

# Základy Hematologie KBB / ZHEMP

## *Lekce 1*

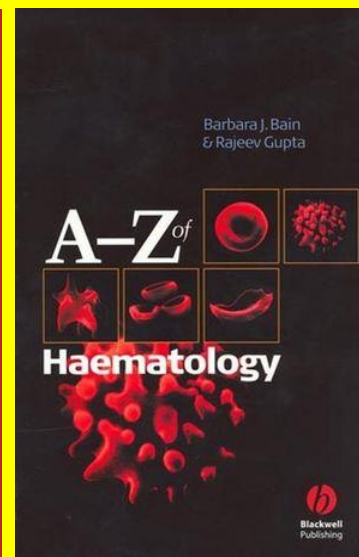
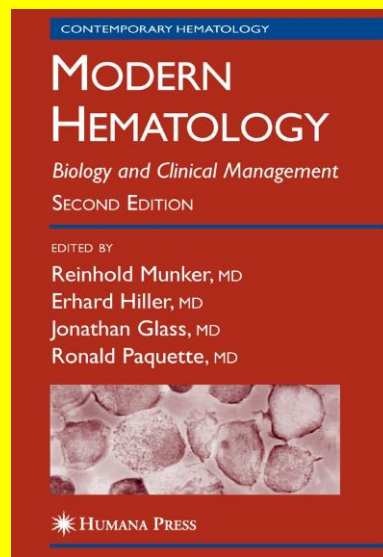
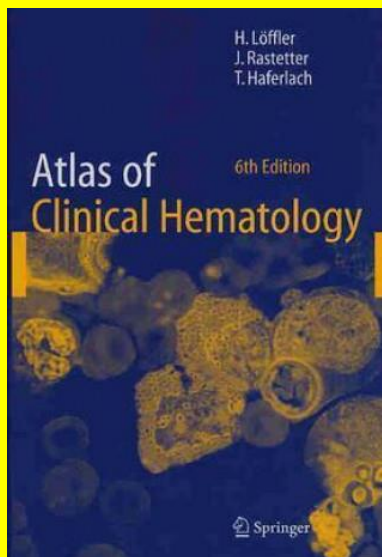
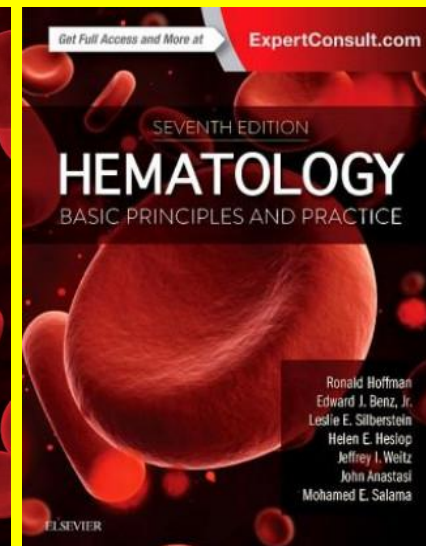
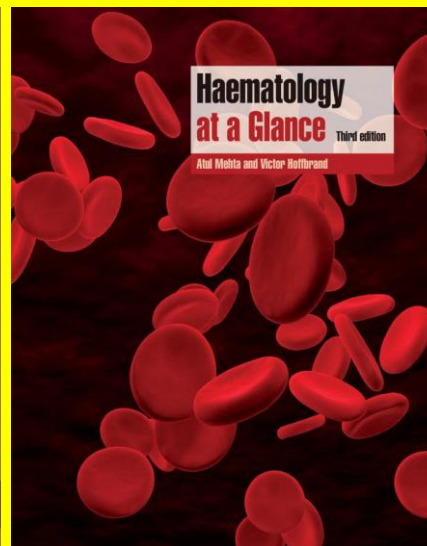
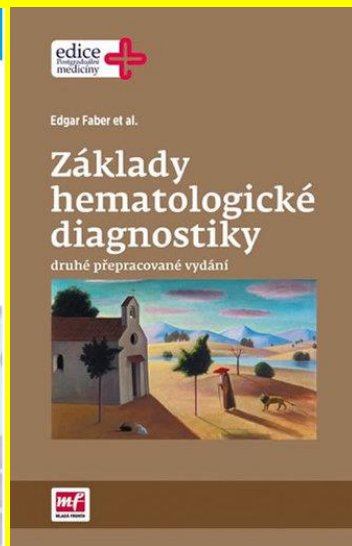
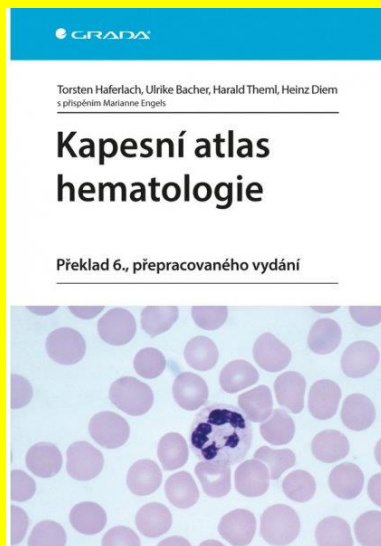


**Radim Vrzal**

*radim.vrzal@upol.cz*

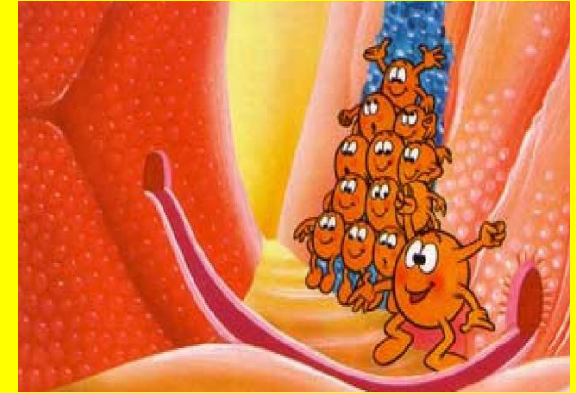
**Katedra buněčné biologie a genetiky, budova 51**

# Zdroje, z kterých čerpám:



..a jiné knihy,  
publikace

# Základy ???



Červená krvinka je červená, bílá bílá a destička? To přece není důležité.



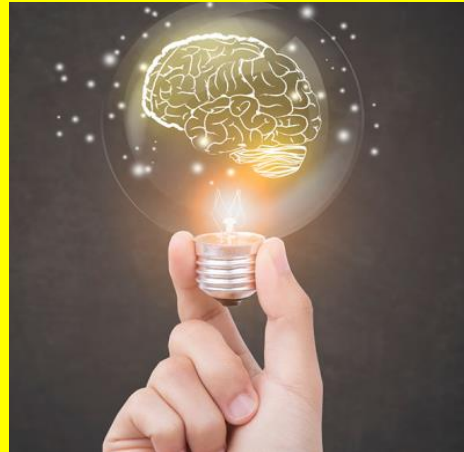
.. ani náhodou !

# Proč ???



- fascinace naší biologickou podstatou

- pochopení jak fungujeme



- předání nadšení dál....





# Závěr

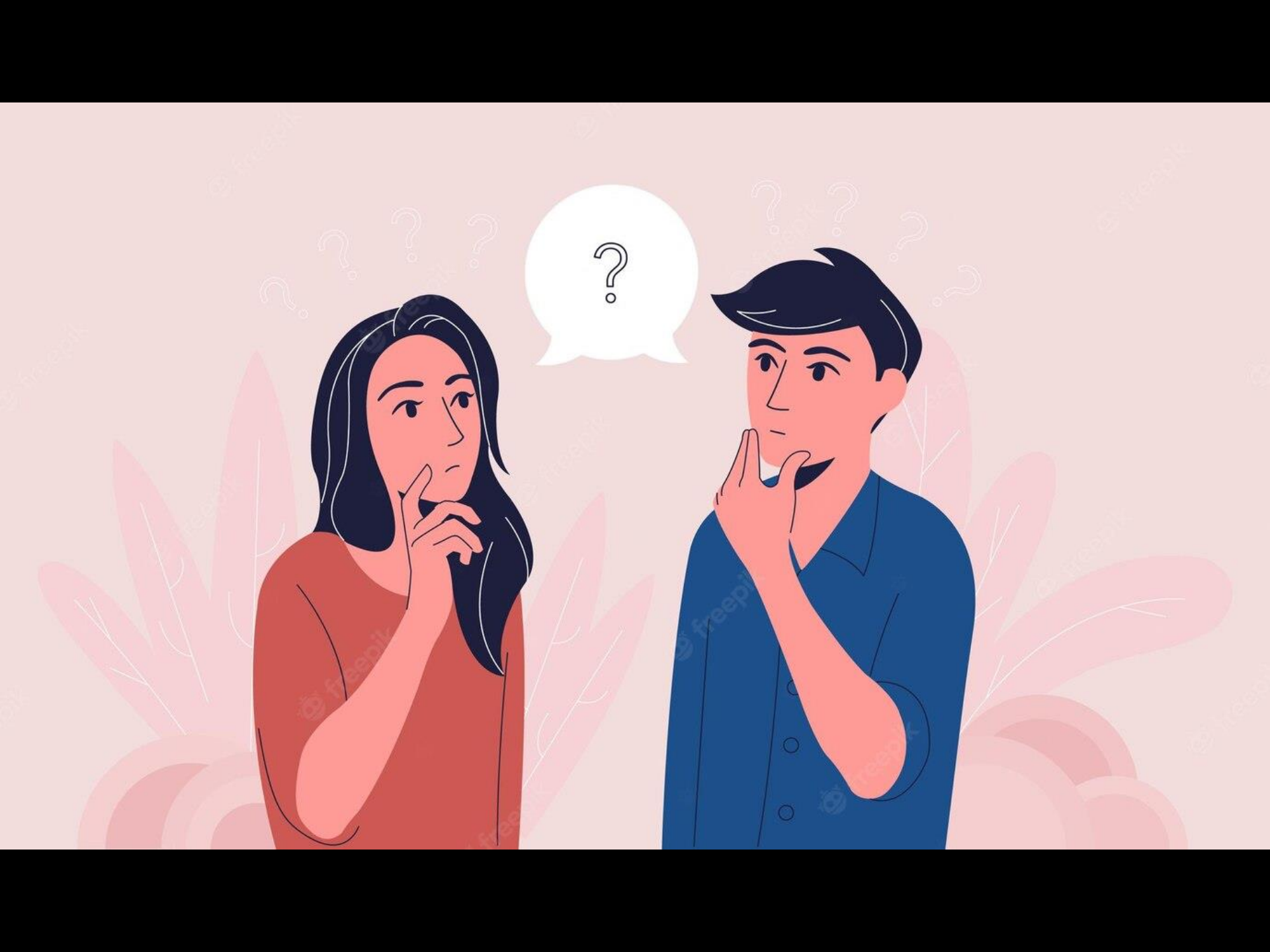
- Princip „extra míle“



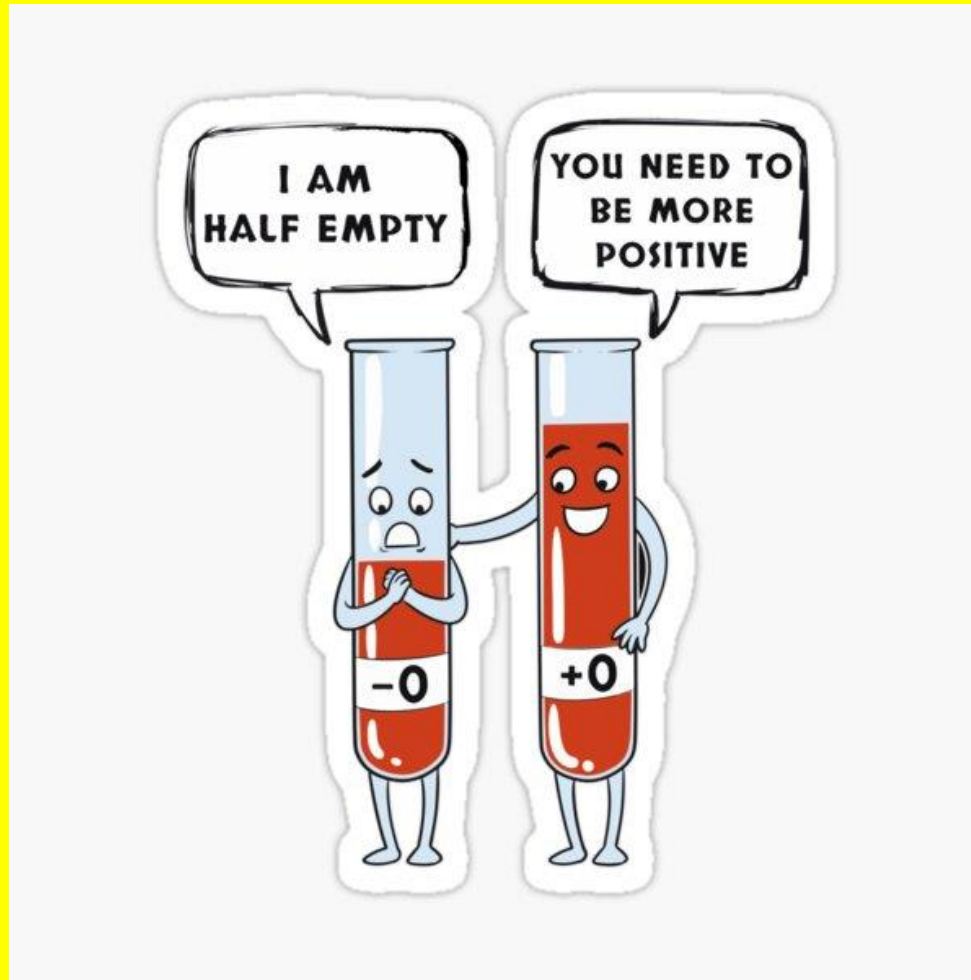
- Slabí zhynou



**Otázka: Stojí mi to za to ???**

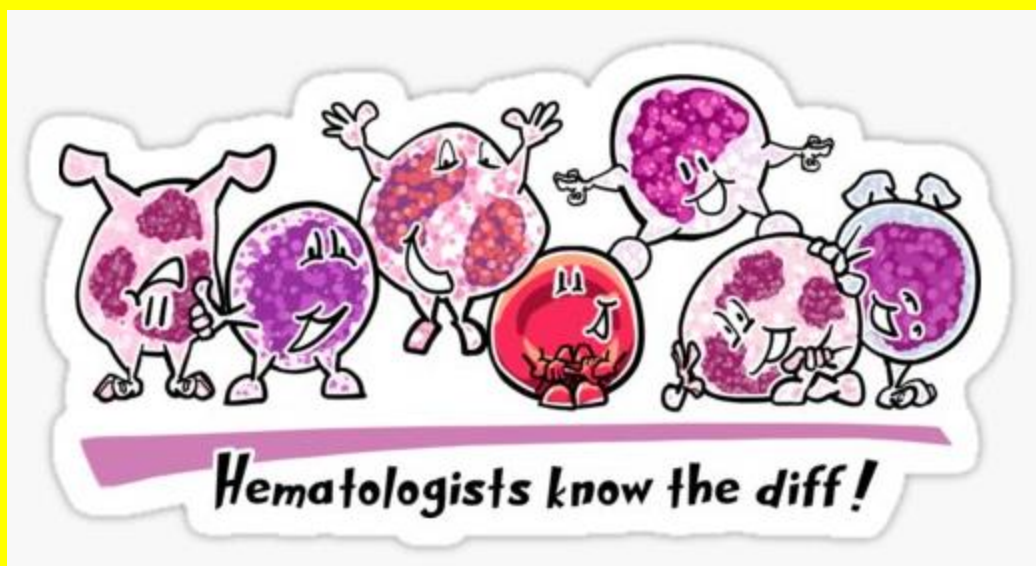


# Začínáme....



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

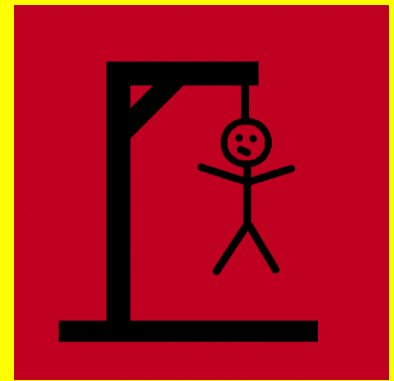
**Proč vznikla ?** – změna ve složení / zastoupení buněčného  
i nebuněčného materiálu pocházejícího z krvetočných  
orgánů → **diagnóza** → **léčba a zbavení potíží**



**Drobné rozdíly jsou klíčové !**



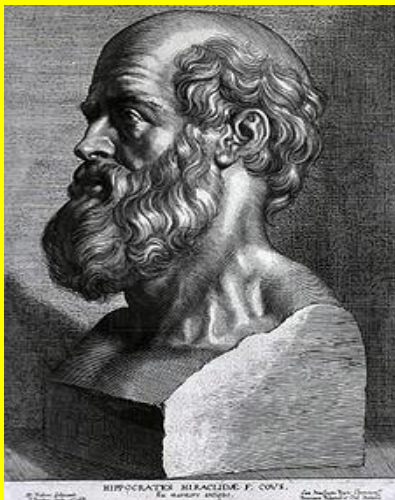
# Trocha historie .....



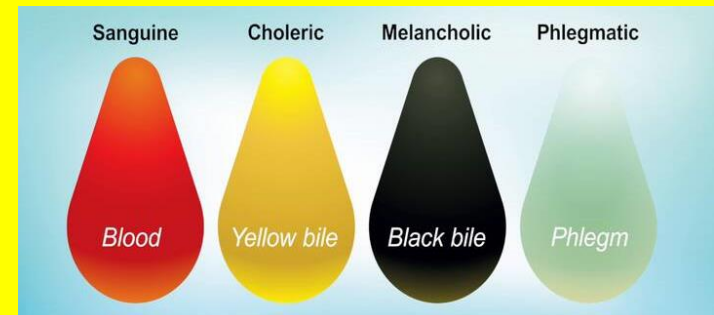
Starověký Egypt, Řecko – pouštění žilou „blood letting“ (někdy prospěšné, snížení hypertenze)

Dnes: flebotomie – „proříznutí žíly“

– hemochromatosa, polycytemie



- 460-377 př.Kr. – Hippokrates a humorální teorie - =  
nemoc je nerovnováha mezi 4 základními tekutinami  
lidského těla





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**



1662

Johann Daniel Major

**- první intravenosní injekce člověku**



1770

William Hewson

**„otec hematologie“  
popis leukocytů a některých srážecích faktorů**



1818

James Blundell

**- první transfuze krve z člověka člověku**



1842

Alfred Donné

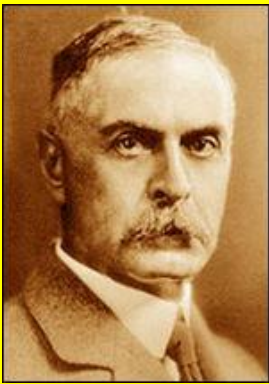
**identifikace krevních destiček**



1877

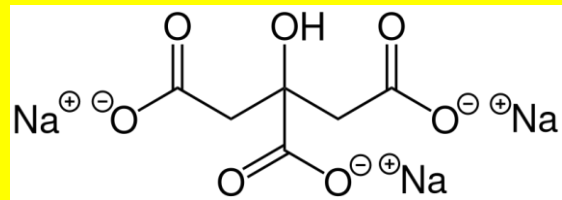
Paul Ehrlich

**barvení krevních buněk**



**1901**

**Karl Landsteiner**  
identifikace krevních skupin



**1914**

**citrát sodný**  
zabraňuje srážení krve  
(skladování krve)

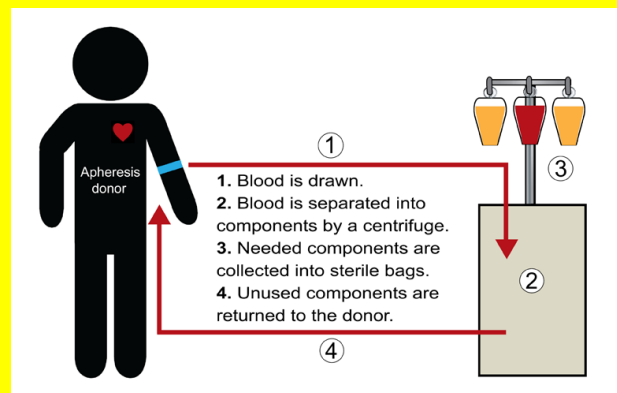


**1936**

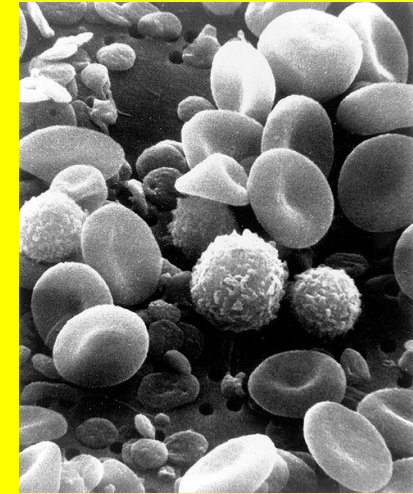
**vznik první krevní banky**  
(Chicago, USA)

**2. polovina 20 st.**

**použití antihemolických faktorů, aфарézy, klinické použití G-CSF, IL3, atd.**



# Co to je KREV ?



= **Suspenze krevních elementů v plazmě**

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

**Bílé krvinky** = leukocyty (*leukos* = bílý)

- polymorfonukleární – vícejaderné

- mononukleární

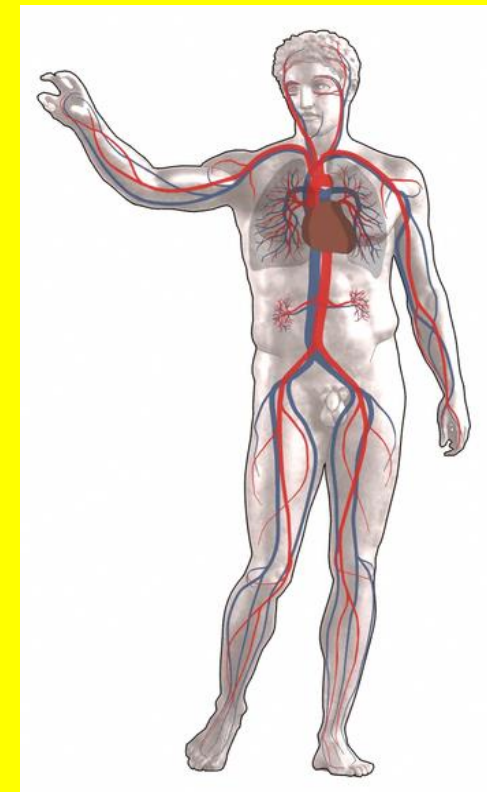
**Krevní destičky** = trombocyty (*thrombos* = sedlina, sraženina)

- Proudí v **žilách**/vénách a **tepších**/arteriích
- Tvoří 7-10% celkové tělesné hmotnosti, tj. 4,5 - 6 litrů

Význam krve = **Spojuje všechny orgány a těle → udržuje homeostázu**

Funkce krve

- **dýchací** ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ )
- **výživná** (cukry, proteiny, lipidy, vitamíny, minerály)
- **odvodná** (bilirubin, metabolity léčiv, atd.)



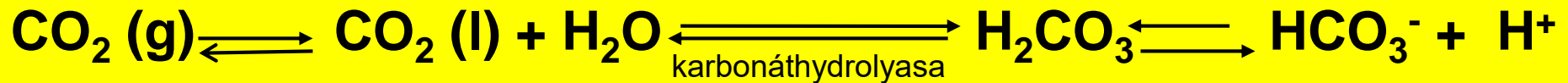


# Krev II.

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

Zajištění pH = konst. → pufrovací systémy

## 1) Hydrogenkarbonátový (v plazmě) – otevřený



pH dle Henderson-Hasselbachovy rovnice:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}, \quad [\text{H}_2\text{CO}_3] = \alpha * \text{pCO}_2$$

$\alpha$  – koeficient rozpustnosti plynu v plazmě (z Henryho zákona),

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

## 2) Hemoglobinový (erythrocyty)



(protonizace koncového His v  $\beta$ -řetězcích)

**3) Proteinový – disociace postranních řetězců, malý význam**

**4) Fosfátový – nízká koncentrace  $\text{PO}_4^{3-}$ , malý význam, uplatnění v moči**



# Co to je plazma?

= **Nažloutlý vodný roztok** bílkovin, elektrolytů, malých organických molekul

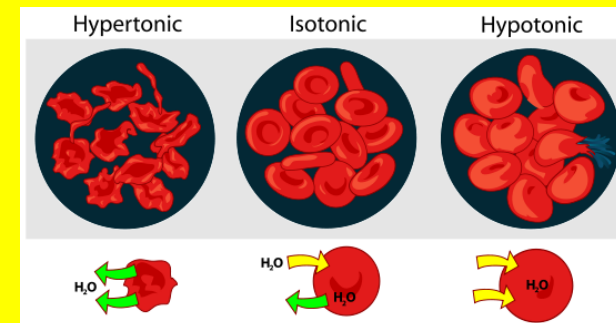
- **Sérum** (lat. *serum* = syrovátka) = **plazma bez fibrinogenu či faktorů krevní srážlivosti**

- **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)



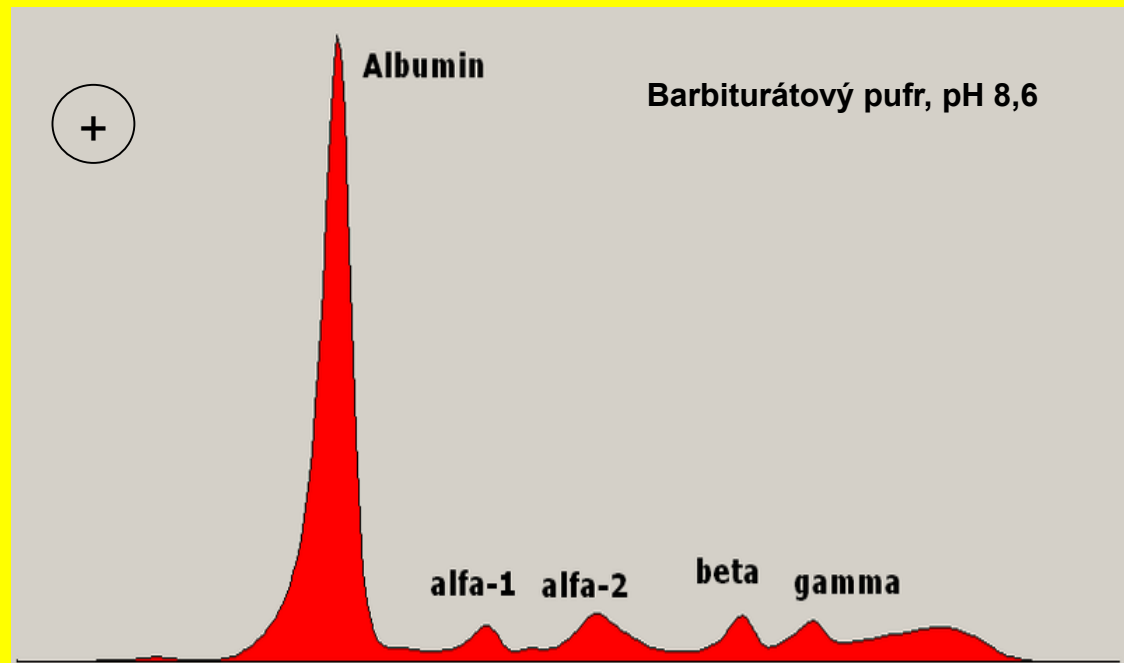
# Jaké je složení plazmy?

## Anorganické ionty:

<b>Na<sup>+</sup></b>	- 136-148 mM	- udržení stálého osmotického tlaku
<b>Cl<sup>-</sup></b>	- 95-110 mM	- udržení osm.tlaku, tvorba HCl
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	- 22-26 mM	- transport CO <sub>2</sub> , pufrovací systém
<b>K<sup>+</sup></b>	- 3.7-5 mM	- excitabilita svalů a nervů
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	- 0.66-0.94 mM	- tlumivé účinky na nervovou dráždivost, nezbytný pro enzymy
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	- 2.15-2.61 mM	- srážení krve, nervosvalový přenos
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	- 0.6-1.4 mM	- pufrovací systém
<b>Fe</b>	- 10-27 μM	- tvorba Hb, součást enzymů
<b>I<sup>-</sup></b>	- 275-630 μM	- tvorba hormonů štítné žlázy
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	- 12-22 μM	- součást enzymů, křevetvorba

# Krevní plazma III.

- Bílkoviny - 65-85 g/l
  - albuminy (35-50 g/l), globuliny (30 g/l) ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\gamma$ )
  - fibrinogen (4 g/l)
  - zdroje: **játra**, B-lymfocyty



- diagnostický význam (ALP, AST, ALT)

# Krevní plazma IV.

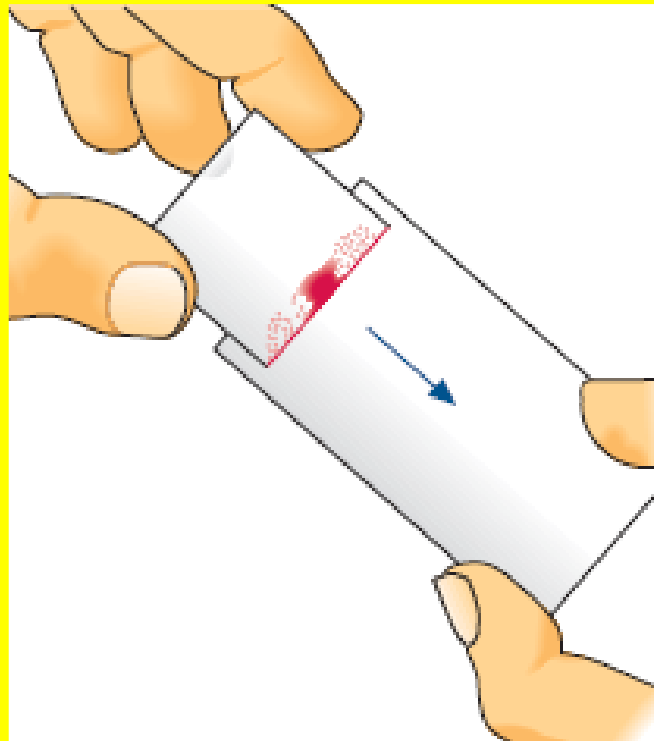
## **Funkce bílkovin:**

- udržování stálého objemu plazmy
- 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<sup>+</sup>
- **nutriční význam**
- **proteolytické systémy** – koagulační, fibrinolytický, komplement
- **plazmatické inhibitory proteáz** ( $\alpha$ 1-antitrypsin; antitrombin III)
- **obrana organismu proti infekci** –  $\gamma$ -globuliny

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

# Analýza Krve = Krevní nátěr (blood smear)

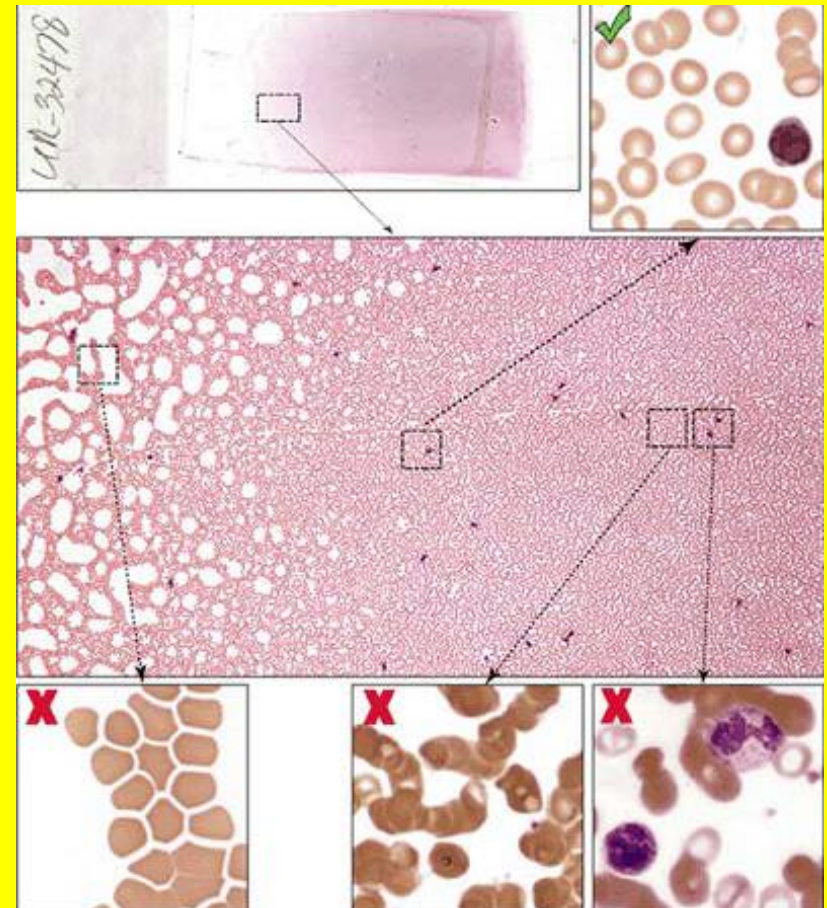
- Kapilární / venózní krev do EDTA-zkumavky **NE** více jak 3 h stará
  - sklička umytá v roztoku ethanol : ether = 1:1 (odmaštěná)
  - nátěr musí zaschnout, vhodná fixace methanolem
  - barvení : **Papenheimova** metoda panoptického barvení



Provedení krevního stěru

Správně nabarvený  
nátěr

**růžový**

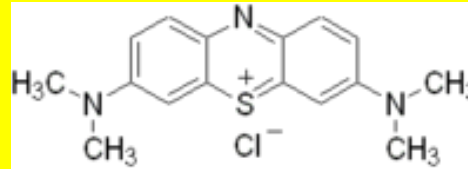




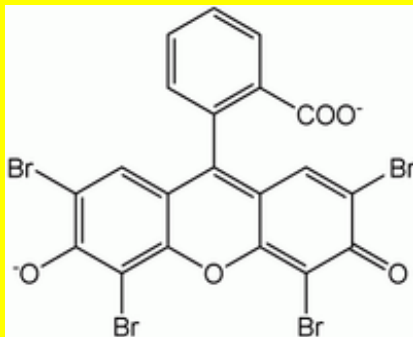
# Krevní nátěr (blood smear) II.

## Pappenheimovo panoptické barvení:

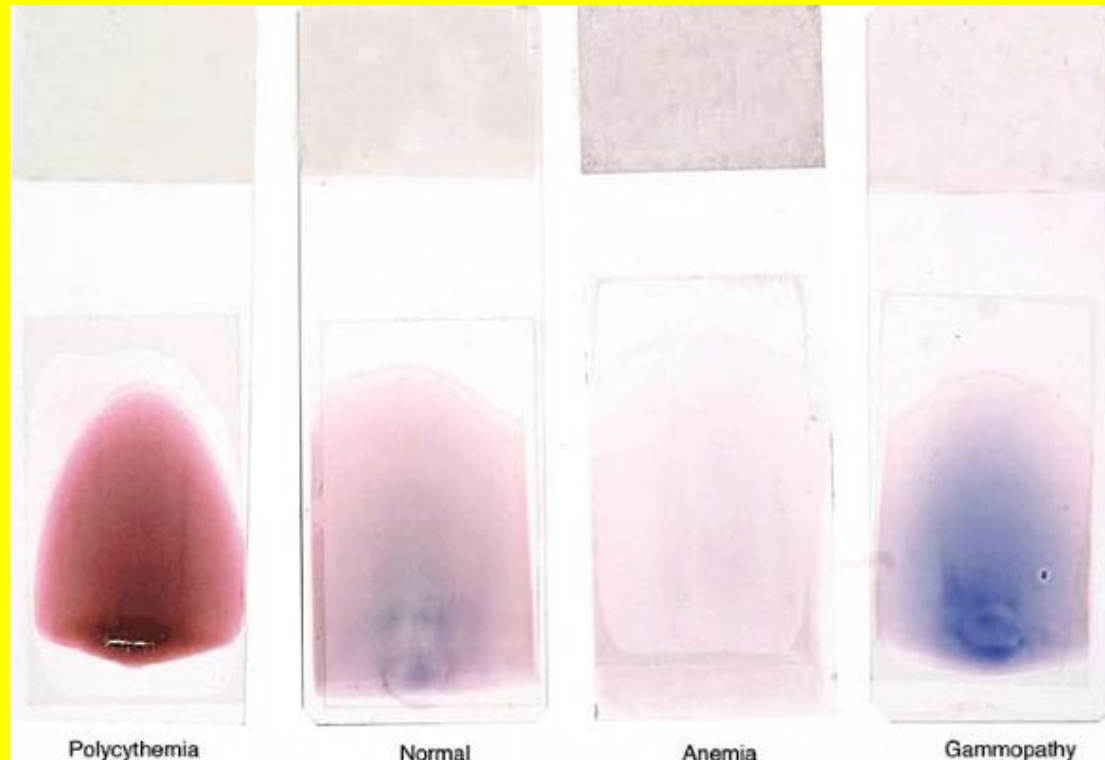
- barvicí roztok **May-Grünwald** (Eosin-Methylene Blue)
- fosfátový pufr, pH 7.3
- zředěný **Giemsa** (Azur-eosin)
- fosfátový pufr pH 6.8-7.4



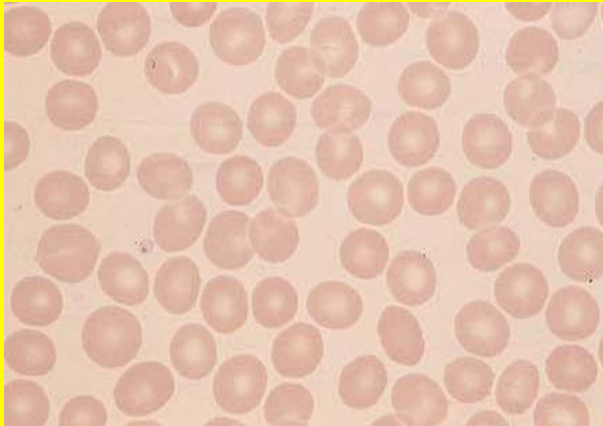
MB – zásaditý, modrá až fialová barva, afinita ke kyselým komponentám buňky (DNA/RNA, granuly basofilů s heparinem )



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

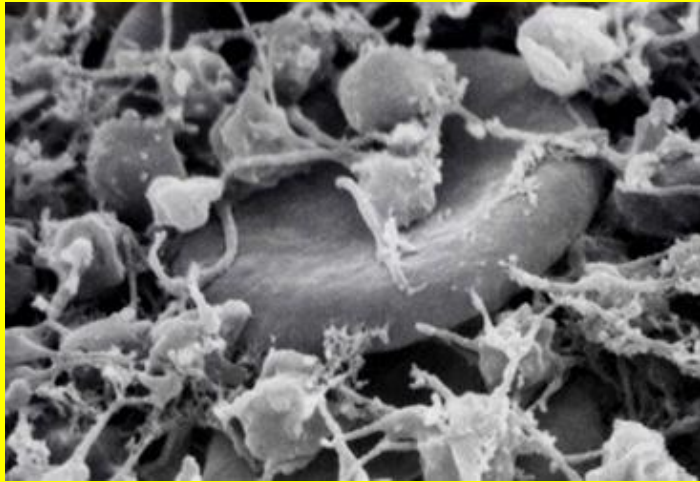


# Červené krvinky/ Erythrocyty

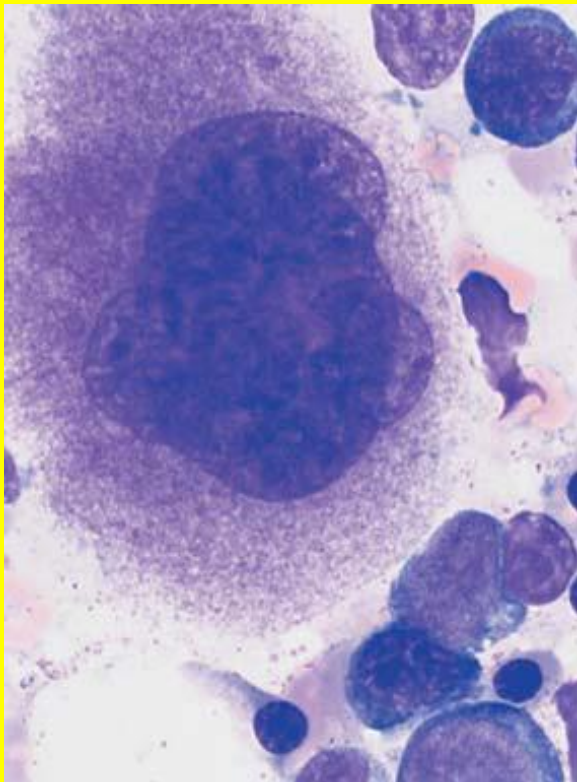


- transport dýchacích plynů – žíly, cévy
- bez organel, povrchové antigeny - krevní skupiny
- krevní barvivo hemoglobin (Hb)
- bikonkávní tvar – převaha povrchu nad objemem
- muži  $4,3-5,3 \times 10^{12} / L$  ( $4,3-5,3 \times 10^6 / \mu l$ )
- ženy  $3,8-4,8 \times 10^{12} / L$  ( $3,8-4,8 \times 10^6 / \mu l$ )
- 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

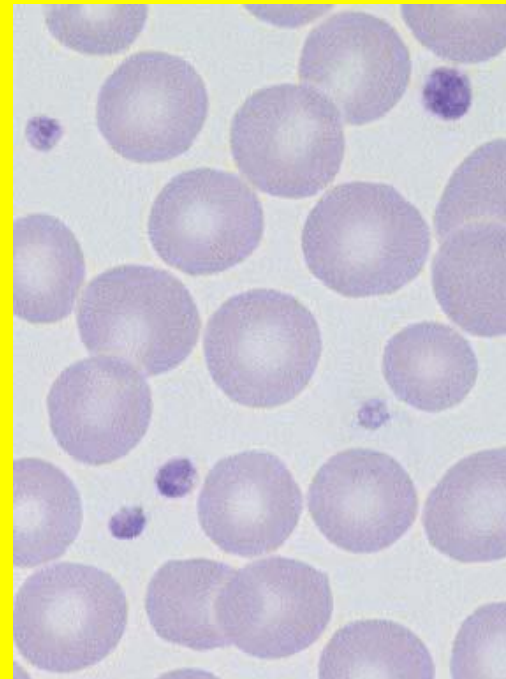
# Krevní destičky (trombocyty)



- ochrana před ztrátou krve
- bezjaderné
- hladké nepravidelné disky
- **150-300 x 10<sup>9</sup> / L krve (150-300 x 10<sup>3</sup> /μl)**
- tvorba stimulována – **trombopoetinem (TPO)** (glykoproteinový hormon)
- **hemostáza** = zástava krvácení
- zdroj energie - glukosa

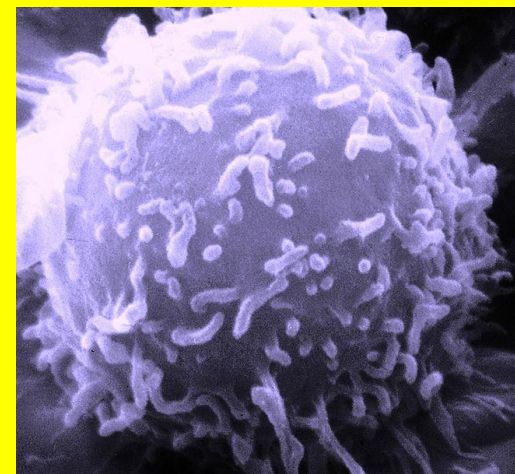


Megakaryocyt ve smíru kostní dřeně. Zakalená granulace je znak nastávající tvorby destiček



Normální hustota trombocytů mezi Ery

# Bílé krvinky / Leukocyty



- obrana organismu = imunita

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

- neutrofilní granulocyty – fagocytóza

- eosinofilní granulocyty – fagocytace alergen+protilátka

- basofilní granulocyty – uvolnění histaminu při alergických reakcích

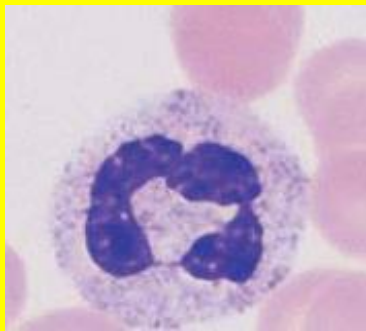
- monocyty – přeměna na makrofágy = fagocytóza, APC

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

- lymfoidní orgány – slezina, kostní dřeň, mízní uzliny

- imunita - nespecifická = vrozená – profesionální fagocyty

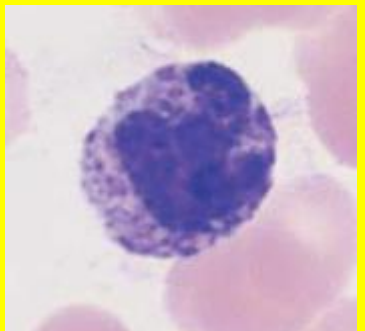
- specifická = získaná – (APC) a maturace lymfocytů



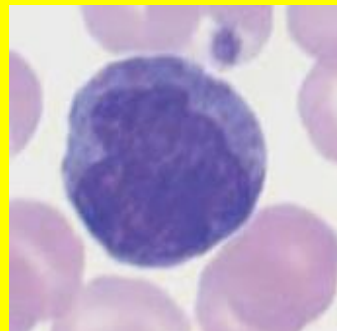
Neutrofil



Eosinofil



Basofil



Monocyt



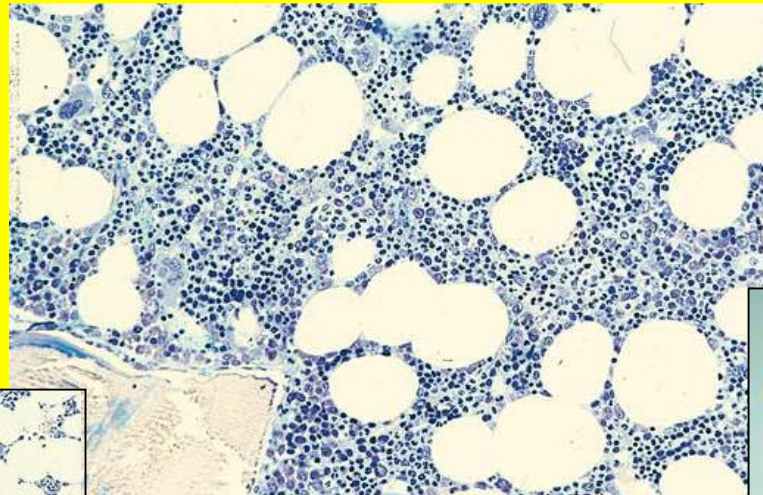
Lymfocyt



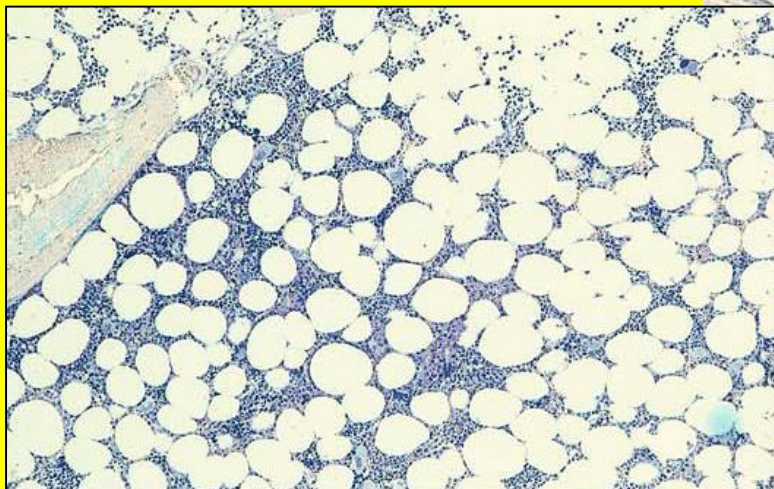
# Kostní dřeň I.

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

- fibroblasty
- makrofágy
- adipocyty
- osteoblasty
- osteoklasty
- endoteliální buňky



Red marrow



Yellow marrow





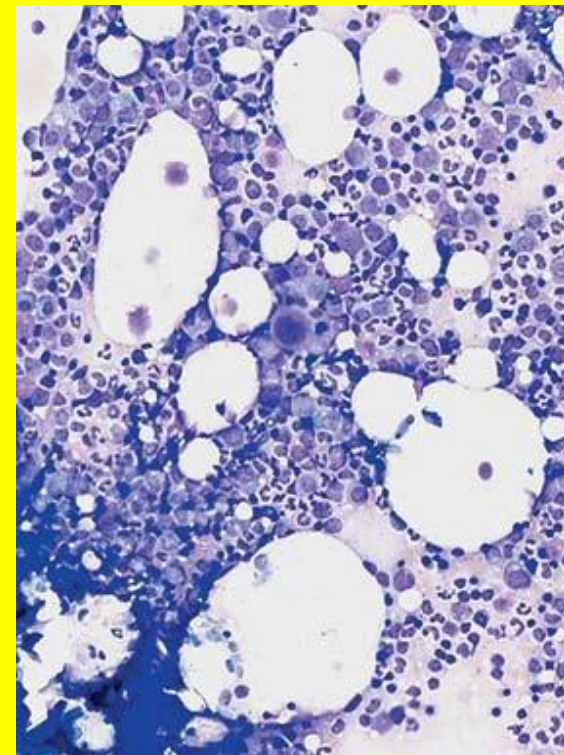
# Kostní dřeň II.

- 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 + částičky KD



Normální cytologie kostní dřeně

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

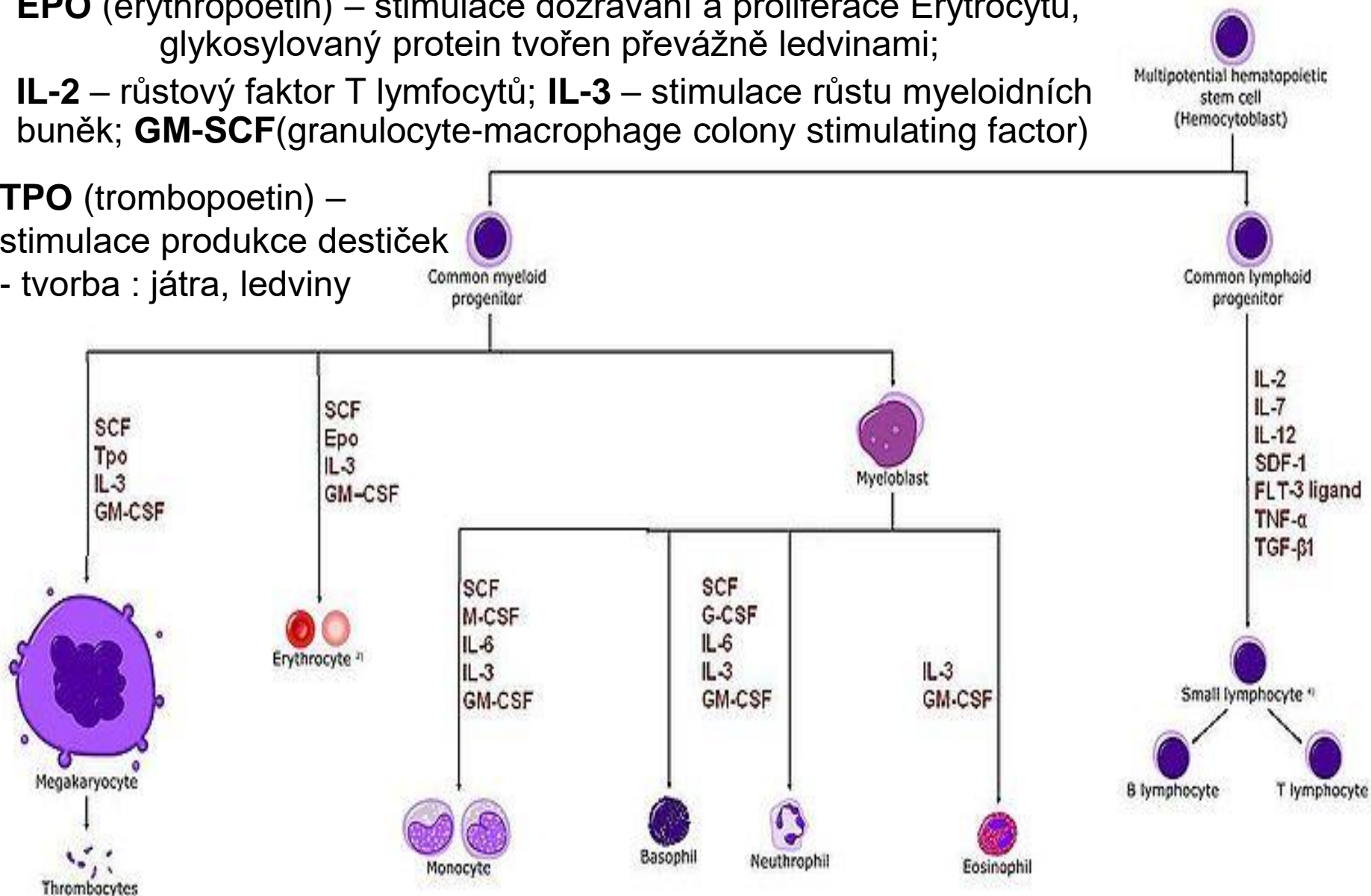
# Hemopoetiny

= **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:

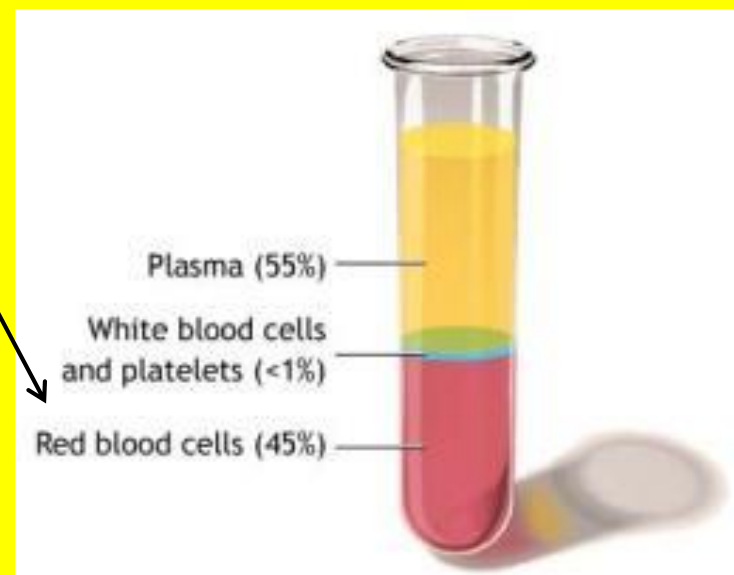
- **Hemoglobin** – oxidace  $\text{CN}^-$  na kyanmethemoglobin  
→ spektrofotometricky 540 nm
- **střední buněčný objem (MCV** – mean corpuscular volume) (fl),
- **počet Erytrocytů**

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)

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

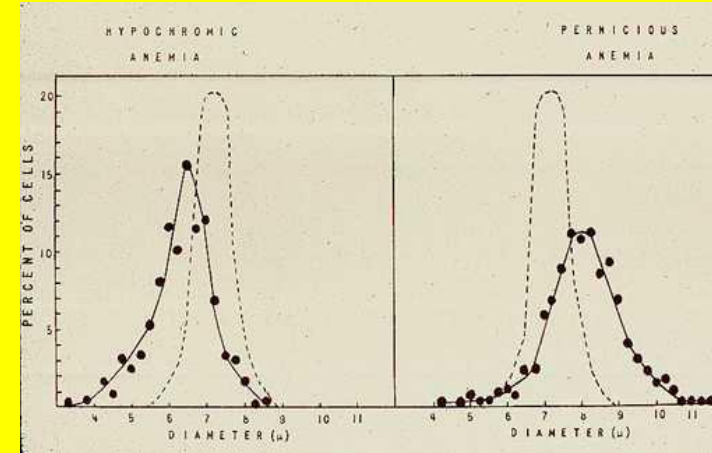
$\text{MCHC (g/dl)} = \text{Hb (g/dl)} / \text{HCT}$



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



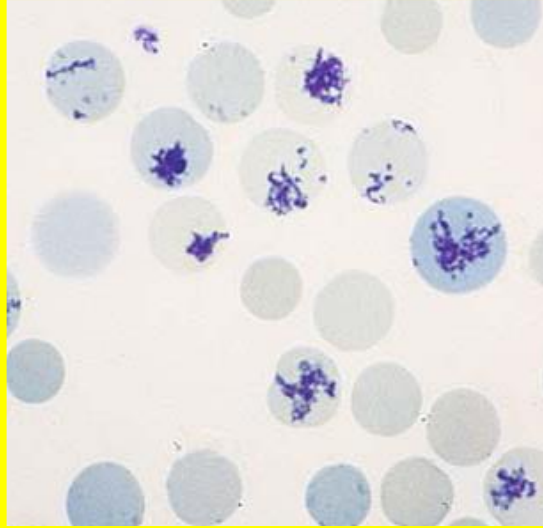


# Algoritmus procedur v hematologii

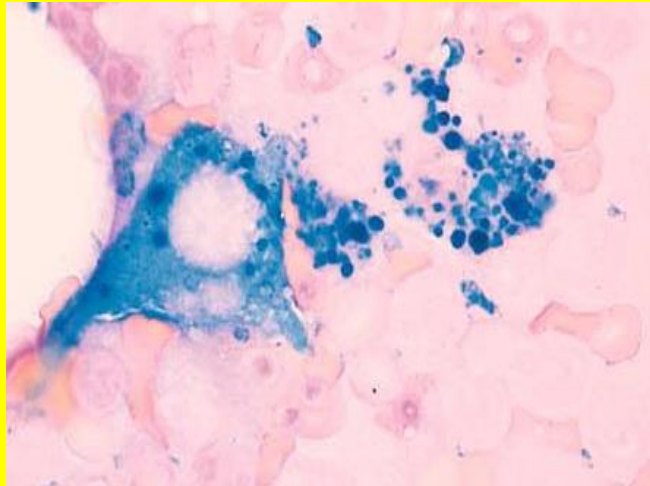
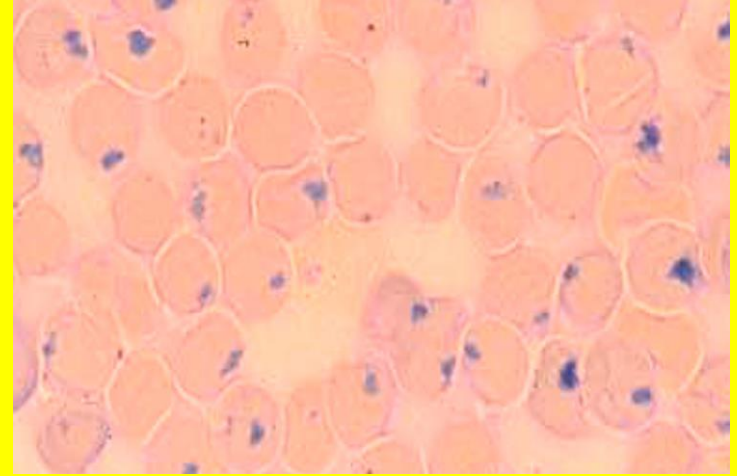
- 1) Kvantitativní určení počtu leukocytů, erytrocytů a destiček (CBC)
- 2) Diferenciální počet (DBC) – změny v počtu Erytrocytů, Leukocytů, Thrombocytů (zvětšené mízní uzliny, splenomegalie) – změny v zastoupení leukocytů
- 3) Morfologie erytrocytů
- 4) Po zvážení stavu pacienta a dosud získaných výsledků – 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)

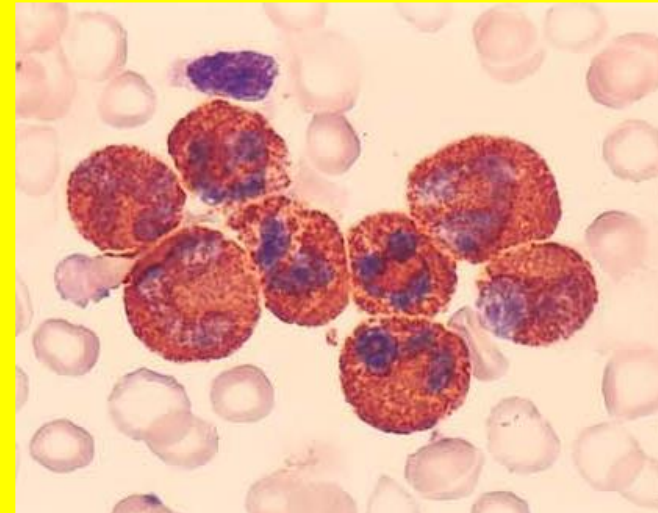


**- Heinzova tělíska (Nile blue sulfate) – shluky Hb v Ery**

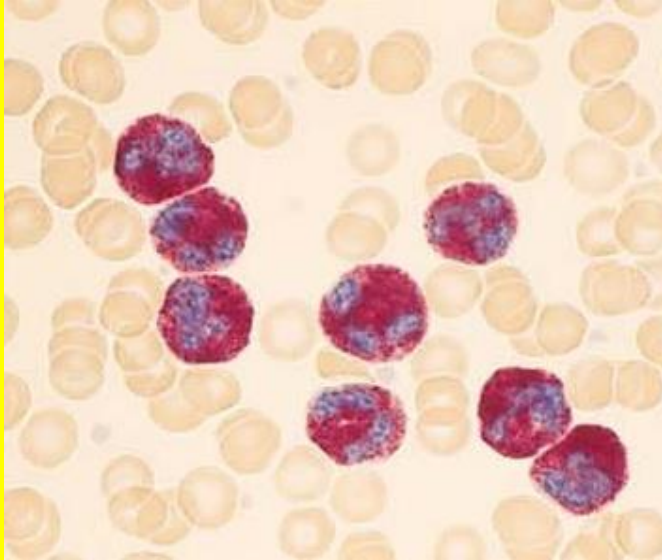


**Barvení Fe<sup>3+</sup> Berlínskou  
modří – železo v  
cytoplasmě makrofága**

**Peroxidasová reakce**  
(benzidine/  
diaminobenzidine  
+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)  
**- neutrofilů,  
eosinofilů**

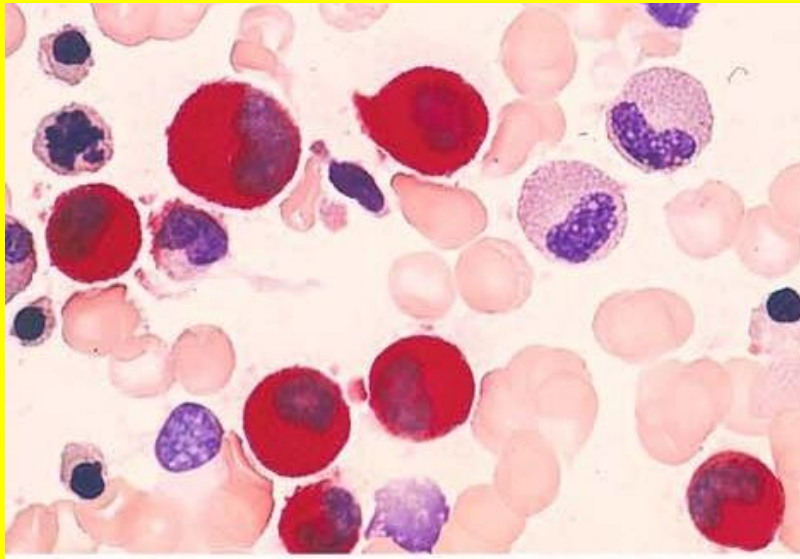


# Chemické / Enzymatické Markery krvinek II.

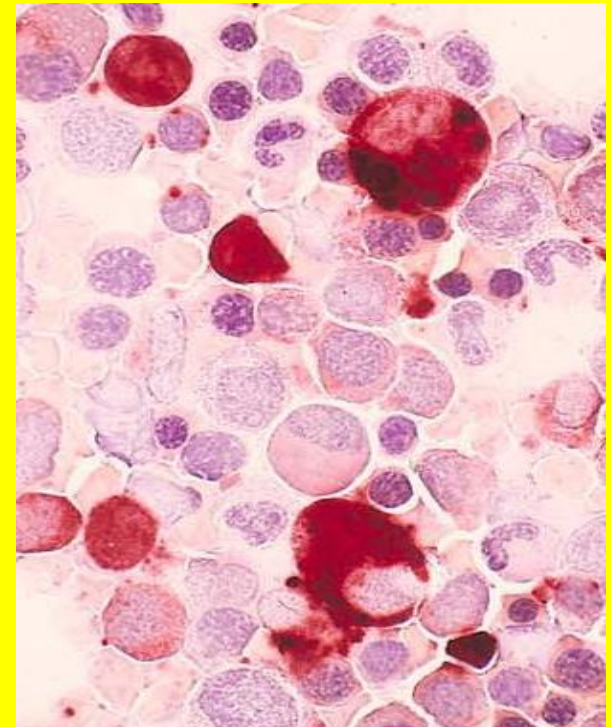


- **Leukocytová ALP** (naphtyl fosfát+ veronal sodný + variamine blue salt B) – **neutrofily** (znak vyžrálých buněk)

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



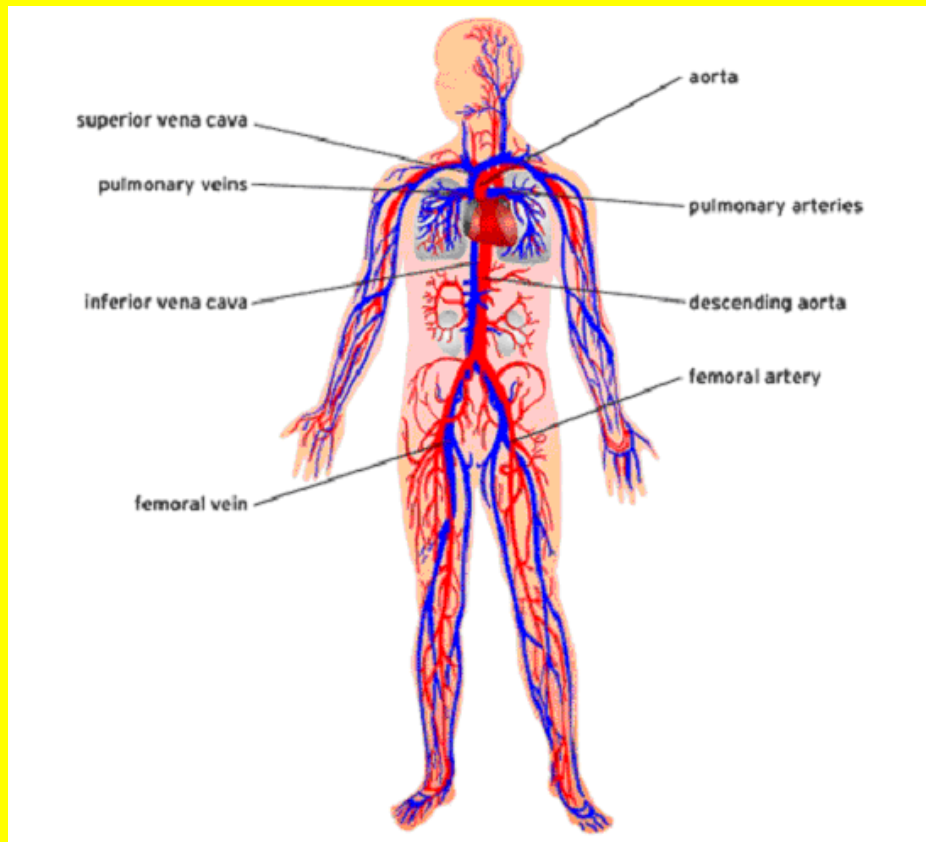
- **Naftol AS-D chloracetát esterasa (CE)** – neutrofily (+), eosinofily (-)



# A slovo závěrem...



**Zdraví**



**Nemoc**

**Porozumět Hematologii = správně diagnostikovat**