slovo závěrem.....



Posilujte svůj imunitní systém pravidelným posilováním...