# Základy Hematologie
# KBB / ZHEMP

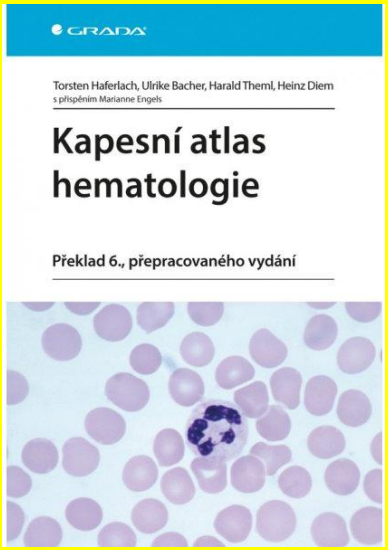
## *Lekce 1*

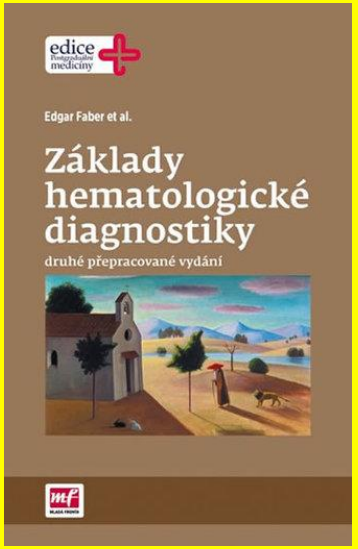
**Radim Vrzal**

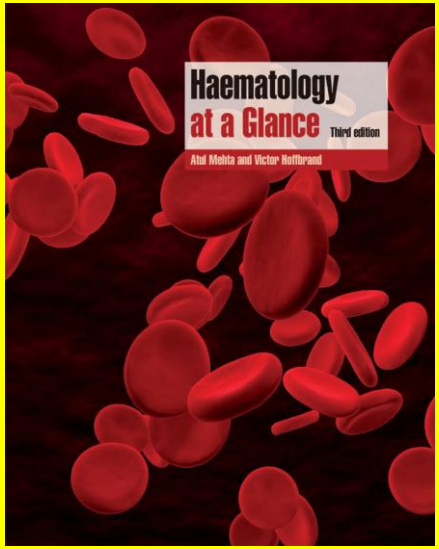
***radim.vrzal@upol.cz***

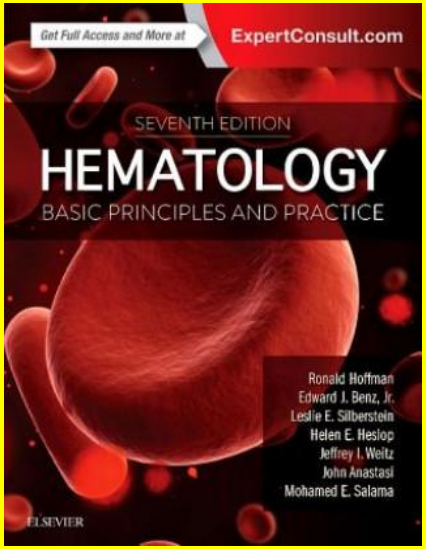
**Katedra buněčné biologie a genetiky, budova 51**

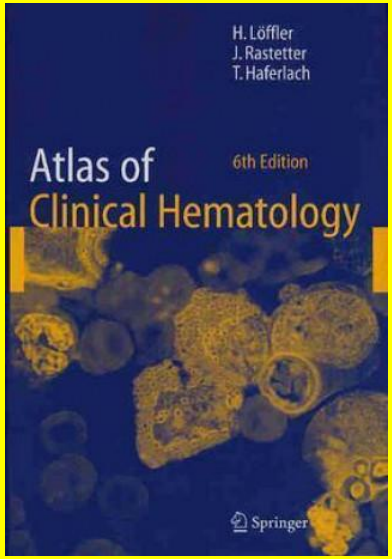
# Zdroje, z kterých čerpám:

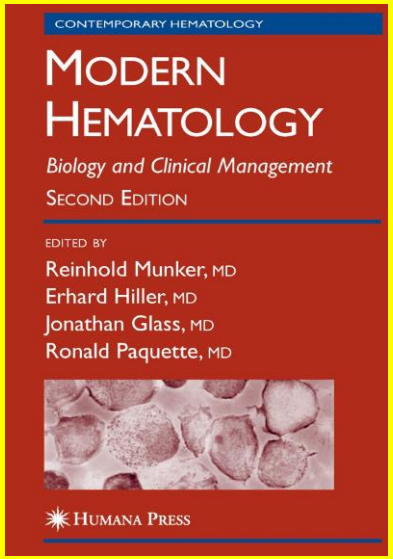


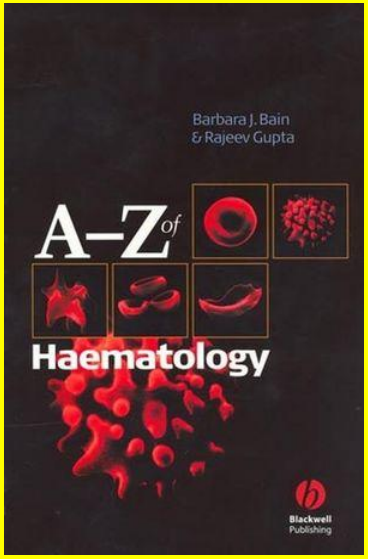



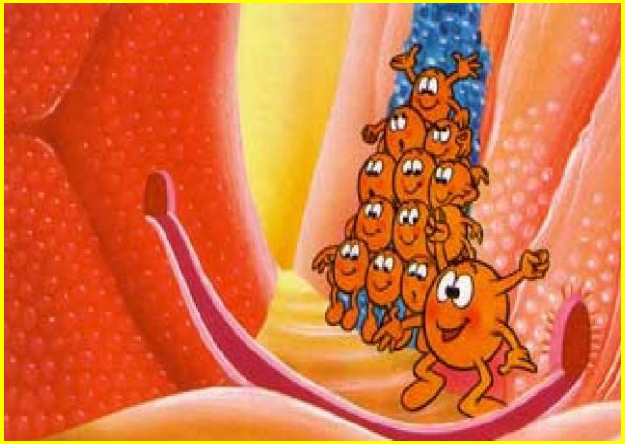



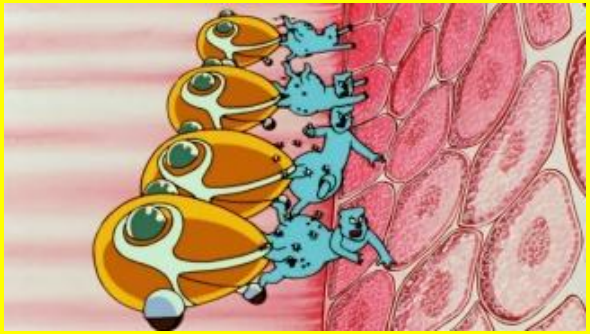



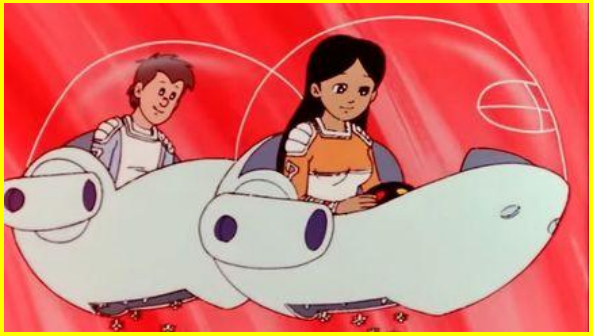




..a jiné knihy, publikace

# 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

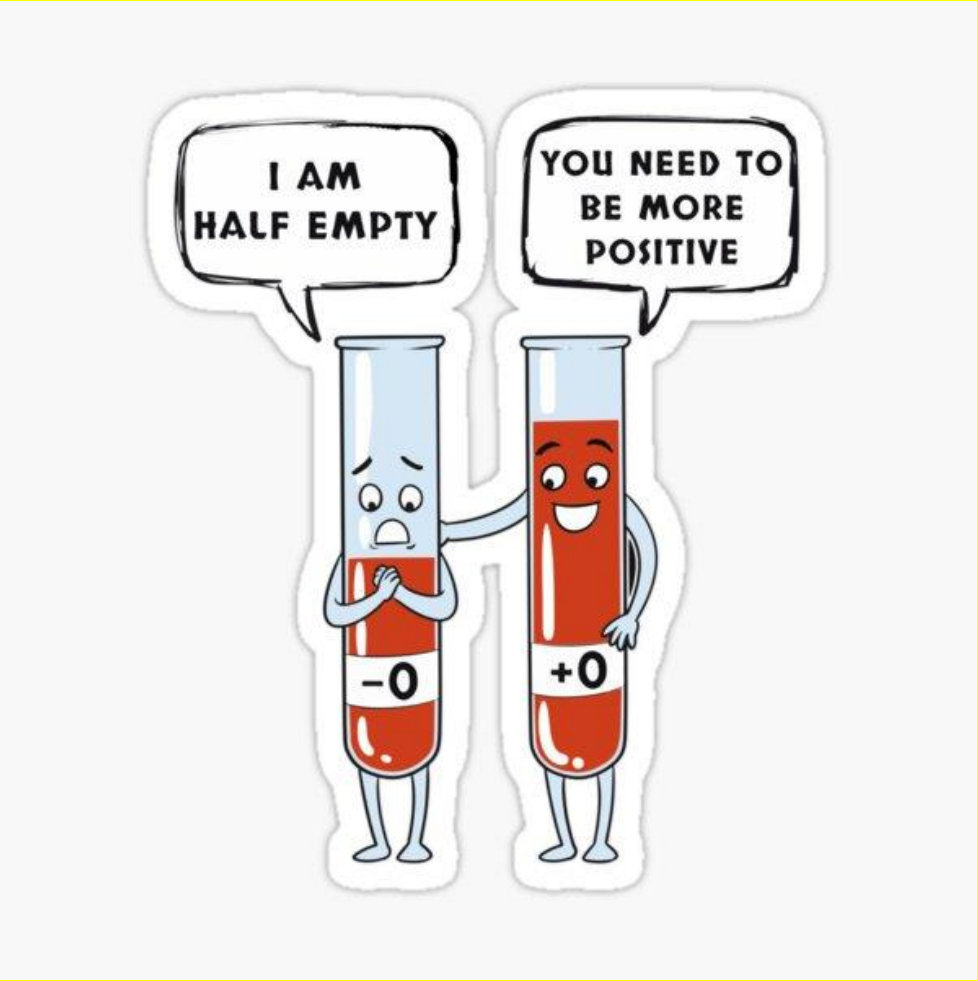
- Princip „extra míle“

- Slabí zhynou

⇓

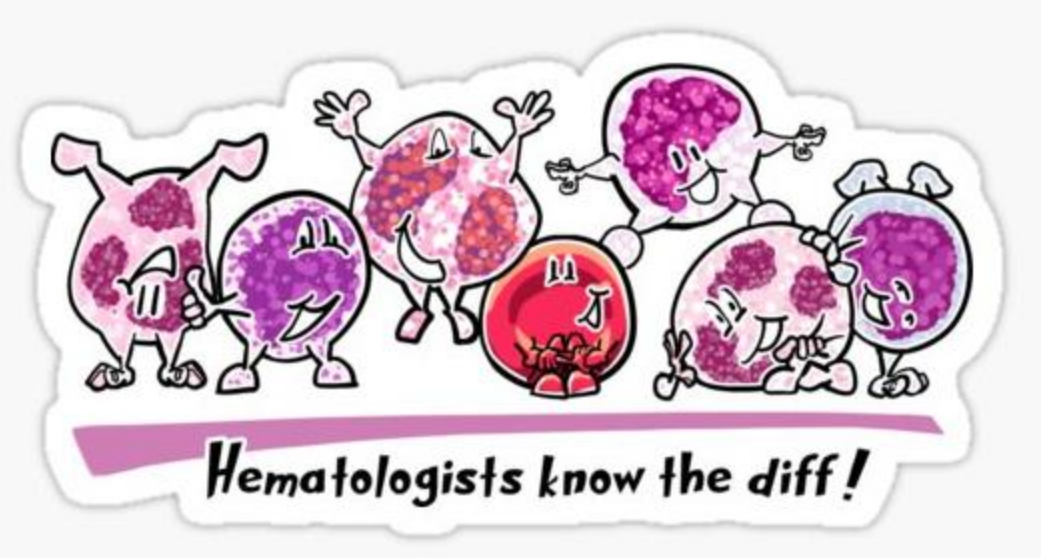
**Otázka: Stojí mi to za to ???**

# Začínáme….



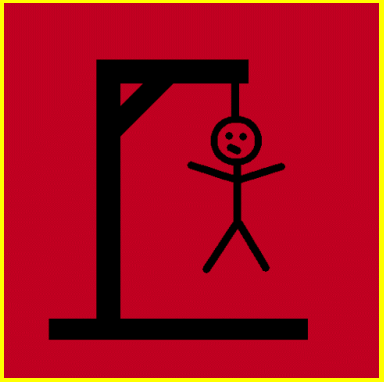
**Co je Hematologie ? – obor zabývající se studiem krve, krvetvorných orgánů a krevních onemocnění** (ř.s. *haima* = krev, *logos* = slovo, rozmluva)

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




**Drobné rozdíly jsou klíčové !**

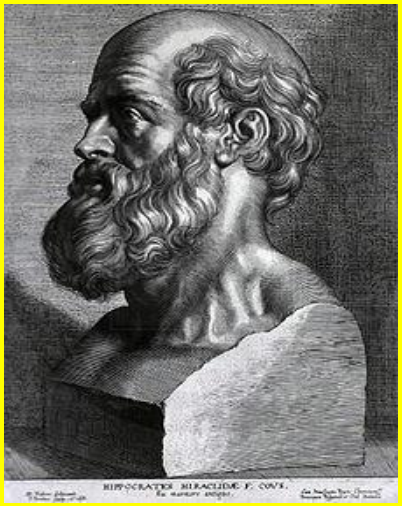
# Trocha historie …..



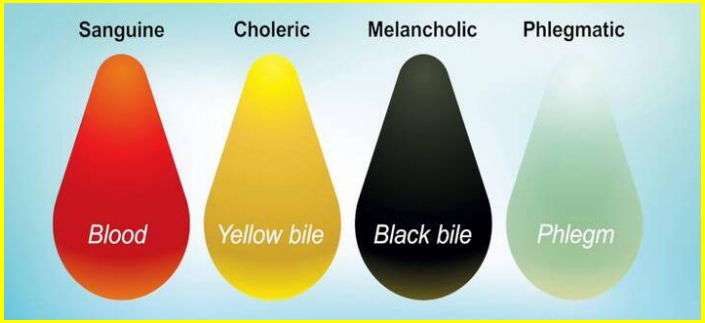
**<u>Starověký Egypt, Řecko</u> – pouštění žilou „blood letting“** (někdy prospěšné, snížení hypertenze)

**Dnes: flebotomie – „prořízнutí žíly“**

**– hemochromatosa, polycytemie**



**- <u>460-377 př.Kr</u>. – 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**

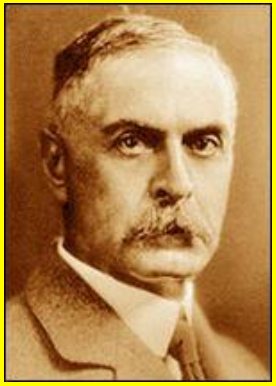
**1662**
**Johann Daniel Major – první intravenosní injekce člověku**

**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**

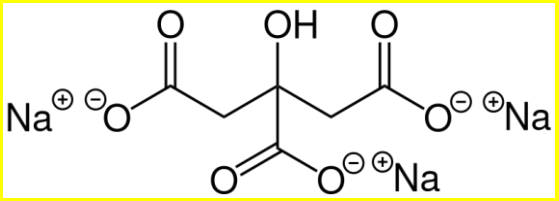
**1877**
**Paul Ehrlich**
**barvení krevních buněk**



**1901**

**Karl Landsteiner**

**identifikace krevních skupin**




**1914**

**citrát sodný**

**zabraňuje srážení krve**

(skladování krve)

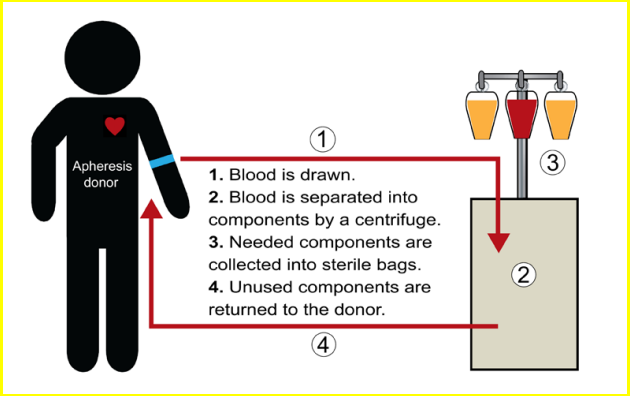
**1936**

**vznik první krevní banky**

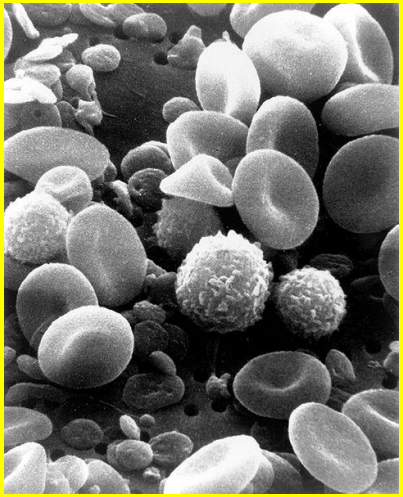
(Chicago, USA)

**2.polovina 20 st.**

**použití antihemolitických faktorů, afarézy, klinické použití G-CSF, IL3, atd.**



# Co to je KREV ?

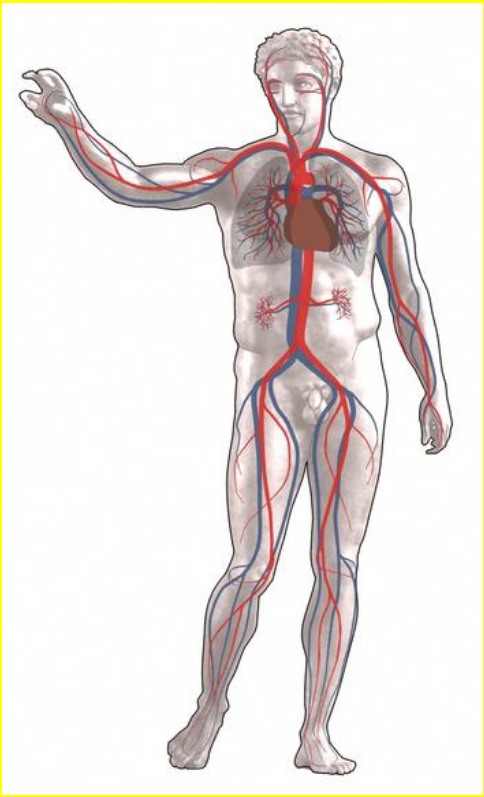


## = Suspenze krevních elementů v plazmě

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



## Význam krve = Spojuje všechny orgány a těle ➔ udržuje homeostázu

## Funkce krve

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

# 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

$$CO_2\ (g) \rightleftharpoons CO_2\ (l) + H_2O \underset{\text{karbonáthydrolyasa}}{\rightleftharpoons} H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

pH dle Henderson-Hasselbachovy rovnice:

$$pH = pKa + \log [HCO_3^-]/[H_2CO_3],\ [H_2CO_3] = \alpha * pCO_2$$

$\alpha$ – koeficient rozpustnosti plynu v plazmě (z Henryho zákona),
$[H_2CO_3]$ = 0,224 mmol/l.kPa * 5,33 kPa = 1,2 mmol/l; pKa = 6,1 (37°C)

## 2) Hemoglobinový (erythrocyty)

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

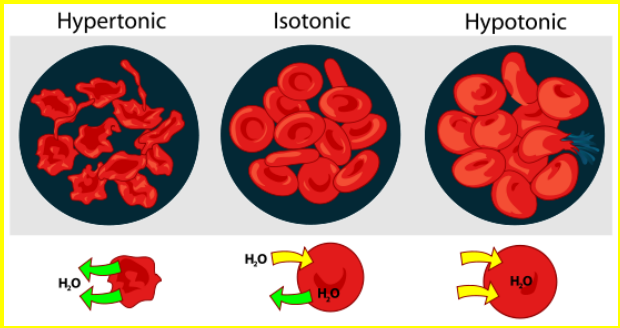
(protonizace koncového His v $\beta$-řetězcích)

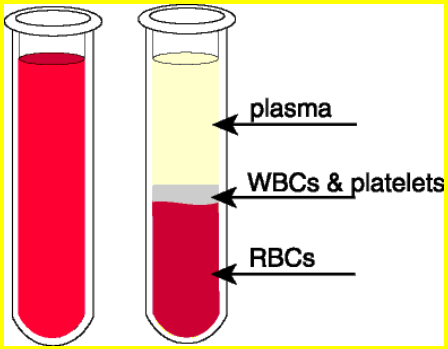
**3) Proteinový – disociace postranních řetězců,** malý význam
**4) Fosfátový – nízká koncentrace $PO_4^{3-}$ ,** malý význam, uplatnění v moči

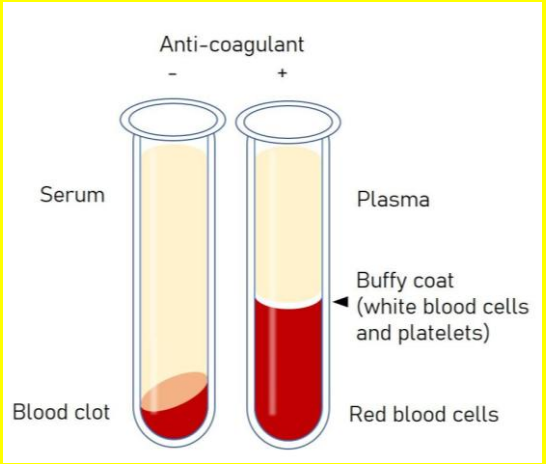
# Co to je plazma?

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

- **Sérum** (lat.*serum* = syrovátka) **= plazma bez fibrinogenu či faktorů krevní srážlivosti**
- **pH ~7,4 ( c($H^+$) = 40 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?

Mořská voda = cca 2,7% NaCl
(Mrtvé moře ~ 30%)

**Vaše plazma ~ 0,73% NaCl**

## Anorganické ionty:

**$Na^+$** - 136-148 mM - udržení stálého osmotického tlaku

**$Cl^-$** - 95-110 mM - udržení osm.tlaku, tvorba HCl

**$HCO_3^-$** - 22-26 mM - transport $CO_2$, pufrovací systém

**$K^+$** - 3.7-5 mM - excitabilita svalů a nervů

**$Mg^{2+}$** - 0.66-0.94 mM - tlumivé účinky na nervovou dráždivost, nezbytný pro enzymy

**$Ca^{2+}$** - 2.15-2.61 mM - srážení krve, nervosvalový přenos

**$PO_4^{3-}$** - 0.6-1.4 mM - pufrovací systém

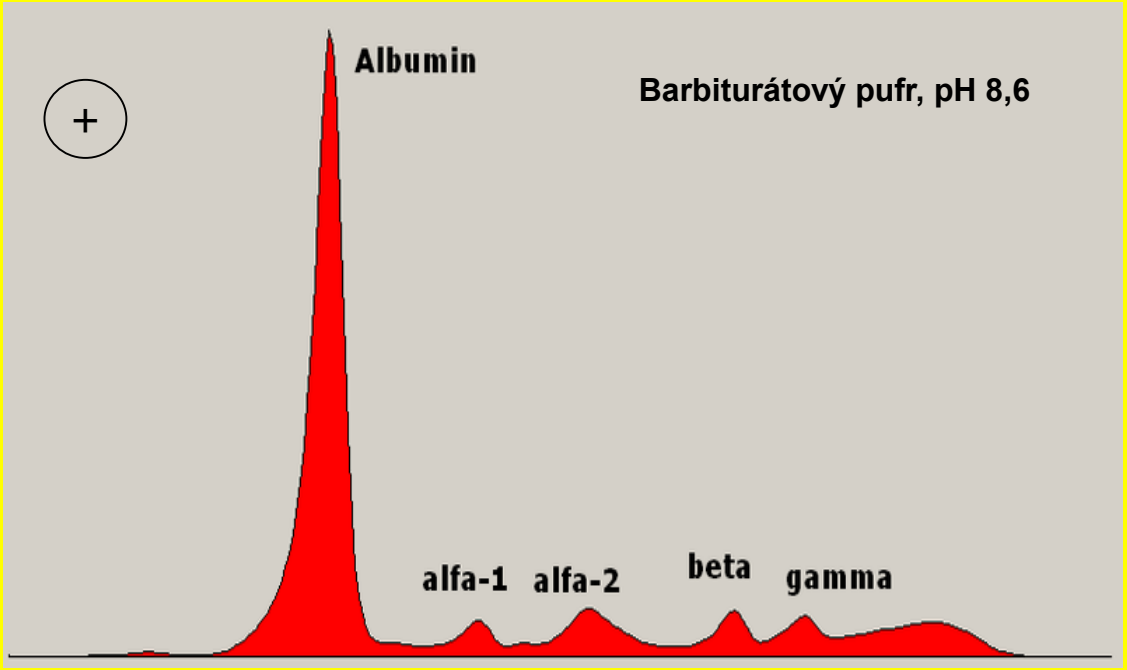
**Fe** - 10-27 μM - tvorba Hb, součást enzymů

**$I^-$** - 275-630 μM - tvorba hormonů štítné žlázy

**$Cu^{2+}$** - 12-22 μM - součást enzymů, krvetvorba

# 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



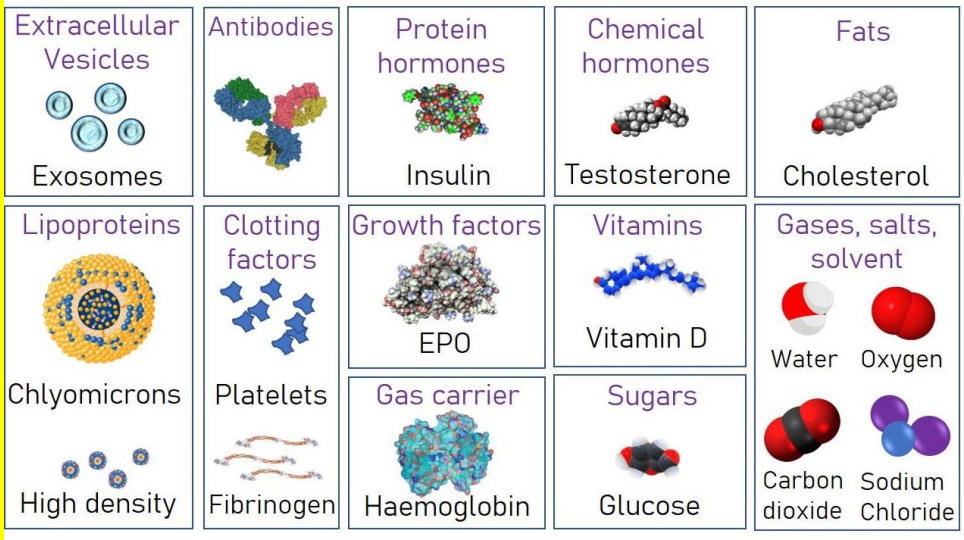

- diagnostický význam (ALP, AST, ALT)

# Krevní plazma IV.

**Funkce bílkovin:**

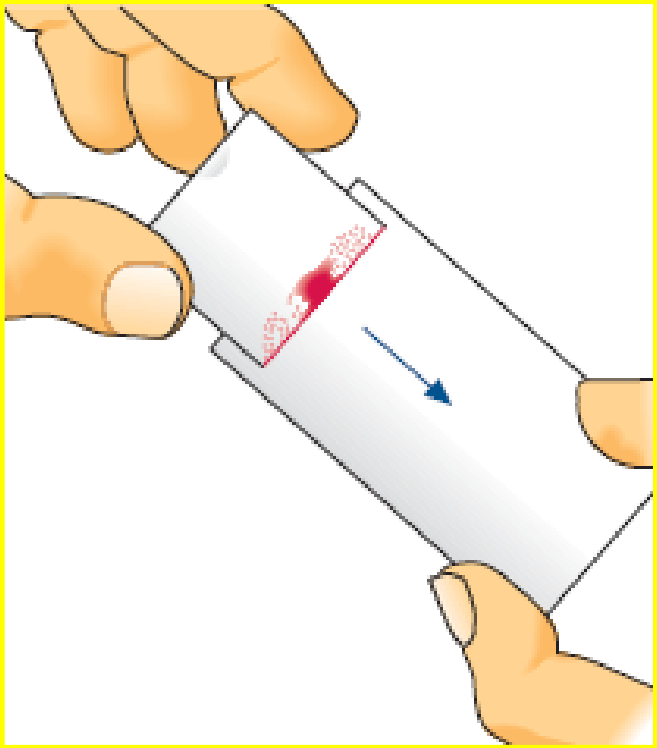
- **udržování stálého objemu plazmy**
- **onkotický tlak / ztráta proteinů ➔ edém**
- **transport** – **albuminy** (transport bilirubinu, mast.kyselin, léků; T3, T4, vit.A), **apolipoproteiny** (TGA, cholesterol), **transferin** (Fe), **ceruloplasmin** (Cu), transkortin (Cortisol), transkobalamin (B12), hemopexin (hem)
- **udržování izohydrie** – slabé kyseliny vážící $H^+$
- **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)

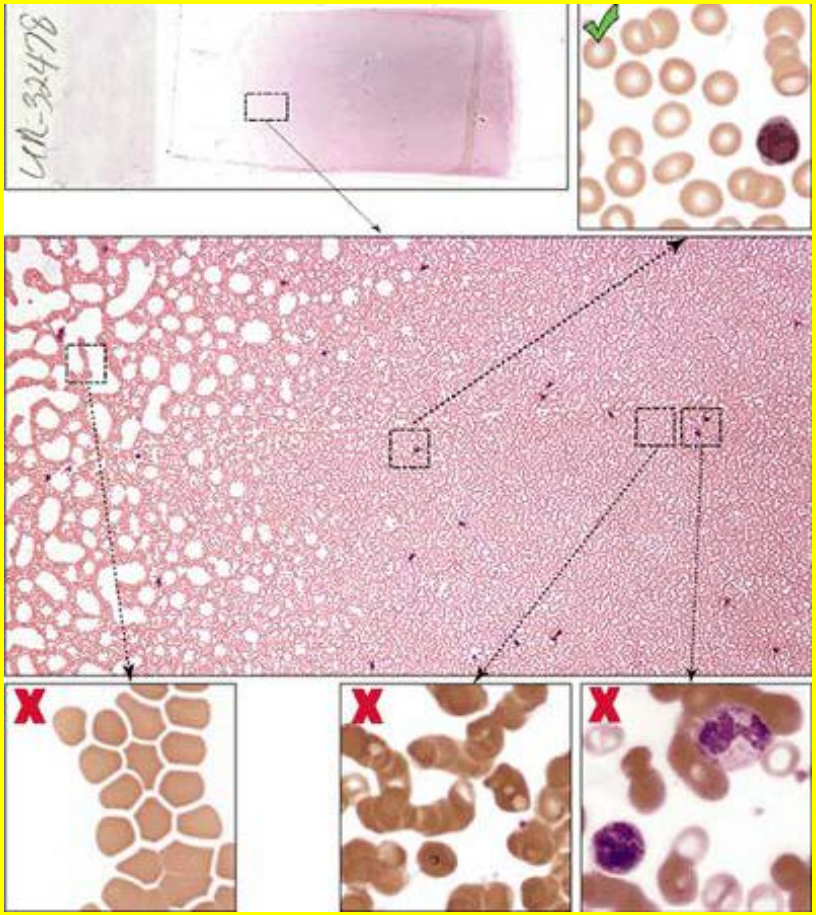
- Kapilární / venózní krev do EDTA-zkumavky NE více jak 3 h stará
  - sklíčka umytá v roztoku ethanol : ether = 1:1 (odmaštěná)
  - nátěr musí zaschnout, vhodná fixace methanolem
  - barvení : **Papenheimova** metoda panoptického barvení



Provedení krevního stěru

Správně nabarvený nátěr

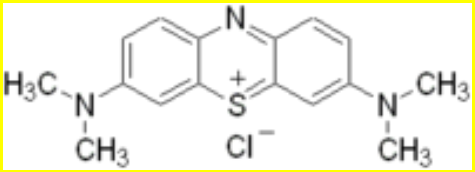
**růžový**



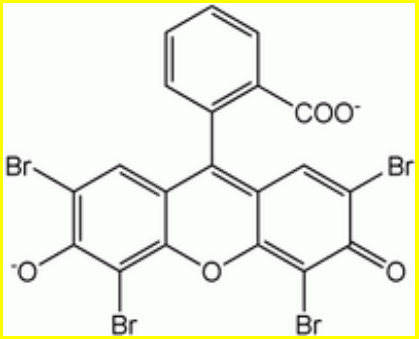
# Krevní nátěr (blood smear) II.

## Pappenheimovo panoptické barvení:

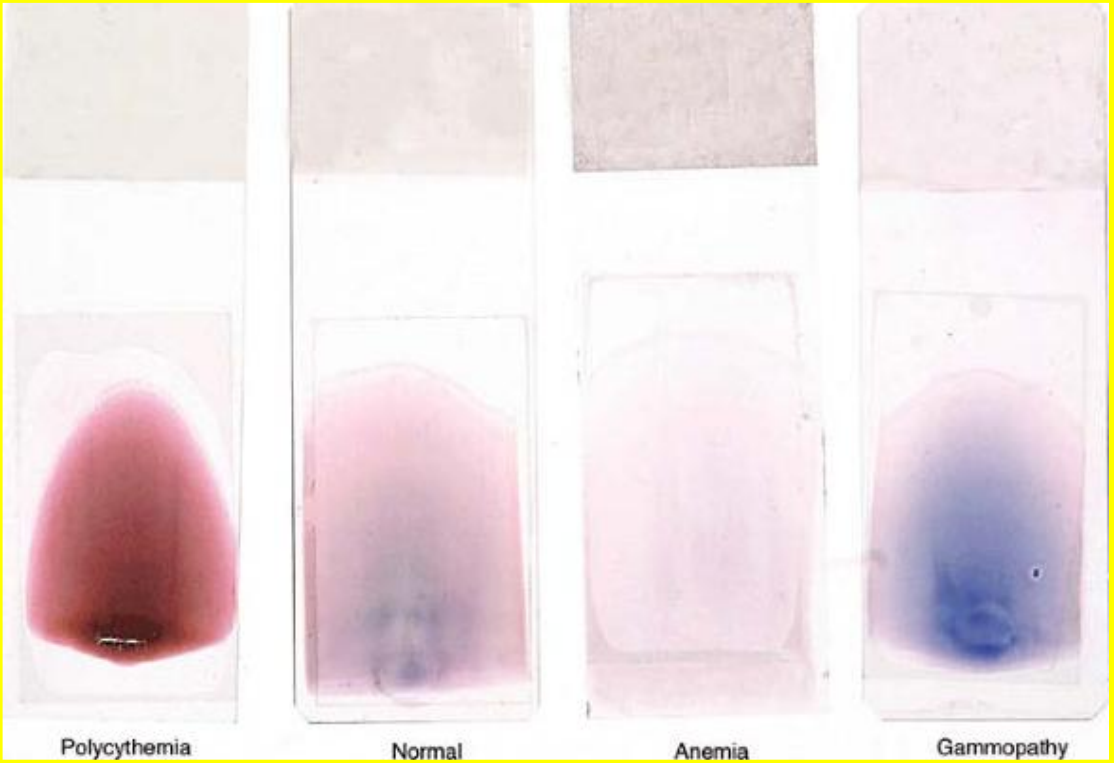
- barvící roztok **May-Grünwald** (**E**osin-**M**ethylene **B**lue)
- fosfátový pufr, pH 7.3
- zředěný **Giemsa** (Azur-eosin)
- fosfátový pufr pH 6.8-7.4



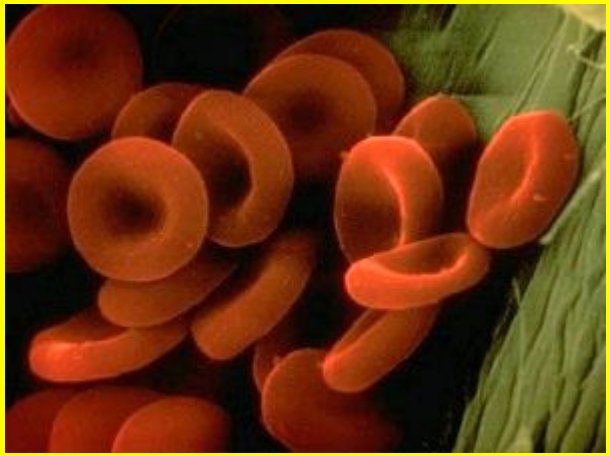

MB – zásaditý, modrá až fialová barva, afinita ke kyselým komponentám buňky (DNA/RNA, granuly basofilů s heparinem )

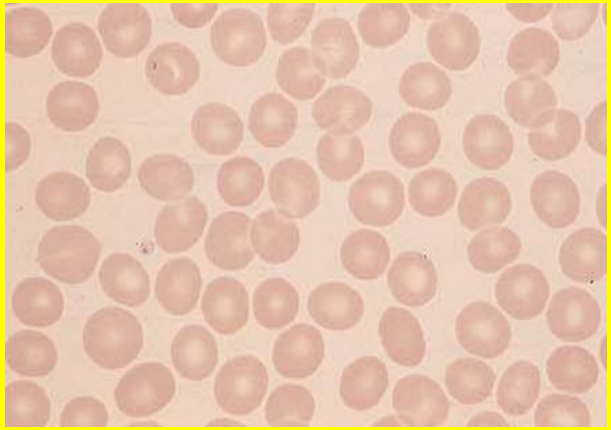



Eosin – kyselý, červené až oranžové zbarvení afinita k alkalickým složkám buňky (proteinům, Hb, granuly eosinofilů se sperminem)



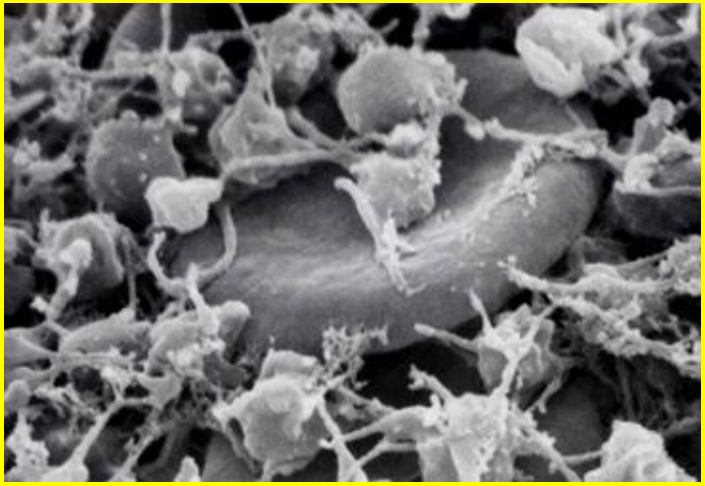
# Červené krvinky/ Erythrocyty



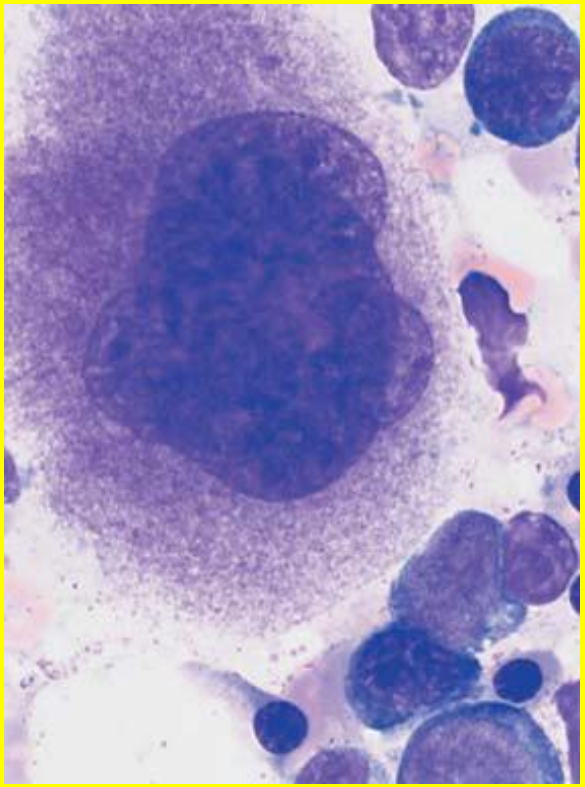


- transport dýchacích plynů – žíly, cévy
- bez organel, povrchové antigeny - krevní skupiny
- krevní barvivo hemoglobin (Hb)
- bikonkávní tvar – převaha povrchu nad objemem
- muži 4,0 - 5,8 x $10^{12}$ / L (4,0 - 5,8 x $10^{6}$ /µl)
- ženy 3,8 - 5,2 x $10^{12}$ / L (3,8 - 5,2 x $10^{6}$ /µl)
- normocyty, 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

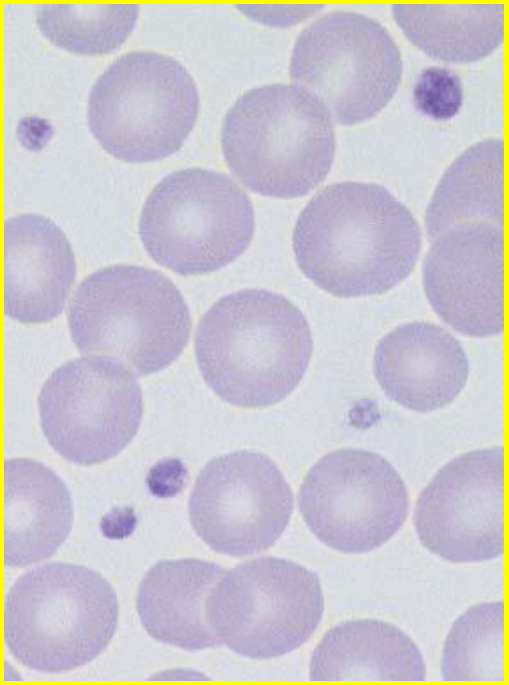
# Krevní destičky (trombocyty)



- ochrana před ztrátou krve
- bezjaderné
- hladké nepravidelné disky
- 150 - 400 x $10^9$ / L krve (150 - 400 x $10^3$ /µl)
- tvorba stimulována – trombopoetinem (TPO) (glykoproteinový hormon)
- hemostáza = zástava krvácení
- zdroj energie - glukosa

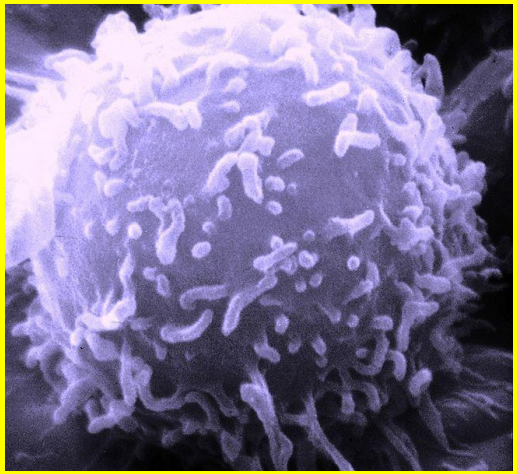


Megakaryocyt ve smíru kostní dřeně. Zakalená granulace je znak nastávající tvorby destiček

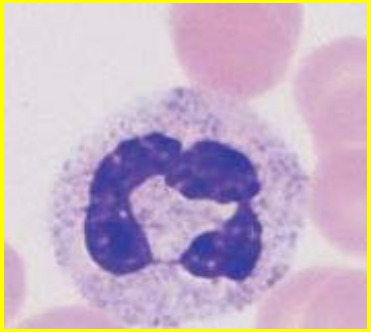


Normální hustota trombocytů mezi Ery

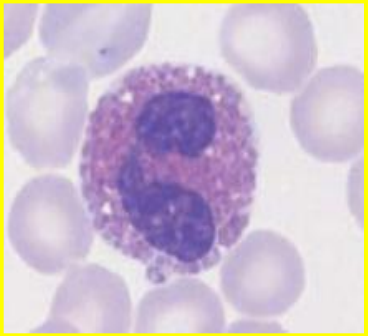
# Bílé krvinky / Leukocyty



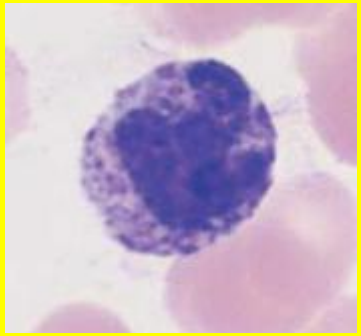
- obrana organismu = imunita
  - 4 - 10 x $10^9$ / L krve (4 - 10 x $10^3$ / µl)
  - neutrofilní granulocyty – fagocytóza
  - eosinofilní granulocyty – fagocytace alergen+protilátka
  - basofilní granulocyty – uvolnění histaminu při alergických reakcích
  - monocyty – přeměna na makrofágy = fagocytóza, 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



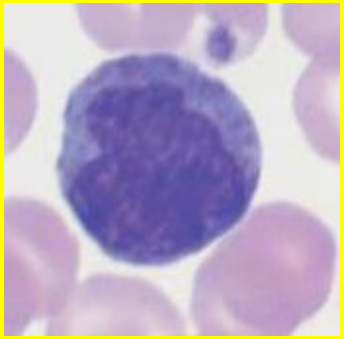
Neutrofil



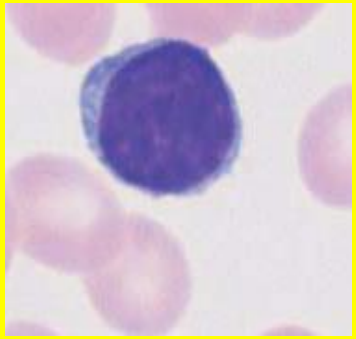
Eosinofil



Basofil



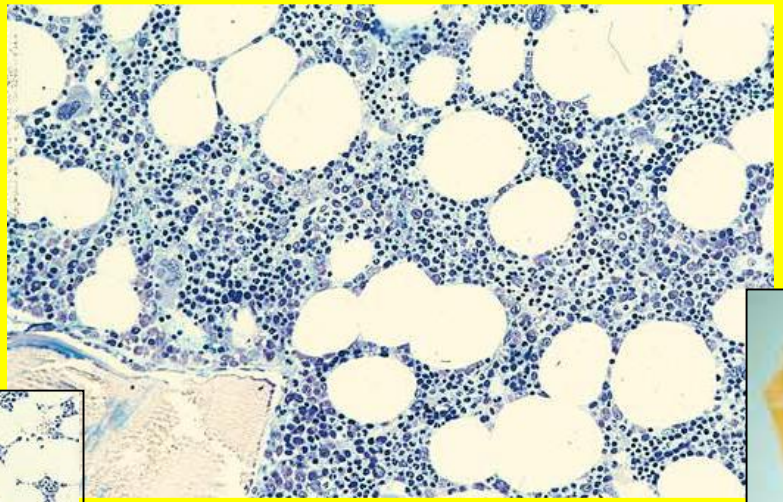
Monocyt



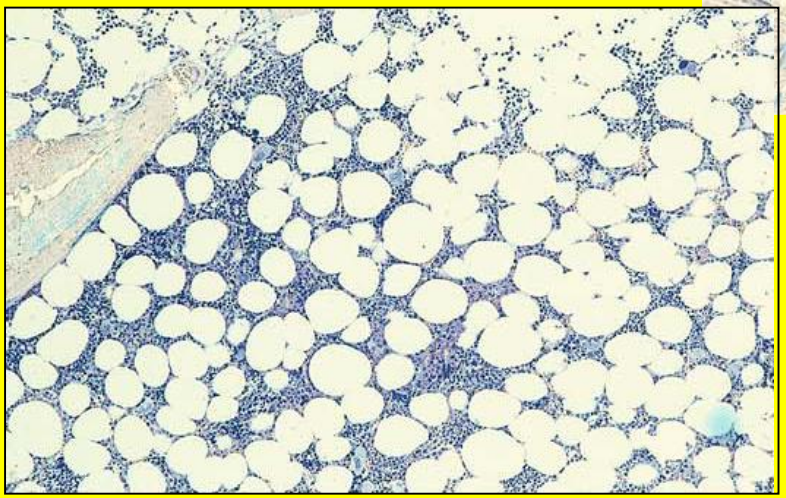
Lymfocyt

# Kostní dřeň I.

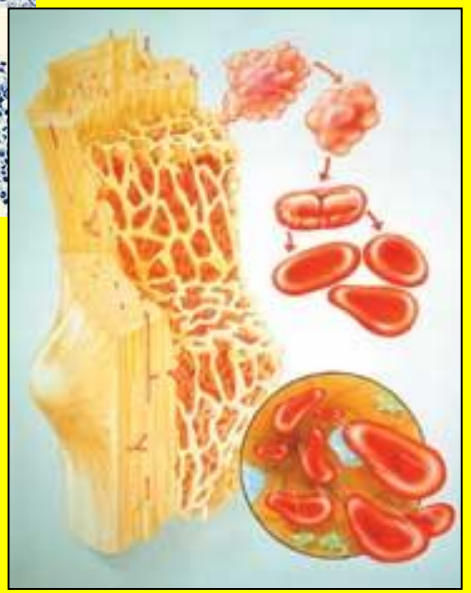
- Gelovitá tkáň - dutina kosti – místo efektivní hematopoesy
- Produkce asi 6 miliard buněk na kg hmotnosti denně
- Hematopoetická (červená) dřeň (Red marrow) a Žlutá dřeň (Yellow marrow)
- Hematopoesa v dospělosti - lebka, obratle, rameno, pánevní kosti, hrudní kost
- Hematopoesa – kontrola skrz stimulační / 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.

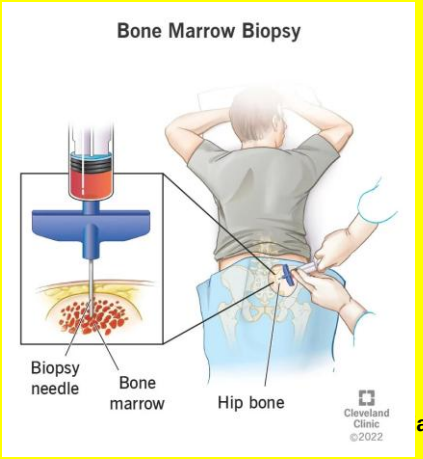
- **Extracelulární matrix – kolagen, fibronektin, hyaluronát, proteoglykany**
- **Přestup krvinek do krve – přes vrstvu endoteliálních buněk do sinusoid** (malé krevní cévky s diskontinuálním endotelem)
  - **Erytrocyty – po vypuzení jádra přes endotel do cév**
  - **Leukocyty – diapedézou**
  - **Trombocyty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

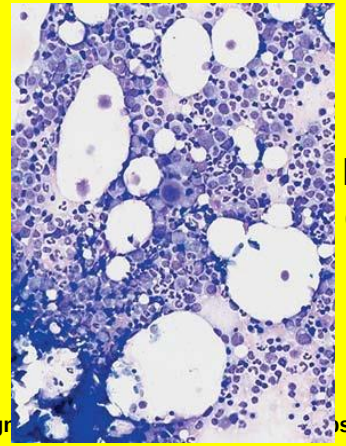
- **Punkce KD** - **proč?**

**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**

**- získá se aspirát = dřeňová tekutina + částečky KD**

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



Normální cytologie kostní dřeně

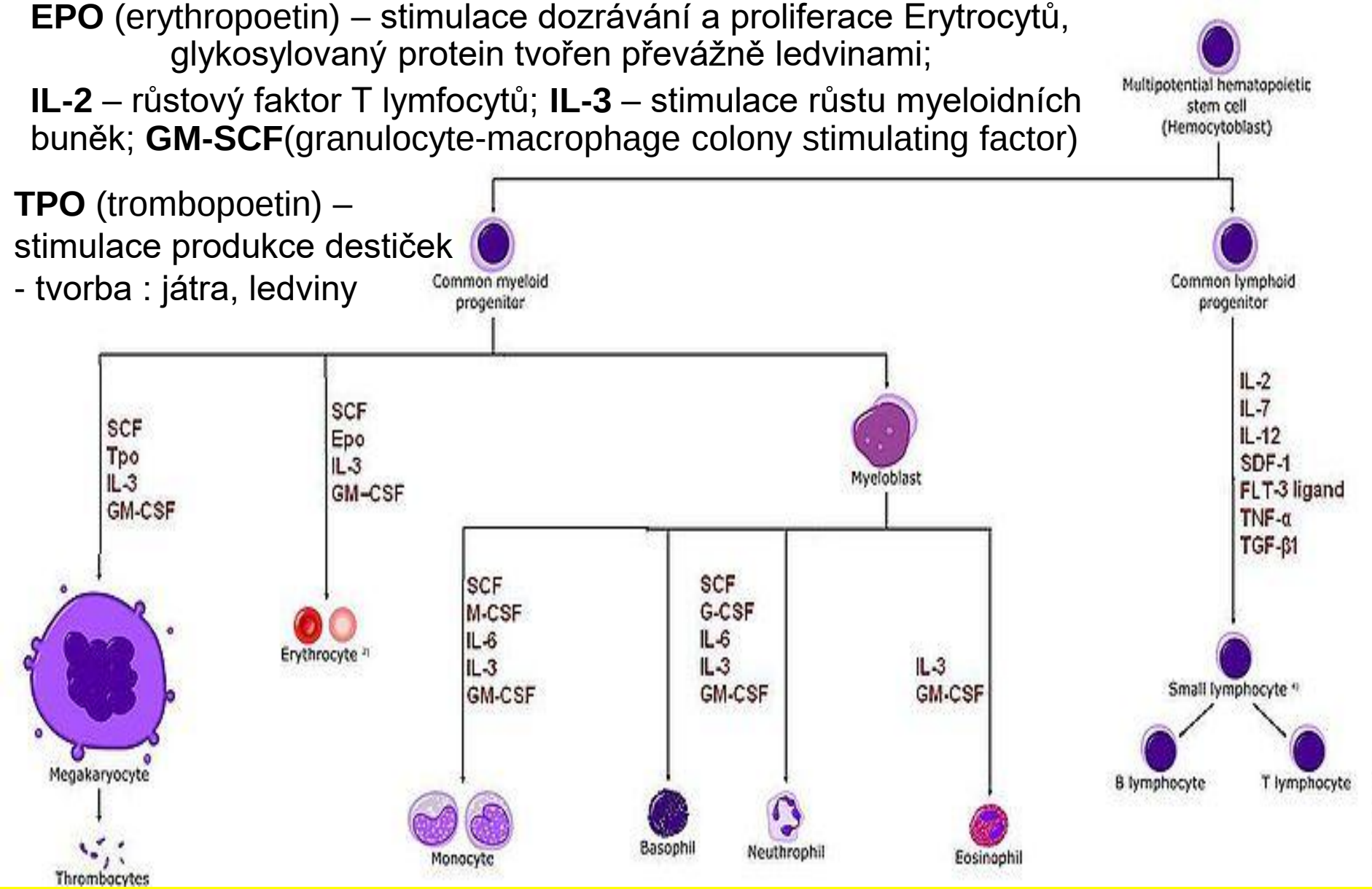
# Hemopoetiny

## = 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.

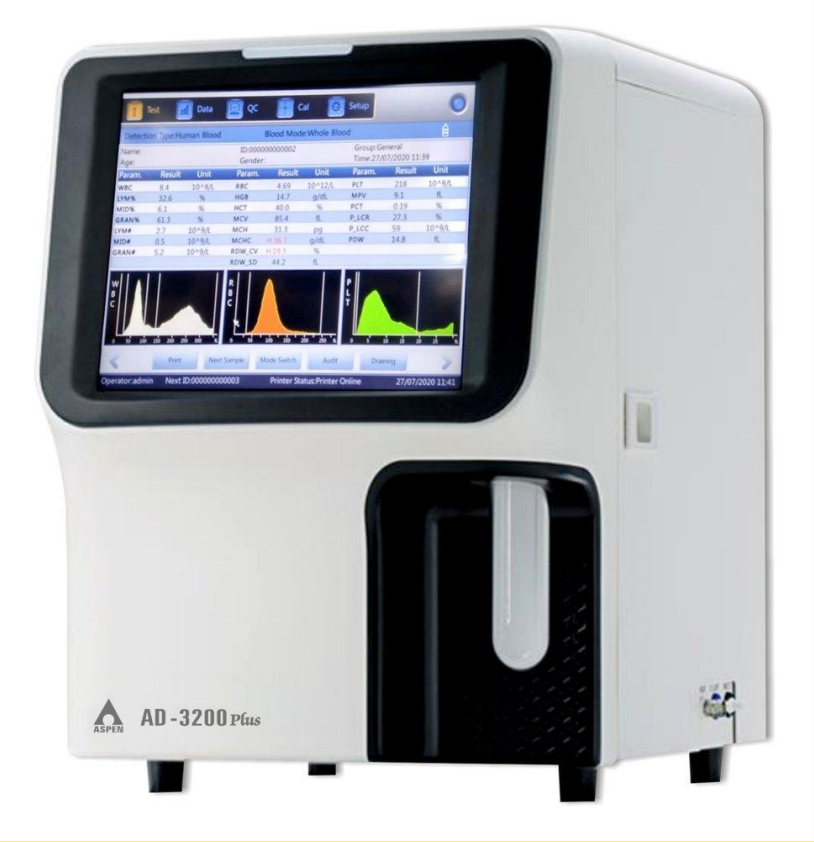
## Proč provádět odběr krve?

- **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:**

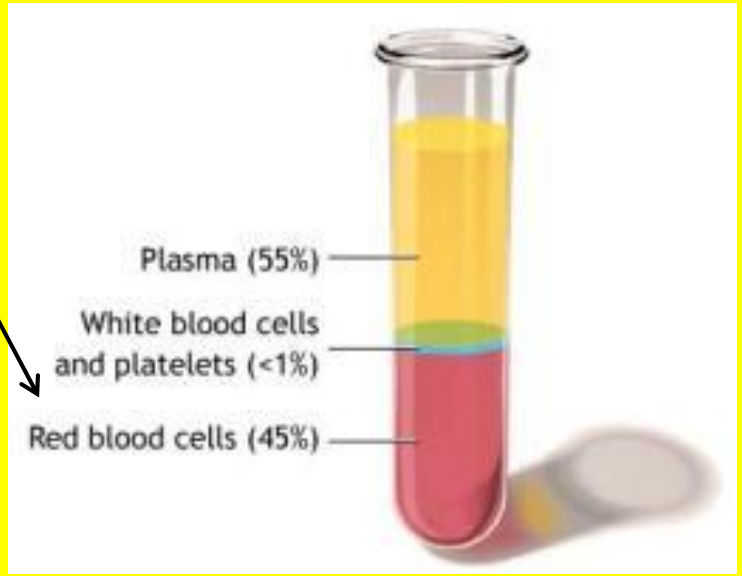
- **Hemoglobin – oxidace $CN^-$ na kyanmethemoglobin ➔spektrofotometricky 540 nm**
- **střední buněčný objem (MCV** – mean corpuscular volume**) (fl),**
- **počet Erytrocytů**

**výpočet hematokrit (HCT) = MCV x počet Ery ($10^6/\mu l$)**

**Kvalita Erytrocytů je určena:**
**MCV, MCH** (mean cell Hb content)**,**
**MCHC** (mean cellular Hb concentration)

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

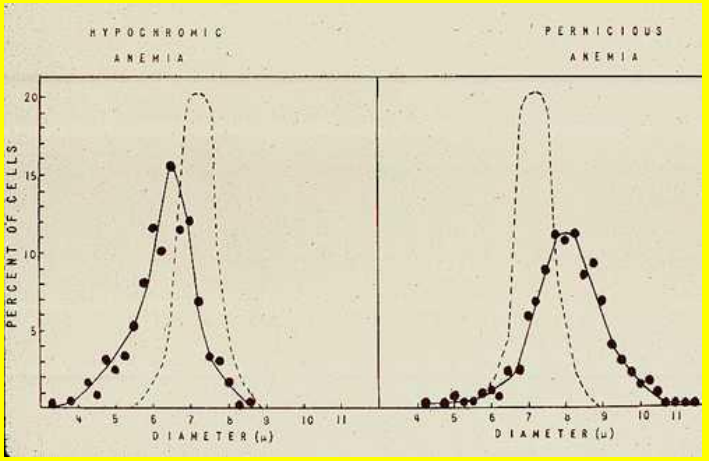
MCHC (g/dl) = Hb (g/dl) / HCT



# Parametry v hematologii III.

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

- **Počet retikulocytů**




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

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

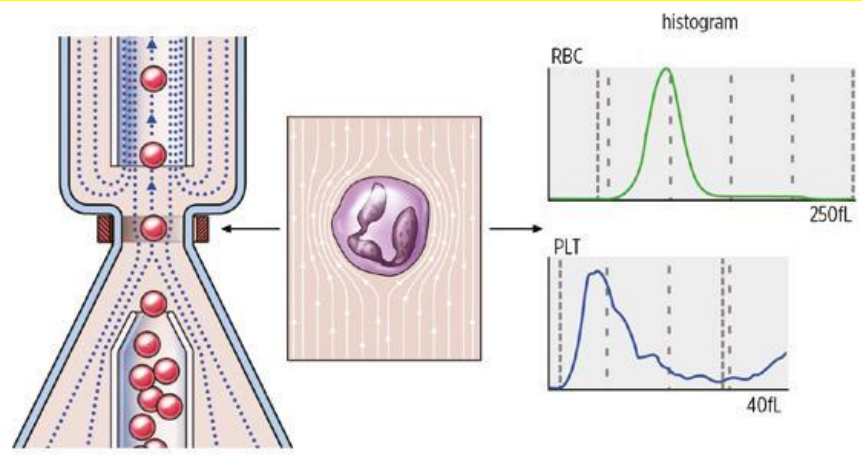
**Počet Thrombocytů** - **2% Novocain-Cl** ke krvi nebo

- v AP buňky v rozmezí 2-20fl = trombocyty

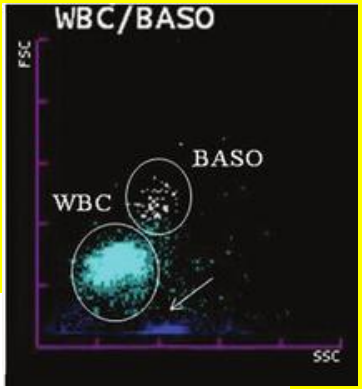
| # | Ery $10^6$ /μl | Thrombo / $10^3$ / μl | Leuko / μl | Hb (g/l) | HCT | MCH (pg) | MCV (fl) | MCHC (g/l) | Erytrocyty – průměr /μm |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Muži | **4,9** | 275 | 7000 | **155** | **0,45** | 31 | 90 | 340 | 7,5 |
| Ženy | **4,5** | 275 | 7000 | **140** | **0,41** | 31 | 90 | 340 | 7,5 |

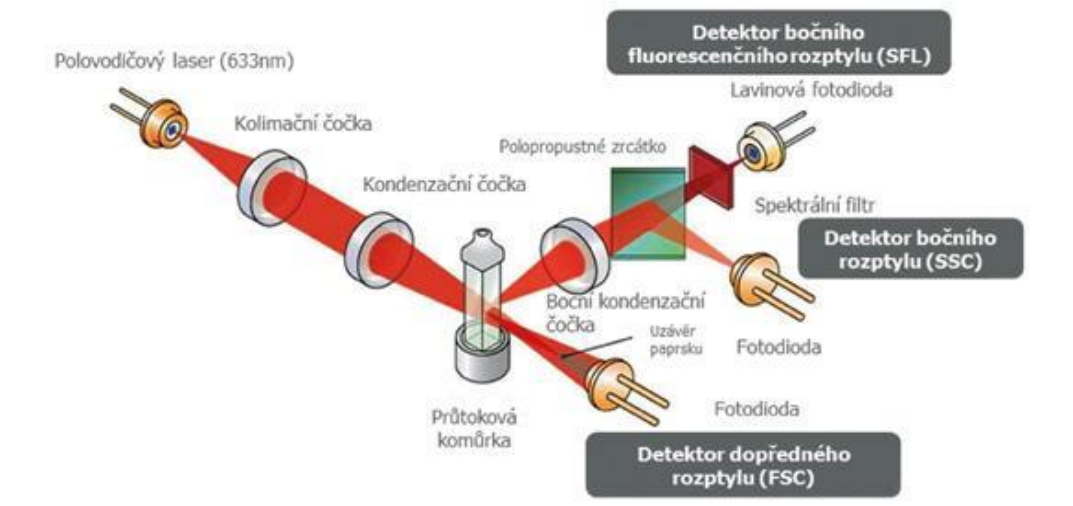
#Základy hematologické diagnostiky, 2.vydání, 2015 - průměr

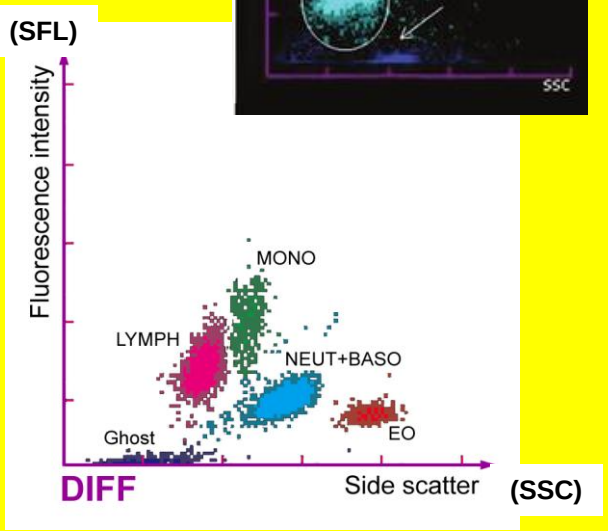
# Parametry v hematologii IV.




**Impedační princip – měření odporu – pro RBC a PLT**




**Optický princip – průchod laserového paprsku a rozptyl pod 3 úhly ➔ pro diferenciální počet leukocytů – velikost, granularita, lobularita**

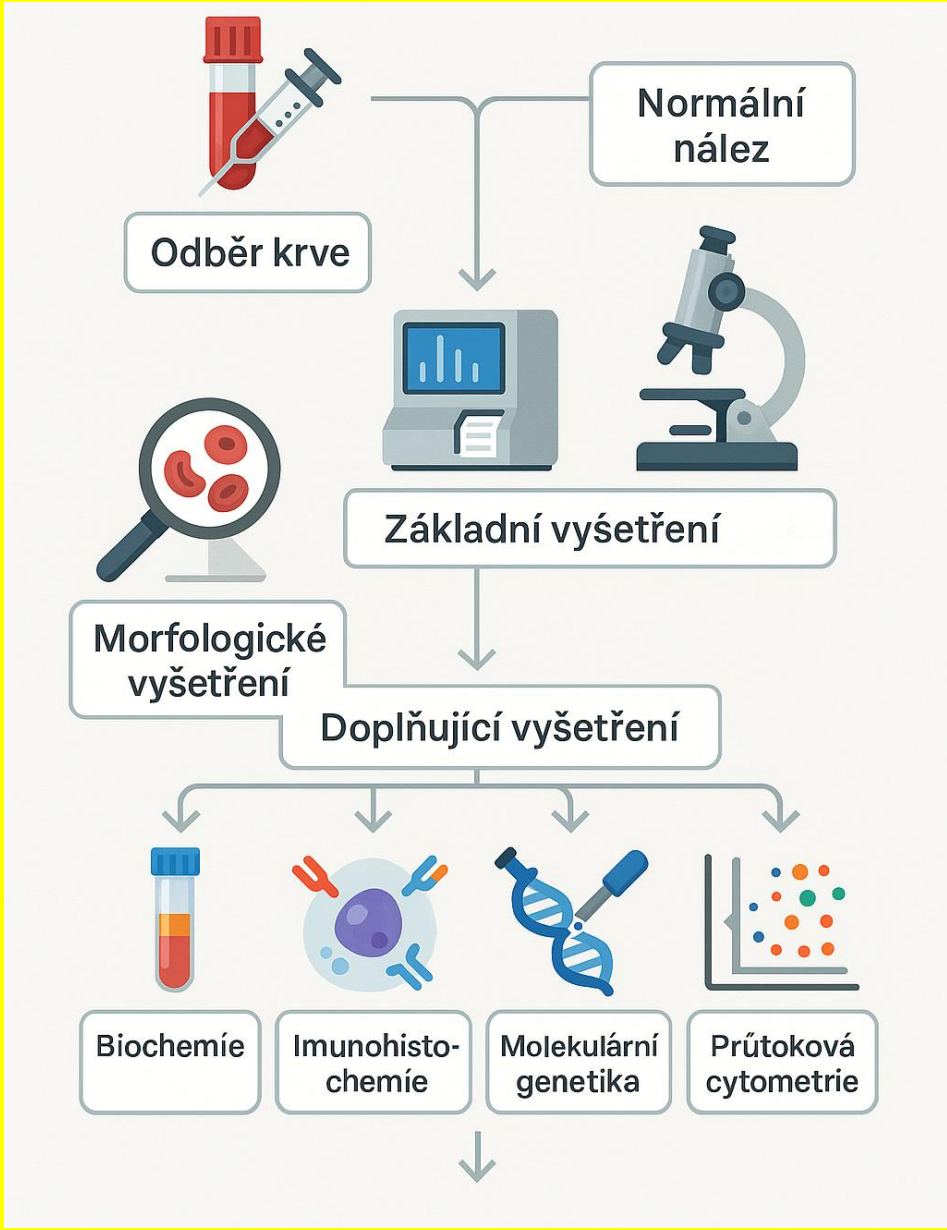
# Algoritmus procedur v hematologii

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 diagnosy za pomocí elektroforezy, ALP, esterasa, test na železo) = v případech, kdy analýza krve zanechává pochyby v určení diagnózy (leukocytopenia, thrombocytopenia, monoklonální hypergamaglobulinemie)**



# Transfuze a Darování krve

- převod transfuzních přípravků nebo krevních derivátů od zdravého jedince / dárce, nemocnému / příjemci za účelem doplnění krve nebo jejích složek.
- Nutnost ověření kompatibilitu systémů ABO, Hh, Rh, HLA, dalších..

## PROČ ?

- těžké úrazy, operace (zejména plicní, cévní, ortopedické, transplantace), léčbě otrav
- celoživotní zátěž, např: lidé léčení umělou ledvinou, lide se zhoubnými nemocemi krve
- léčba jedinců s poruchami srážlivosti (např. hemofilici), obranyschopnosti, popálenin

- Produkty z krve: celá krev, Červené krvinky, Krevní destičky, Granulocyty, čerstvě zmražená plazma (FFP), kryoprecipitované antihemolytické faktory, Imunoglobuliny

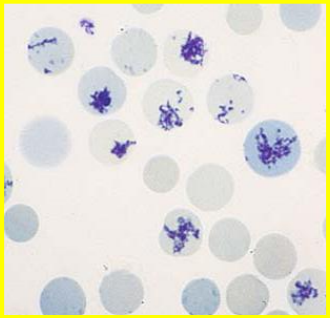
*https://www.cervenykriz.eu/proc-potrebujeme-darce-krve*

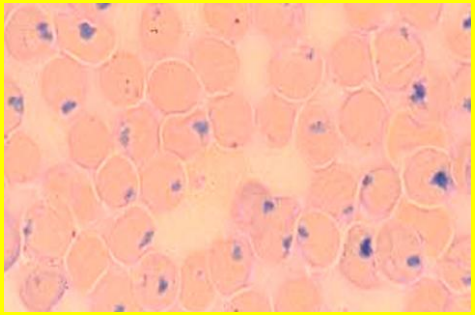
## Kdo se může stát dárcem krve?

- ten kdo je zdráv ☺ (dle určitých požadavků)

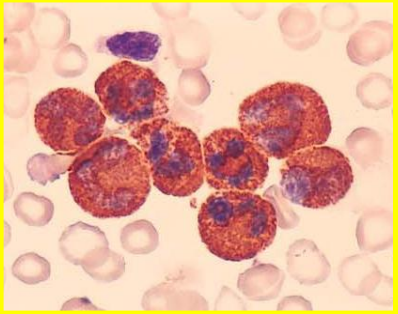
# Chemické / Enzymatické Markery krvinek

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

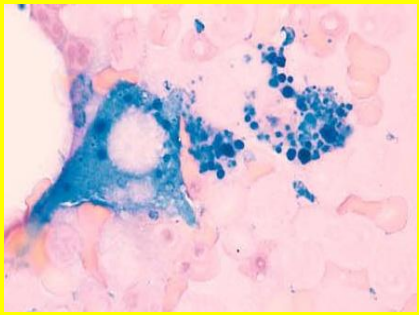




**Heinzova tělíska** (Nile blue sulfate) **= shluky Hb v Ery**

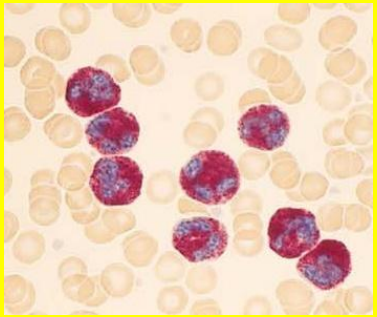


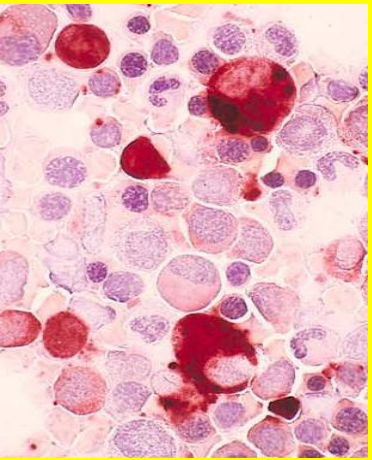
**Barvení $Fe^{3+}$ Berlínskou modří = železo v cytoplasmě makrofága**



**Peroxidasová reakce** (benzidine/ diaminobenzidine +$H_2O_2$ ) = **neutrofily, eosinofily**

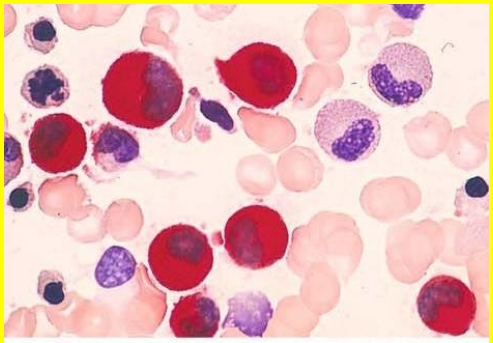
**Leukocytová ALP** (naphtyl fosfát + veronal sodný + variamine blue salt B) **= neutrofily (znak vyzrálých buněk)**





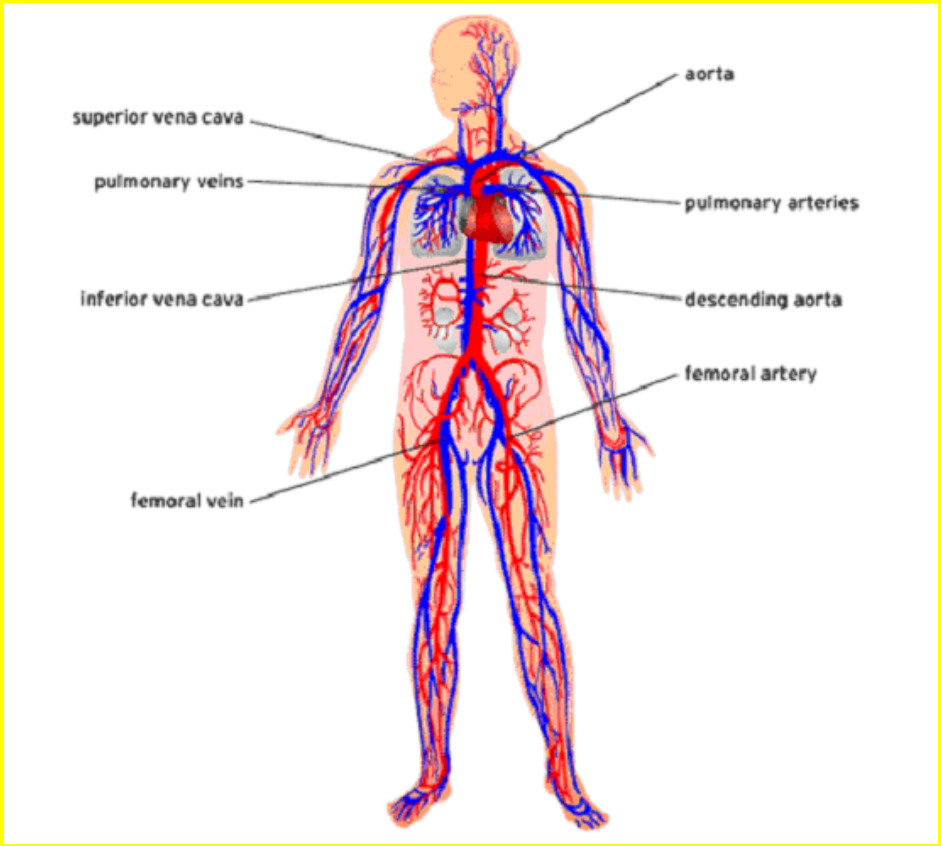
**Neutrální esterasa v makrofázích** (naftyl acetát)

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



# A slovo závěrem…

Zdraví



Nemoc

**Porozumět Hematologii = správně diagnostikovat**