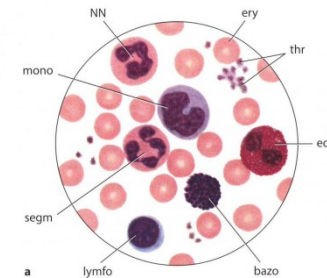


**Krvetvorba, systém krevních buněk a  
krvetvorné orgány; principy  
diferenciace**

**Karel Souček**

## Krev – složení a funkce

- Suspenze buněk v roztoku obsahujícím proteiny a elektrolyty (krevní plazma)
- Slouží pro transport plynů, výživných a odpadních látek, hormonů a dalších regulátorů
- Množství krve u dospělého člověka je ~ 4,5 - 5 litrů (6-8% celkové hmotnosti)
- ~ 40% objemu krve jsou buňky
  - Erythrocyty – transport plynů
  - Trombocyty – srážení krve
  - Leukocyty (granulocyty, monocyty, lymfocyty) – obranná funkce
- Omezené životnost krevních elementů (3-120 dní)
- Krvetvorba zajišťuje jejich obnovu, hlavní krvetvorný orgán (s výjimkou lymfocytů) je kostní dřeň

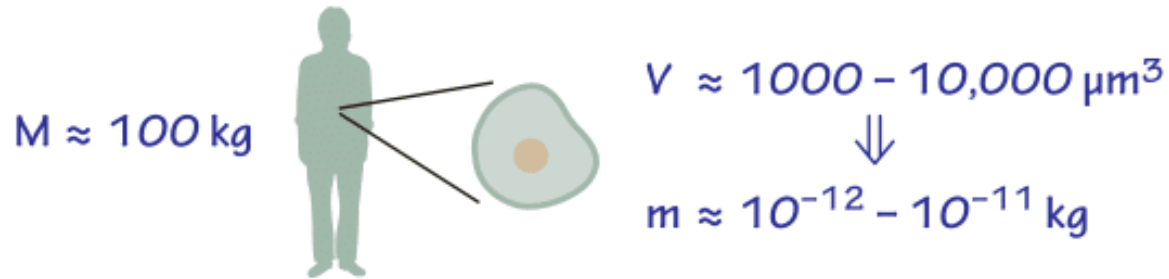


# Rychlost obnovy buněk

| cell type                          | turnover time    | BNID                   |
|------------------------------------|------------------|------------------------|
| small intestine epithelium         | 2-4 days         | 107812, 109231         |
| stomach                            | 2-9 days         | 101940                 |
|                                    |                  | 101940                 |
|                                    |                  | 109901, 109902         |
| gastrointestinal colon crypt cells | 3-4 days         | 107812                 |
| cervix                             | 6 days           | 110321                 |
| lungs alveoli                      | 8 days           | 101940                 |
| tongue taste buds (rat)            | 10 days          | 111427                 |
|                                    |                  | 111407, 111408         |
| bone osteoclasts                   | 2 weeks          | 109906                 |
| intestine Paneth cells             | 20 days          | 107812                 |
| skin epidermis cells               | 10-30 days       | 109214, 109215         |
| pancreas beta cells (rat)          | 20-50 days       | 109228                 |
|                                    |                  | 107910                 |
| trachea                            | 1-2 months       | 101940                 |
|                                    |                  | 109232                 |
| sperm (male gametes)               | 2 months         | 110319, 110320         |
| bone osteoblasts                   | 3 months         | 109907                 |
|                                    |                  | 101706, 107875         |
| liver hepatocyte cells             | 0.5-1 year       | 109233                 |
| fat cells                          | 8 years          | 103455                 |
| cardiomyocytes                     | 0.5-10% per year | 107076, 107077, 107078 |
| central nervous system             | life time        | 101940                 |
| skeleton                           | 10% per year     | 109908                 |
| lens cells                         | life time        | 109840                 |
| oocytes (female gametes)           | life time        | 111451                 |

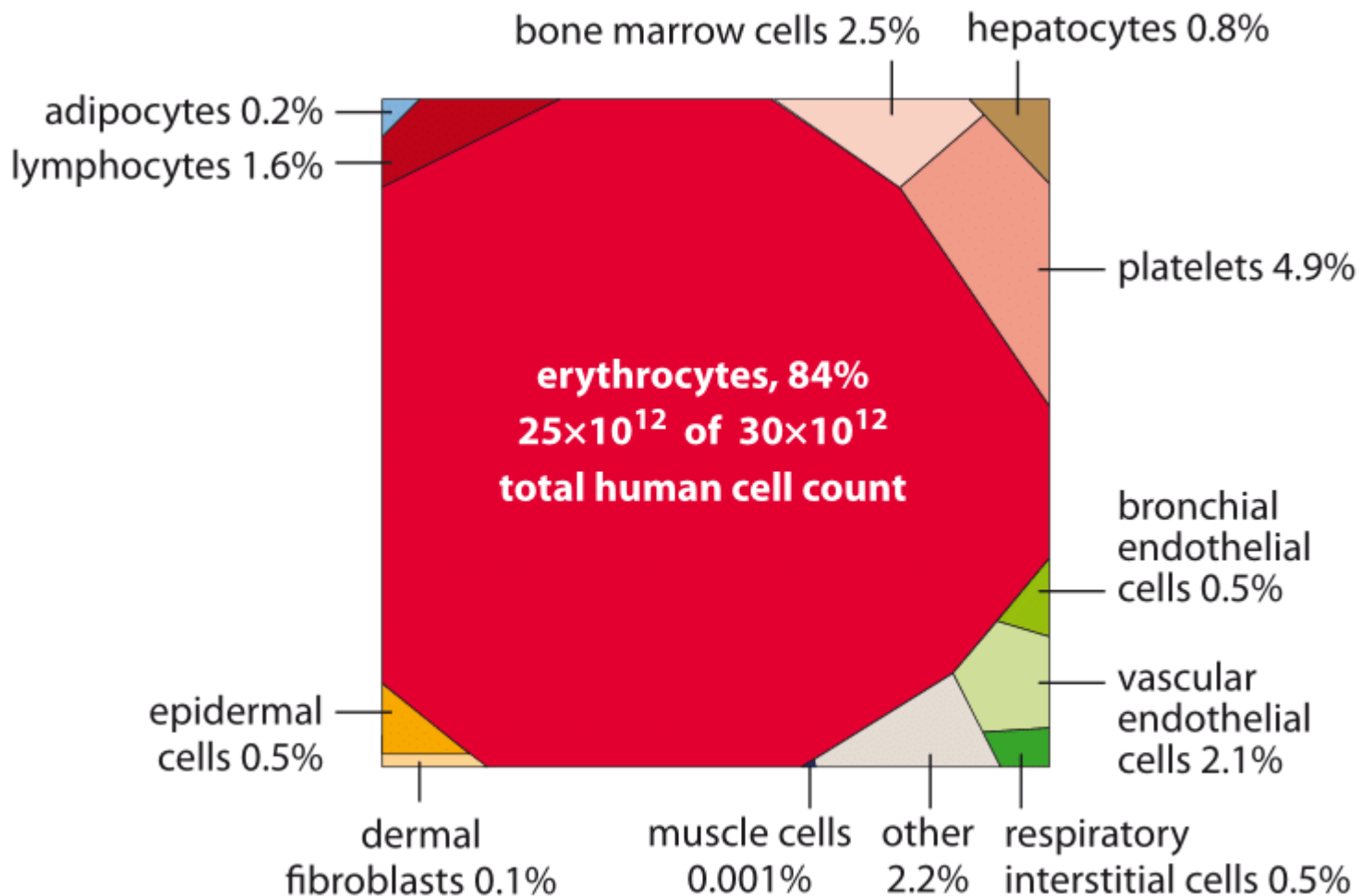
# Jaký podíl našeho těla tvoří krevní buňky?

number of cells in the human body



$$N \approx \frac{M}{m} = \frac{100 \text{ kg}}{10^{-12} - 10^{-11} \text{ kg}} = 10^{13} - 10^{14}$$

# Jaký podíl našeho těla tvoří krevní buňky?



## Jaký podíl našeho těla tvoří krevní buňky?

| Typ buňky               | Počet/ $\mu$ l krve*                   | Fyziologické rozmezí**                              |
|-------------------------|--|---|
| erythrocyty             | 5 milionů (muži)<br>4,5 milionů (ženy) | $4,3-5,3 \cdot 10^{12}/l$<br>(0,5–2 % retikulocytů) |
| leukocyty               | 5 tisíc                                | $4-9 \cdot 10^9/l$                                  |
| thrombocyty             | 250 tisíc                              | $150-300 \cdot 10^9/l$                              |
|                         | Rozdělení leukocytů v %                | Fyziologické rozmezí v %**                          |
| neutrofilní granulocyty | 60 (z toho 5 % tyček)                  | 55–70   |
| eosinofilní granulocyty | 3                                      | 2–5   |
| bazofilní granulocyty   | < 1                                    | 0–1   |
| monocyty                | 6                                      | 3–8   |
| lymfocyty               | 30                                     | 18–40   |

- hemoglobin 120–160 g/l krve
- celková bílkovina 60–80 g/l plasmy (z toho 65 % albuminu)
- bilirubin < 25 mmol/l plasmy

\* průměrná hodnota ( $\mu$ l =  $mm^3$ )

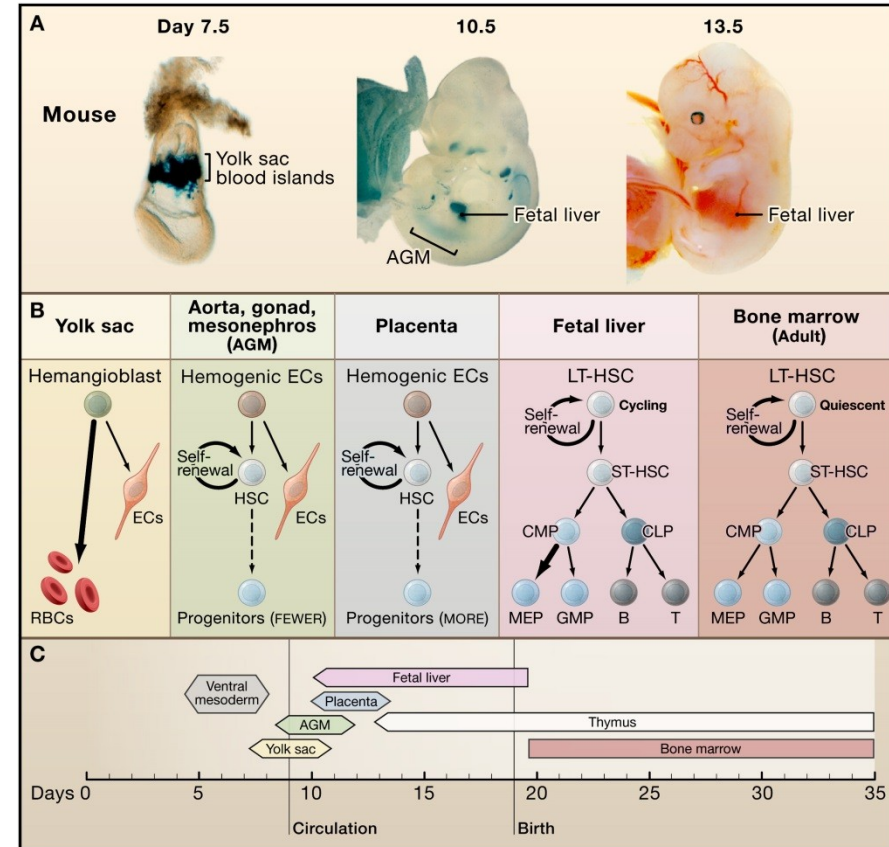
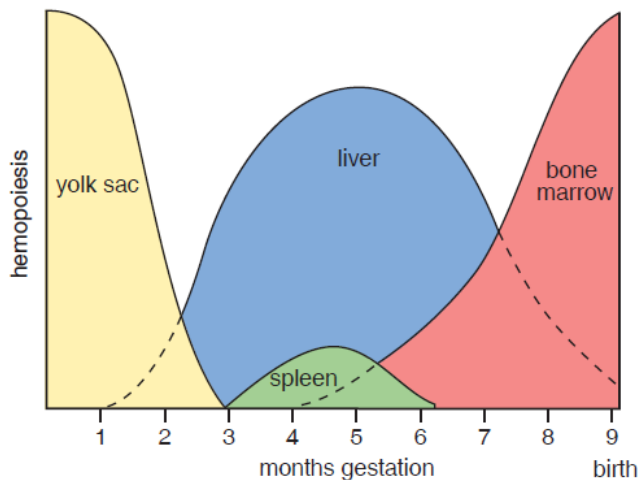
\*\* doplněno podle hodnot uváděných v ČR

## Hematopoéza

- **proces tvorby krevních buněk proliferací a diferenciací jejich prekurzorů**
- Produkce dostatečného množství krevních buněk vyžaduje
  - proliferaci buněk mitotickým dělením
  - diferenciací buněk během jejich specializace
- Plně diferencované buňky již většinou nemohou proliferovat.

## Hematopoetické orgány

- **Embryo:** žloutkový vak, játra, slezina
- **Fetus:** játra, slezina, kostní dřeň
- **Po narození:**
  - kostní dřeň
    - většina krevních buněk (erytrocytů, granulocytů, monocytů)
    - Trombocyty
  - lymfatické uzliny, thymus, slezina a další orgány s výskytem lymfatických folikulů
    - lymfocyty



Cell 2008 132, 631-644DOI: (10.1016/j.cell.2008.01.025)



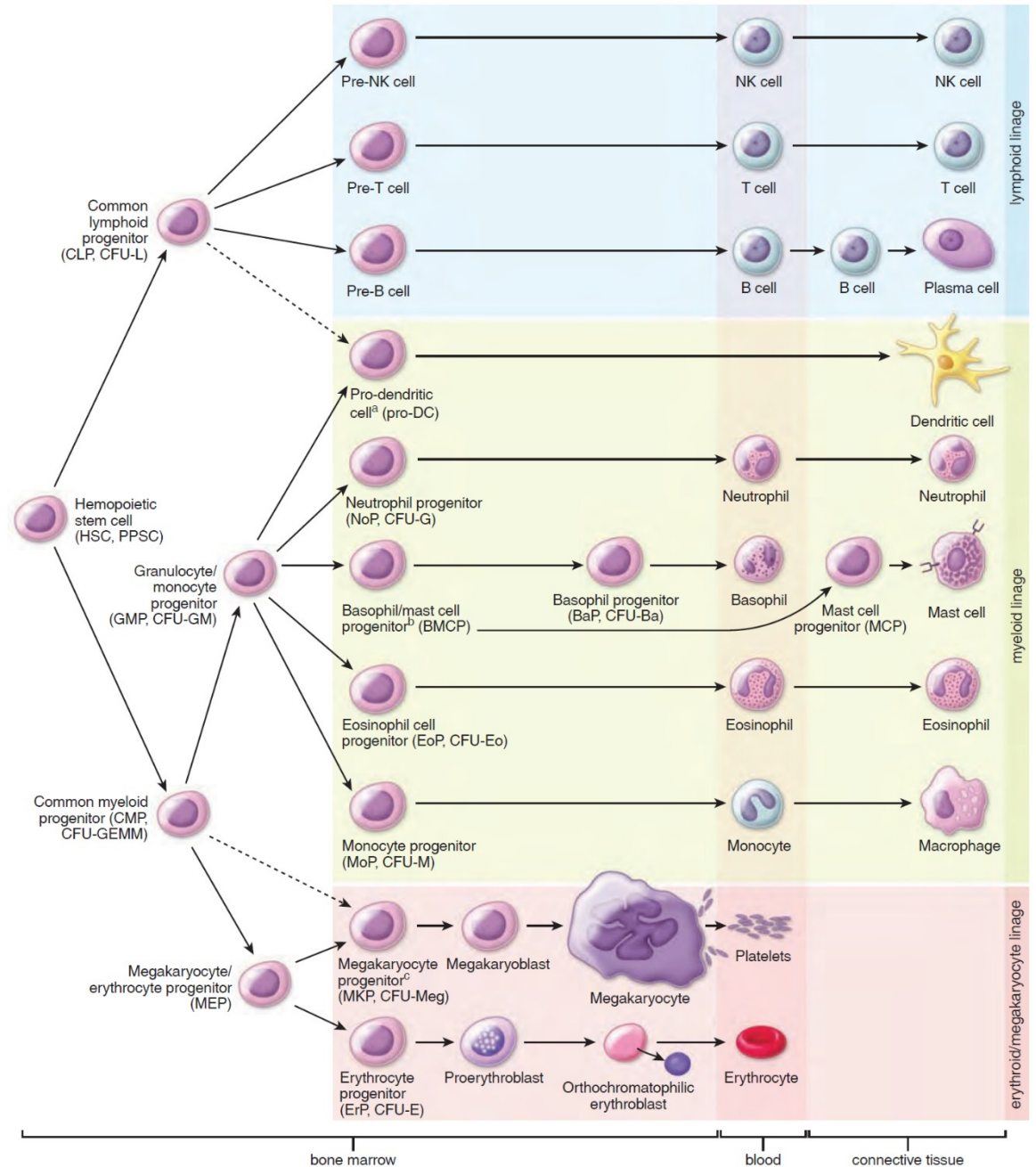
# Větvě hematopoézy

## Lymphoidní:

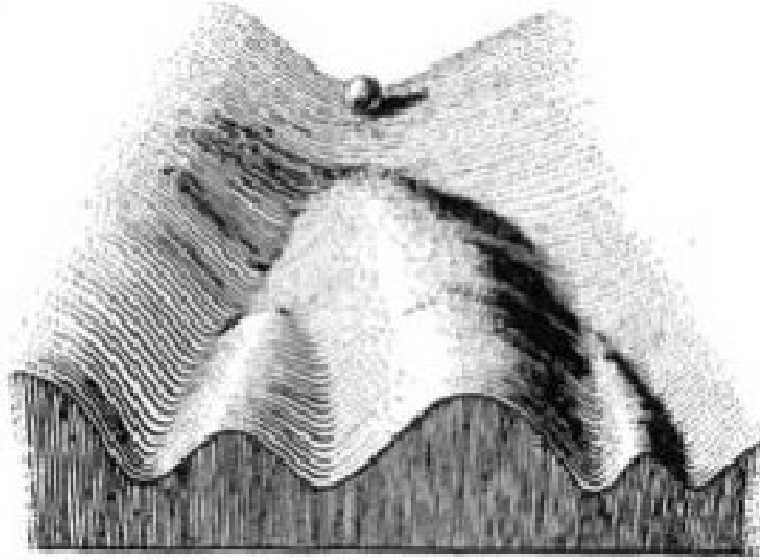
produkce T lymfocytů  
produkce B lymfocytů

## Myeloidní:

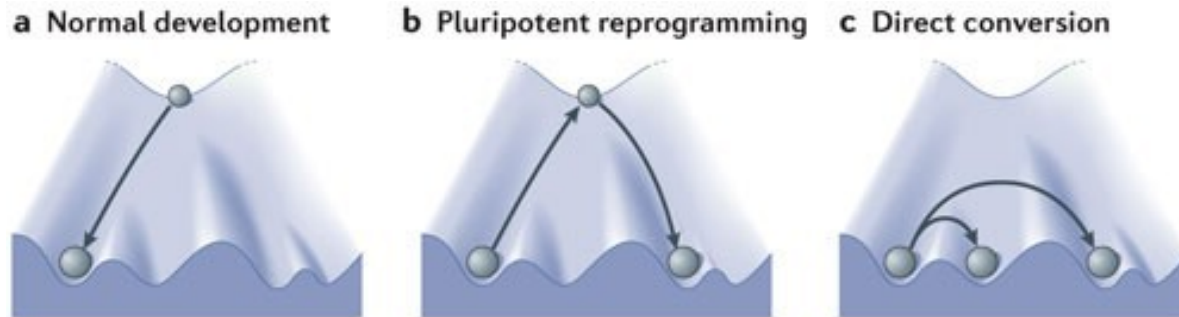
erythropoéza  
monocytopoéza  
granulopoéza  
(eosinopoéza, basopoéza)  
trombocytopoéza



# Buněčná plasticita



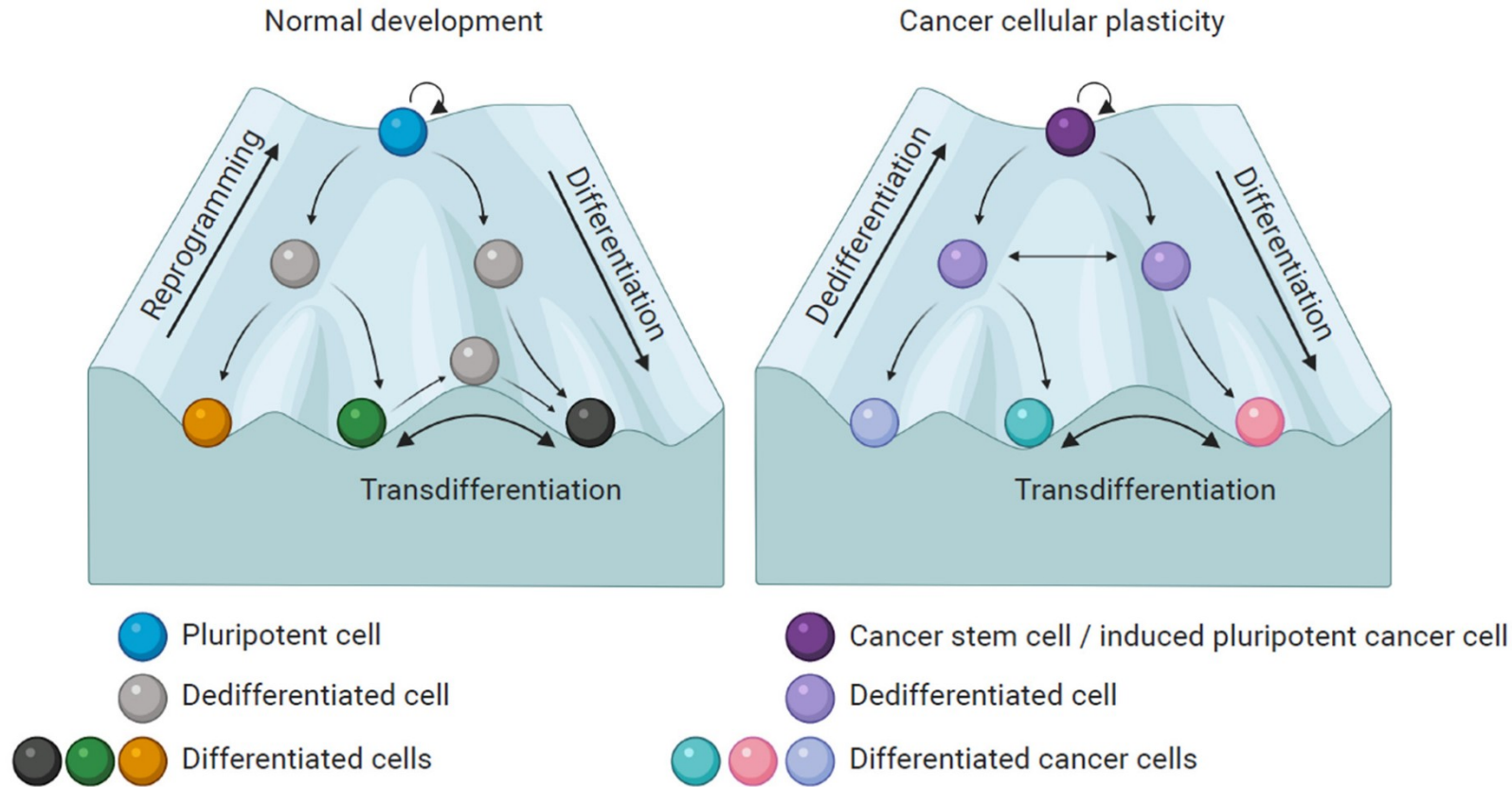
1957, Conrad Waddington



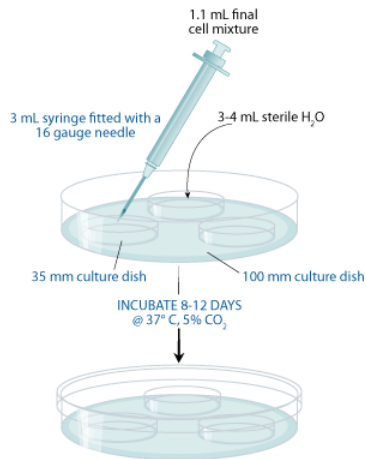
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

<https://www.nature.com/articles/nrm3543/figures/1>

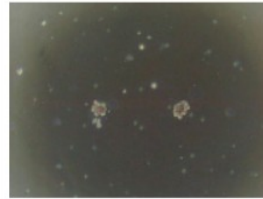
# Buněčná plasticita



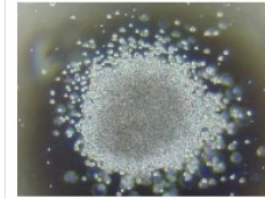
## Charakterizace hematopoetických kmenových a progenitorových buněk - Colony Forming Cell (CFC) Assay



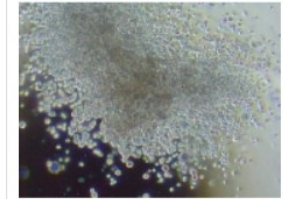
### Colony Types



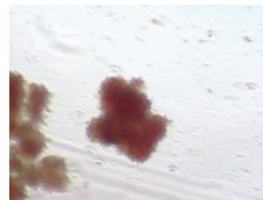
**CFU-E (Colony forming unit-erythroid):** Clonogenic progenitors that produce only one or two clusters with each cluster containing from 8 to approximately 100 hemoglobinized erythroblasts. It represents the more mature erythroid progenitors that have less proliferative capacity.



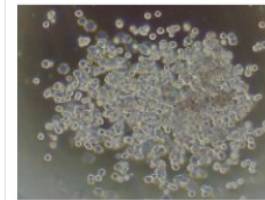
**CFU-G (Colony forming unit-granulocyte):** Clonogenic progenitors of granulocytes that give rise to a homogeneous population of eosinophils, basophils or neutrophils.



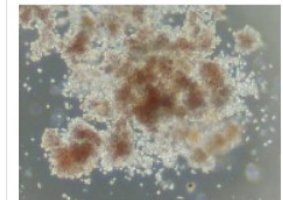
**CFU-GM (Colony forming unit-granulocyte, macrophage):** Progenitors that give rise to colonies containing a heterogeneous population of macrophages and granulocytes. The morphology is similar to the CFU-M and CFU-G descriptions.



**BFU-E (Burst forming unit-erythroid):** The size of the colony can be described as small (3 to 8 clusters), intermediate (9 to 16 clusters), or large (more than 16 clusters) according to the number of clusters present. These are primitive erythroid progenitors that have high proliferative capacity.

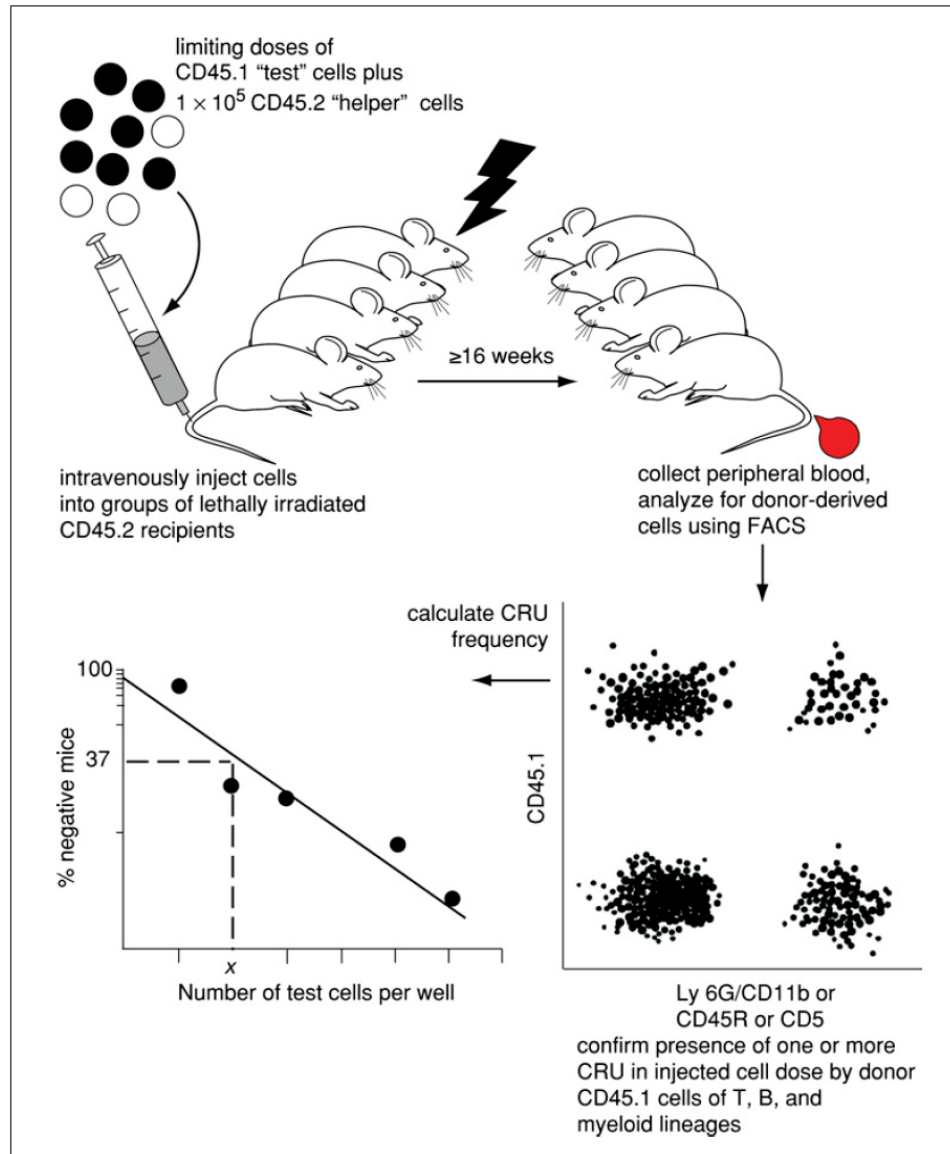


**CFU-M (Colony forming unit-macrophage):** Clonogenic progenitors of macrophages that give rise to a homogenous population of macrophages.

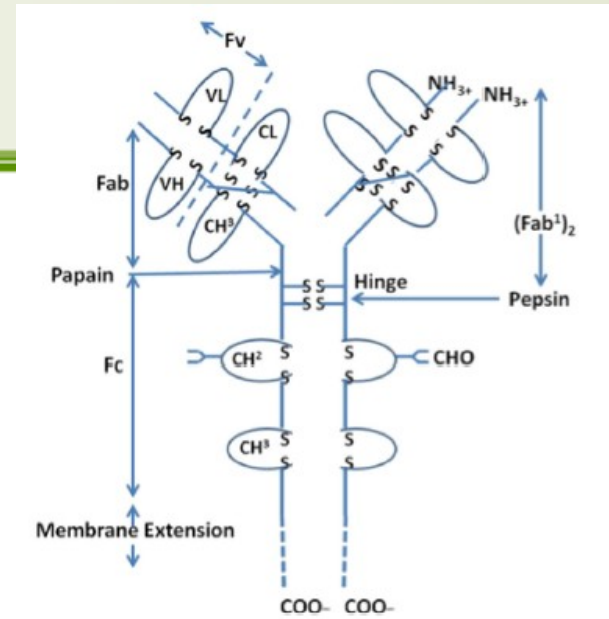
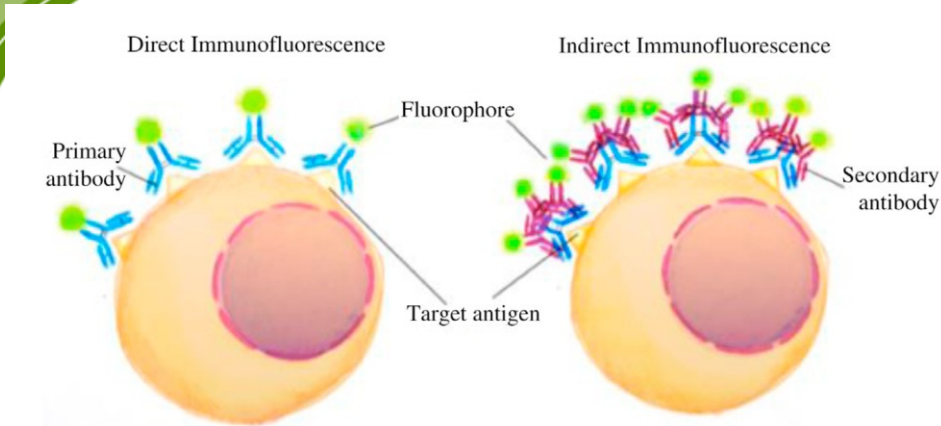


**CFU-GEMM (Colony forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte):** Multi-lineage progenitors that give rise to erythroid, granulocyte, macrophage and megakaryocyte lineages, as the name indicates.

# Charakterizace hematopoetických kmenových a progenitorových buněk – competitive repopulation assay, CRU

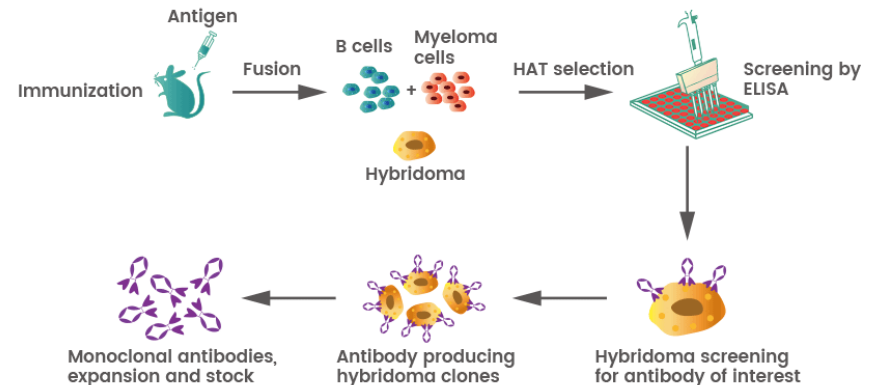


# Immunodetekce



## History:

- 1940 – Conns, imunofluorescenční značení kryožezů
- 1959 – Singer, vývoj metody konjugující protilátky se značkou
- 1966 - Graham&Karnovsky, metoda značení protilátek enzymy (HRP)
- 1974 – Taylor&Burns – rutinní imunohistochemie
- 1975 – Kohler&Milstein – produkce monoklonálních protilátek pomocí hybridomů



About Us | Contact | FAQ | For Providers | Sign in

# antibodypedia

Explore Validate Learn

Search for  Application: Any  [Advanced search](#)

e.g. [Her2](#), [Transcription factors](#), [Chromosome X](#)

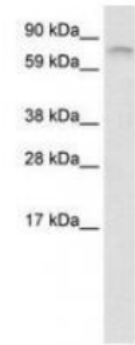
## A portal for validated antibodies

Antibodypedia scores antibodies to guide researchers to choose an appropriate antibody for a particular application. The resource contains information about more than four million publicly available research antibodies towards over 19,000 human protein targets from more than 85 providers.

Use "Search for" to find validated antibodies against your target protein for a particular application! The antibodies are scored using the [validation principles](#) outlined by the International Working Group for Antibody Validation and we encourage feedback from researcher by [submitting validation data](#) for a particular antibody.

**Content updated 2021-09-09**  
4480670 reviewed antibodies from [95 providers](#), covering gene-products encoded by [19109 genes](#) (approximately **95%** of all human genes).  
Primary data available for [2181179](#) experiments.

## Featured Validations



**LS-C433002**  
Fetal Brain Lysate. This image was taken for the unconjugated form of this product. Other forms have not been tested.  
[More info](#)

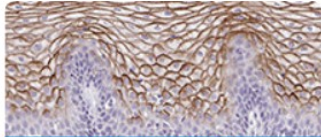
# THE HUMAN PROTEIN ATLAS

☰ MENU HELP NEWS

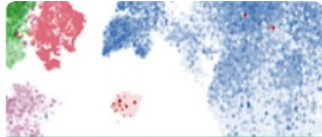
SEARCH<sup>†</sup>

[Fields »](#)

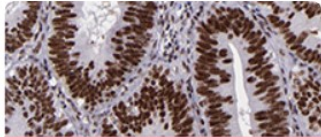
e.g. ACE2, GFAP, EGFR



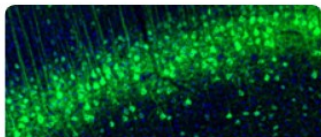
TISSUE ATLAS



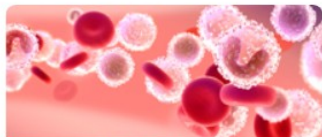
SINGLE CELL TYPE ATLAS



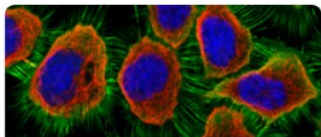
PATHOLOGY ATLAS



BRAIN ATLAS



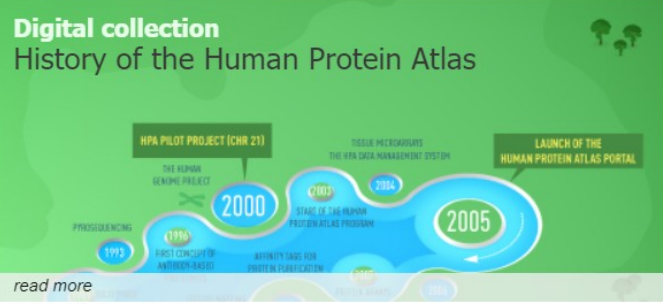
BLOOD ATLAS



CELL ATLAS

### Digital collection

#### History of the Human Protein Atlas



1993 PROSILICING

1995 FIRST CONCEPT: ANTIBODY-BASED

2000 HPA PILOT PROJECT (CHR 21)

2005 TISSUE MICROARRAYS

2006 THE HUMAN GENOME PROJECT

2008 THE HPA DATA MANAGEMENT SYSTEM

2014 LAUNCH OF THE HUMAN PROTEIN ATLAS PORTAL

2021

[read more](#)

### Recent news

Wed, 28 Jul 2021  
*A single cell type map of human tissues*

Thu, 22 Jul 2021  
*Movie of the month: The Fatty Liver*

Tue, 15 Jun 2021  
*Movie of the month: The Spleen*

[all news articles](#)

PRESS ROOM

[f](#) [t](#) [i](#) [in](#) [RSS](#)

[contact@proteinatlas.org](mailto:contact@proteinatlas.org)

INTRODUCTION

PUBLICATIONS

LICENCE & CITATION

DOWNLOADABLE DATA

Version: **20.1**

Atlas updated: 2021-02-24  
[release history](#)

Proteome analysis based on  
**26941** antibodies targeting  
**17165** unique proteins



# Imunofenotypizace


- **stanovení zastoupení jednotlivých subpopulací krevních elementů** (primárně leukocytů) na základě exprese vybraných **povrchových antigenů**, případně v kombinaci s intracelulární produkcí cytokinů a expresí intracelulárních antigenů.

## CD („Cluster of Differentiation“)

- **systém označení povrchových molekul leukocytů.** Soubor povrchových molekul (znaků, antigenů) buněk mající stejný epitop, který lze identifikovat stejnou protilátkou.
- Pojí se s určitými funkcemi a vlastnostmi buňky. Většina CD má proto alternativní názvy vztahující se k jejich funkci nebo struktuře.
- Využívají se pro rozpoznávání buněčných populací při imunofenotypizaci.
- Dodnes definovány CD1 až CD350. Některá CD jsou skupinami příbuzných molekul – jednotlivé molekuly se pak označují písmeny (např. CD62L, CD62P, CD62E)

# CD molekuly

- ➔ [https://www.biolegend.com/cell\\_markers](https://www.biolegend.com/cell_markers)
- ➔ <http://www.hcdm.org/>

**Human CD Molecules** 



**biolegend.com**

**Contact BML-agenes**

BioLegend  
San Diego, CA 92121

1-800-368-9870  
www.biolegend.com  
info@biolegend.com  
support@biolegend.com

**Mouse CD Molecules** 



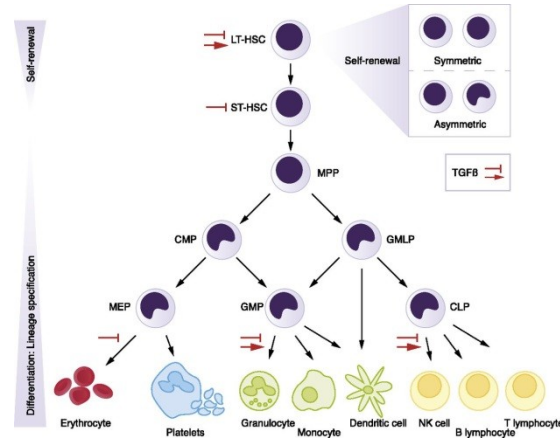
**biolegend.com**

**Contact BML-agenes**

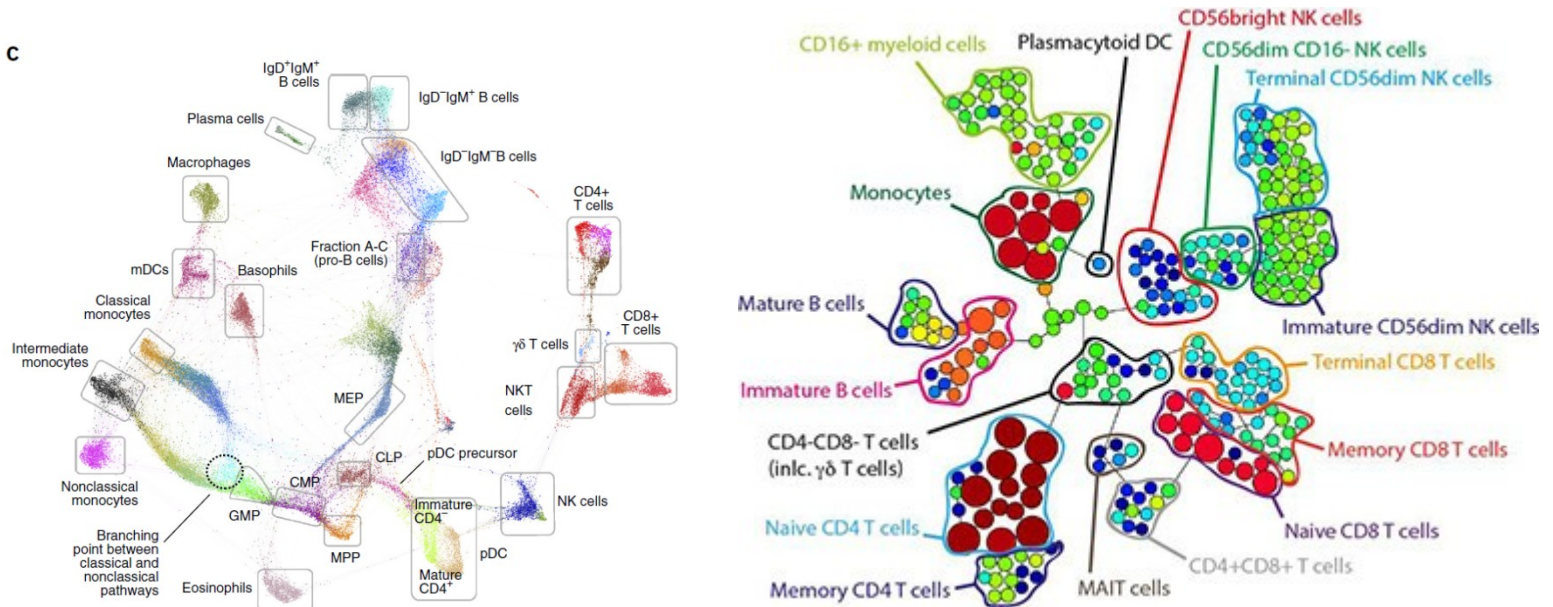
BioLegend  
San Diego, CA 92121

1-800-368-9870  
www.biolegend.com  
info@biolegend.com  
support@biolegend.com

# The hematopoietic hierarchy – novel approaches



C



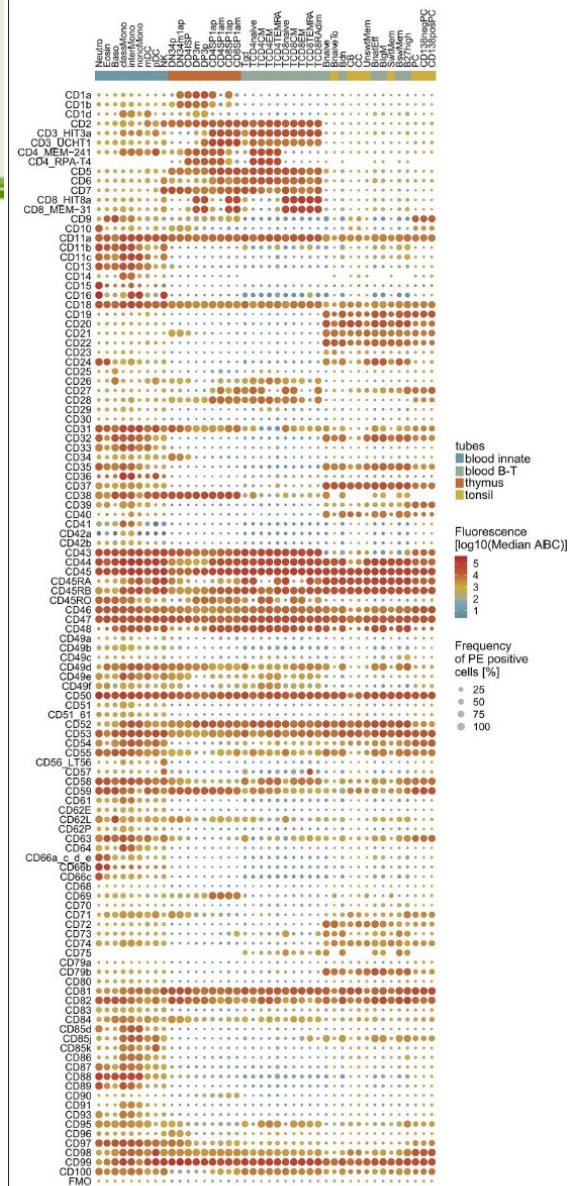


## CD Maps – Dynamic Profiling of CD1–CD100 Surface Expression on Human Leukocyte and Lymphocyte Subsets

Tomas Kalina<sup>1,2†</sup>, Karel Fišer<sup>1†</sup>, Martín Pérez-Andrés<sup>3,4</sup>, Daniela Kuzilková<sup>1</sup>, Marta Cuenca<sup>5</sup>, Sophinus J. W. Bartol<sup>6</sup>, Elena Blanco<sup>3,4</sup>, Pablo Engel<sup>5</sup>, and Menno C. van Zelm<sup>6,7\*</sup>, on behalf of the Human Cell Differentiation Molecules (HCDM) organization

<sup>1</sup> CLIP - Childhood Leukaemia Investigation Prague, Department of Paediatric Haematology and Oncology, Charles University, Prague, Czechia, <sup>2</sup> Department of Paediatric Haematology and Oncology, University Hospital Motol, Prague, Czechia, <sup>3</sup> Department of Medicine, Cancer Research Centre (BMCC, USAL-CSIC), Cytometry Service (NUCLEUS), Institute of Biomedical Research of Salamanca, University of Salamanca, Salamanca, Spain, <sup>4</sup> Biomedical Research Networking Centre Consortium of Oncology (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, <sup>5</sup> Department of Biomedical Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>6</sup> Department of Immunology, Erasmus MC, University Medical Center, Rotterdam, Netherlands, <sup>7</sup> Department of Immunology and Pathology, Monash University and the Alfred Hospital, Melbourne, VIC, Australia

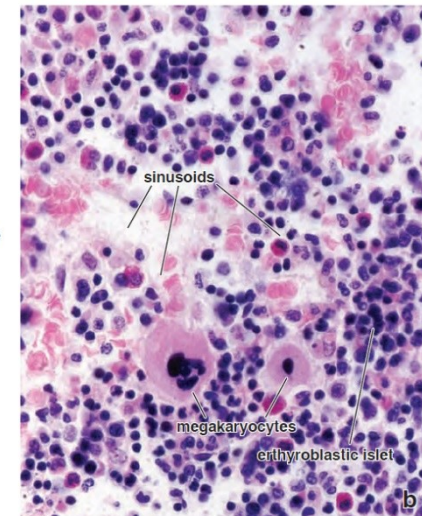
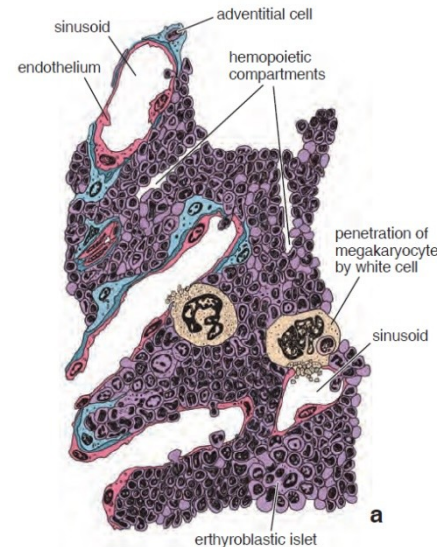
OPEN ACCESS



**FIGURE 2 |** Expression map of CD1–CD100 on all 42 non-overlapping cell subsets. CD markers are numerically ordered vertically with the FMO on the bottom row. The cell subsets are grouped (innate cells; thymocytes; T-cells; B cells) and sorted within lineage on their maturity. The median expression level is visualized by color, and the median percentage of positive cells is visualized by the size of the dot. For cell type abbreviations, see **Supplementary Table 3**.

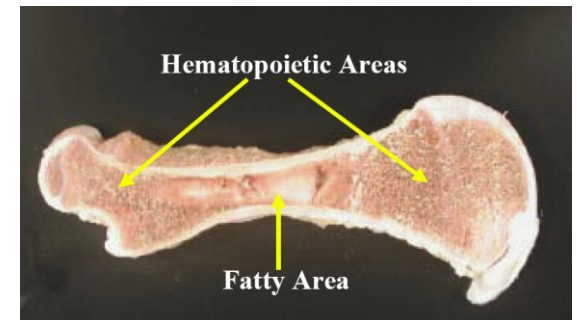
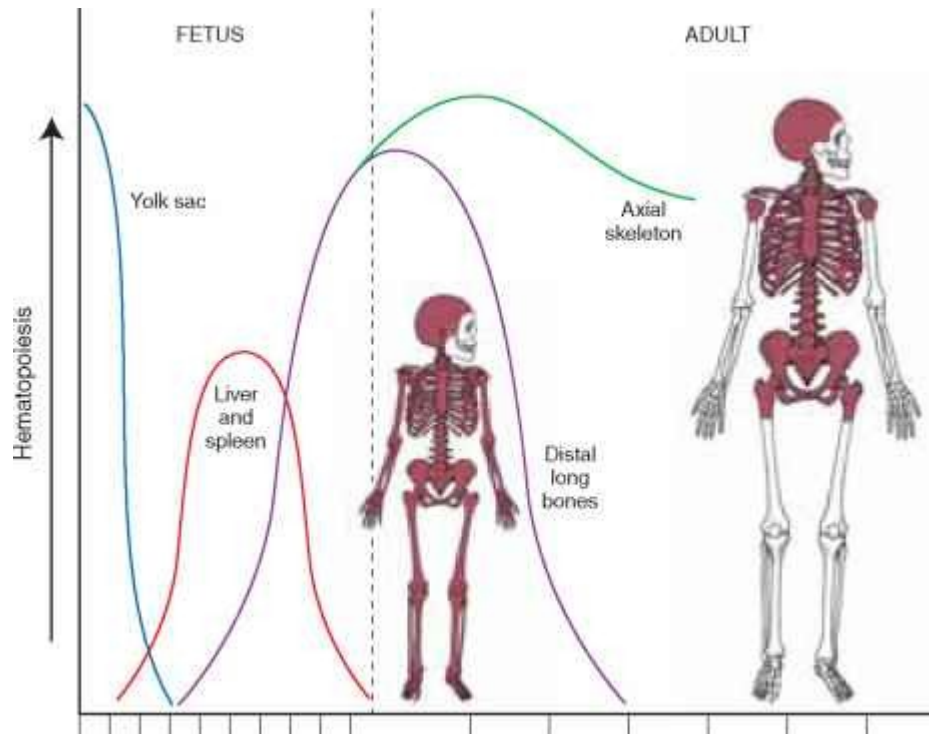
# Kostní dřeň

- ▶ Kostní dřeň poskytuje strukturální podporu a udržuje odpovídající prostředí pro průběh hematopoézy.
- ▶ Stroma kostní dřeně je pórovitá fibrózní tkáň tvořená fibroblasty, retikulárními buňkami a kostními buňkami, na kterou adherují vyvíjející se buňky, makrofágy a adipocity.
- ▶ Stromální buňky, makrofágy a endoteliální buňky spolu s hematopoetickými buňkami produkují růstové faktory regulující proliferaci a diferenciaci buněk.
- ▶ Strukturální molekuly vážou tyto růstové faktory, a tak udržují jejich vysokou koncentraci v kostní dřeni.
- ▶ **Rozlišujeme:**
  - červenou kostní dřeň – vlastní hematopoéza
  - bílou kostní dřeň – tuková tkáň

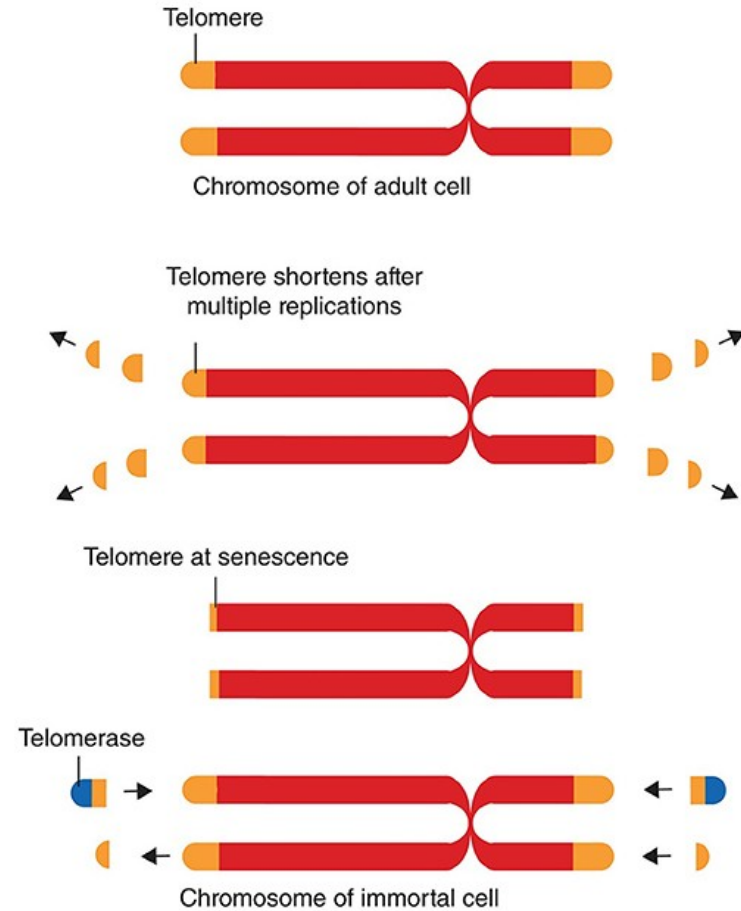
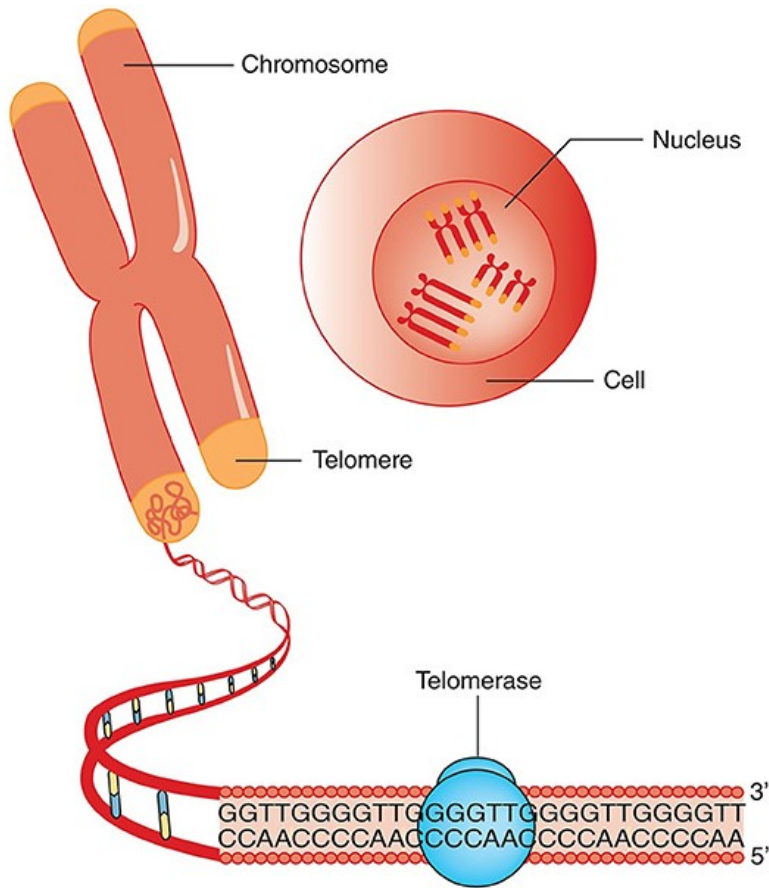


## Kostní dřeň a věk

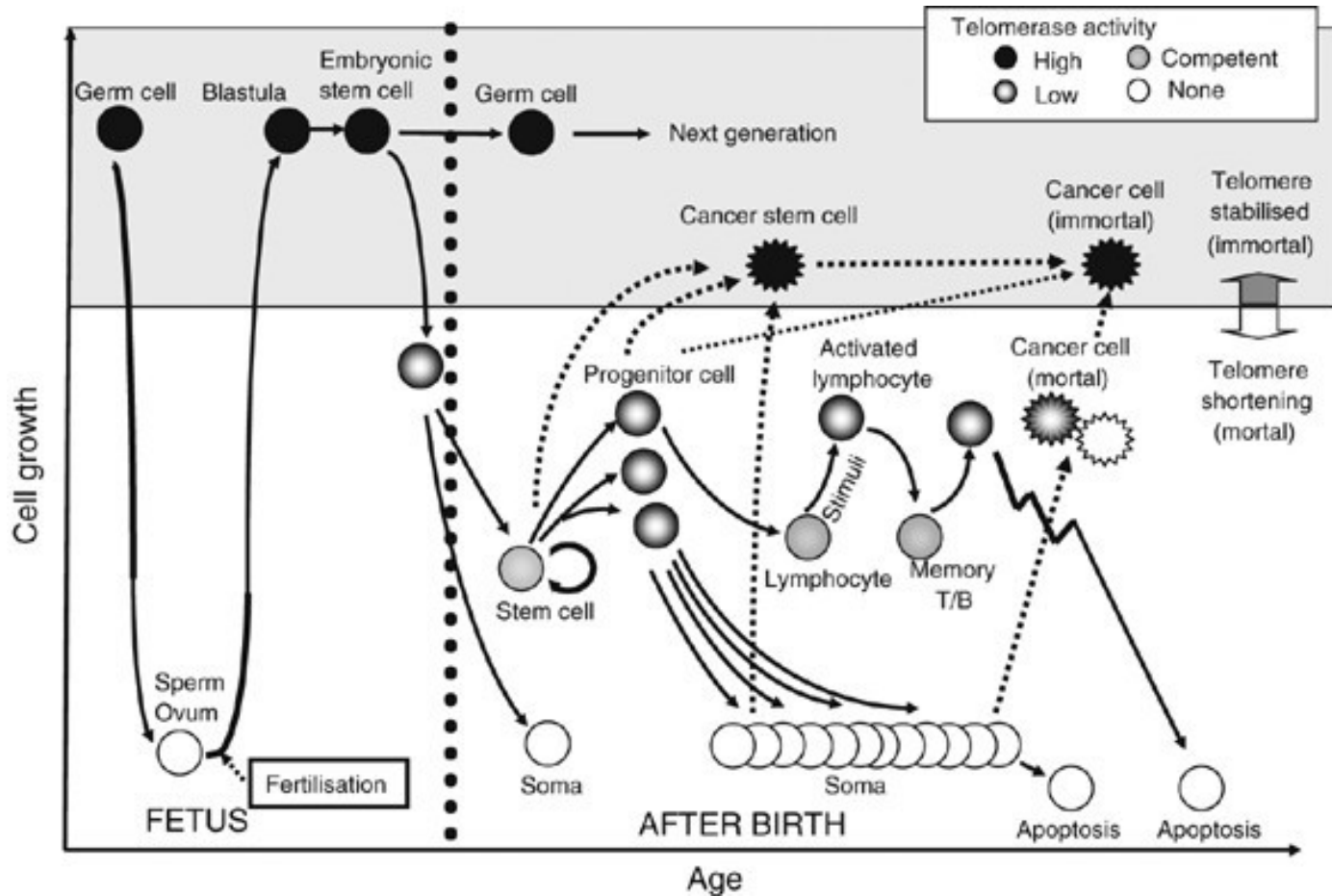
- ▶ **Převažující aktivita:**
  - mládí – ploché a dlouhé kosti
  - stáří – ploché kosti a konce dlouhých kostí
- ▶ **Mladí jedinci:** kostní dřeň celá červená, hematopoéza probíhá ve všech částech
- ▶ **Dospělí jedinci:** středová část kostí se postupně zaplňuje tukem a vytlačuje hematopoetické buňky; hematopoéza v těchto částech probíhá pouze v případě zvýšené potřeby krevních buněk



# Úbytek telomer, délka telomer a telomeráza.



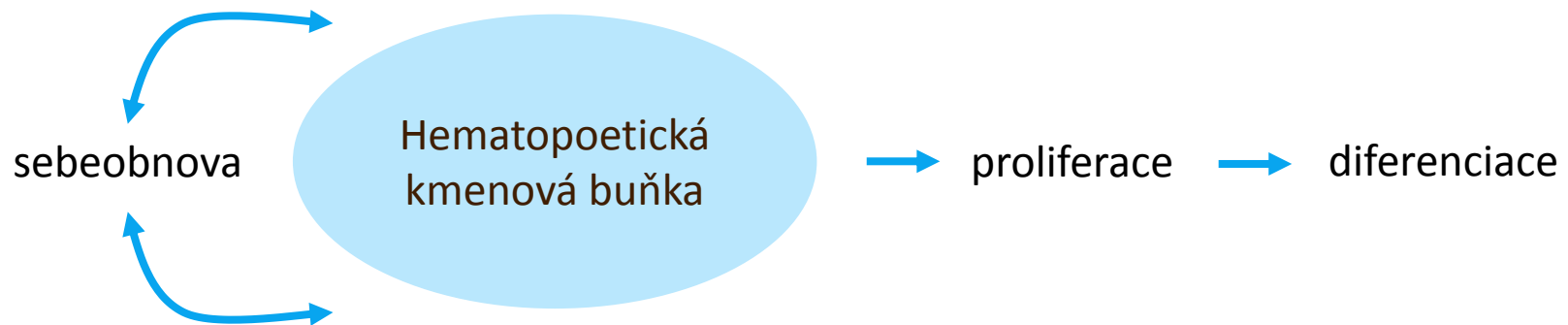
# Dynamika telomer a telomerázy v lidských kmenových buňkách.





## Hematopoetická kmenová buňka (HSC)

- Má nejen schopnost sebeobnovy, ale dává vznik všem krevním specializovaným buňkám
  - Dlouhodobé (LT-HSC): velké množství telomerázy
  - Krátkodobé (ST-HSC): nižší hladina telomerázy => životnost 2 týdny



snižující se  
proliferace

zvyšující se  
diferenciace

## Vývojová stádia buněk v kostní dřeni

### **Hematopoetická kmenová buňka**

je základní sebeobnovující se buňkou se schopností diferencovat do různých typů krevních buněk (multipotentní).



### **Progenitorová buňka**

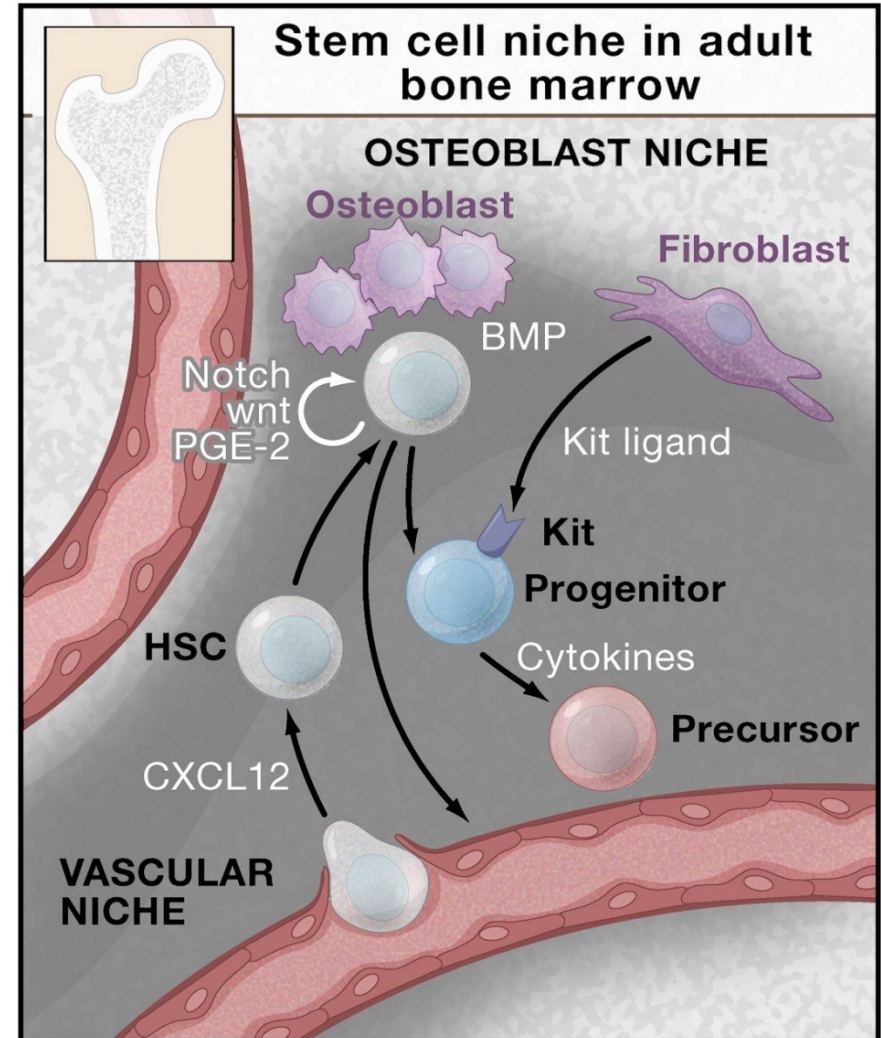
je již částečně diferencována a může dávat vznik jen dané buněčné linii (CFU).



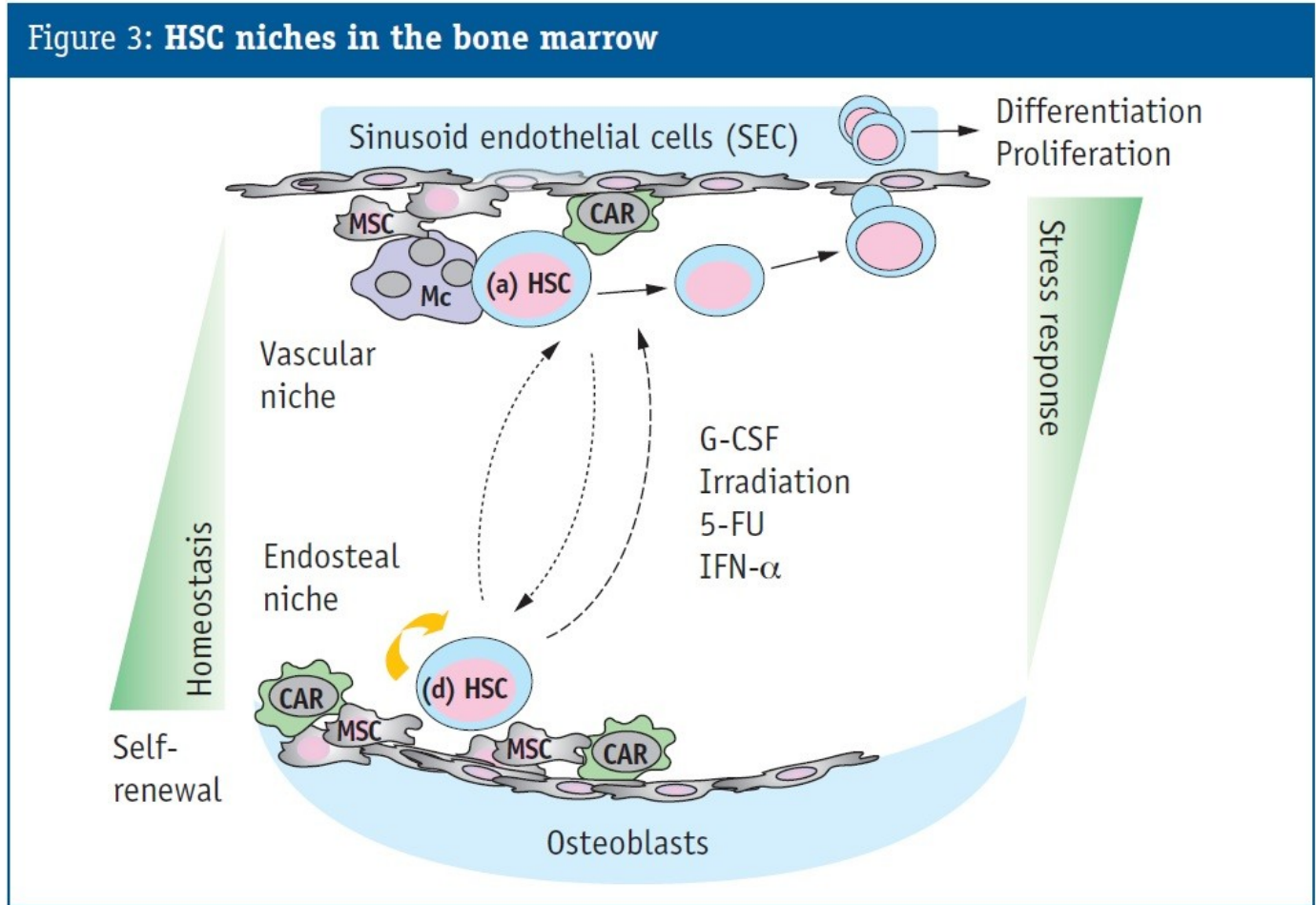
Téměř a zcela **zralé krevní buňky.**

# Hematopoetická kmenová buňka (HSC)

- Osteoblastická nika
- Vaskulární nika
- CXCL12 (**stromal cell-derived factor 1, SDF1**) reguluje migraci HSCs
- Stromální buňky podporují hematopoézu – např. produkcí c-Kit ligandu
- Další cytokiny – interleukiny (IL), trombopoetin (Tpo), erythropoetin (Epo) ovlivňují funkci progenitorů



# Hematopoetická kmenová buňka (HSC)



*(d): dormant HSCs, (a): activated HSCs; MSC: mesenchymal stem cells; CAR: CXCL12-expressing reticular cells; Mc: monocytes/macrophages*

# Hematopoetická kmenová buňka (HSC)

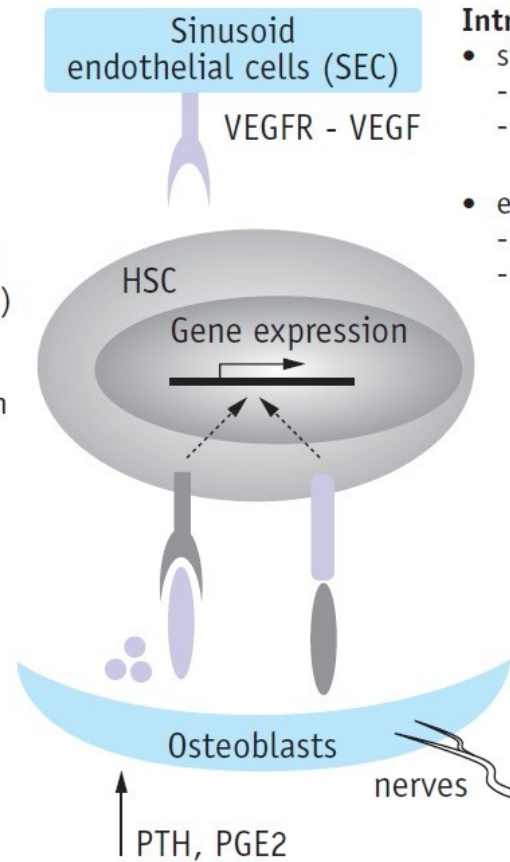
Figure 4: Regulatory mechanisms in HSC niches in the bone marrow

### Extrinsic mechanisms

- cytokines
- chemokines
- negative regulators (osteopontin)
- adhesion molecules
- proteases (MMP-9, cathepsin K)
- hormones (PTH, PGE2)
- sympathetic nerves
- oxygen status
- calcium concentration
- circadian rhythm

quiescence  
self-renewal  
expansion

Ang-1 - tie2  
SCF - c-kit  
Flt3-L - flt3  
TPO - mpl  
Wnt - frizzled  
jagged/Delta - Notch



### Intrinsic mechanisms

- signalling molecules
  - cytoplasmic
  - nuclear, including transcription factors
- epigenetic mechanisms
  - DNA/histone modif.
  - microRNAs

cell-cell  
adhesion  
migration

Cadherins  
VCAM - VLA  
ICAM - LFA  
CXCL12 - CXCR4  
HA - CD44

# Cytokiny v hematopoéze

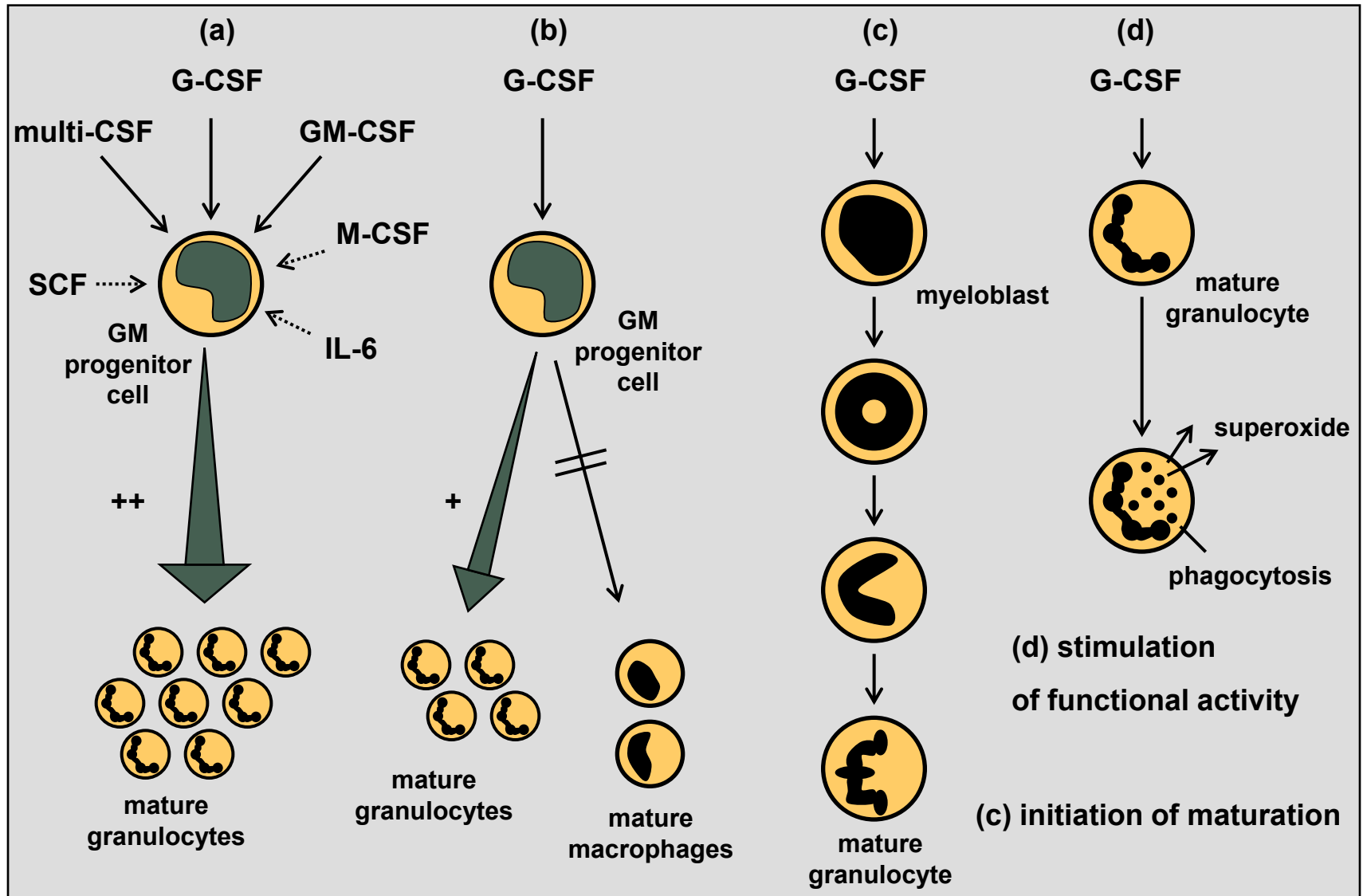
| Cytokine <sup>a</sup>                            | Symbol        | Source  | Target  |
|--|---------------|---|---|
| Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor | GM-CSF        | T cells, endothelial cells, fibroblasts                   | CMP, ErP, GMP, EoP, BaP, MKP, all granulocytes, erythrocytes    |
| Granulocyte colony-stimulating factor            | G-CSF         | Endothelial cells, monocytes                              | ErP, GMP, EoP, BaP, MKP   |
| Monocyte colony-stimulating factor               | M-CSF         | Monocytes, macrophages, endothelial and adventitial cells | GMP, MoP, monocytes, macrophages, osteoclasts                   |
| Erythropoietin                                   | EPO           | Kidney, liver   | CMP, MEP, ErP   |
| Thrombopoietin                                   | TPO           | Bone marrow   | MKP, megakaryocytes   |
| Interferon- $\gamma$                             | IFN- $\gamma$ | CD4 <sup>+</sup> T cells, NK cells                        | B cells, T cells, NK cells, neutrophils, monocytes              |
| Interleukin 1                                    | IL-1          | Neutrophils, monocytes, macrophages, endothelial cells    | CD4 <sup>+</sup> T cells, B cells                               |
| Interleukin 2                                    | IL-2          | CD4 <sup>+</sup> T cells                                  | T cells, B cells, NK cells                                      |
| Interleukin 3                                    | IL-3          | CD4 <sup>+</sup> T cells                                  | CMP, ErP, GMP, EoP, BaP, MKP, all granulocytes, erythroid cells |
| Interleukin 4                                    | IL-4          | CD4 <sup>+</sup> T cells, mast cells                      | B cells, T cells, mast cells                                    |
| Interleukin 5                                    | IL-5          | CD4 <sup>+</sup> T cells                                  | EoP, eosinophils, B cells                                       |
| Interleukin 6                                    | IL-6          | Endothelial cells, neutrophils, macrophages, T cells      | CMP, ErP, GMP, B cells, T cells, macrophages, hepatocytes       |
| Interleukin 7                                    | IL-7          | Adventitial cells of bone marrow                          | Early pre-B, pre-T cells  |
| Interleukin 8                                    | IL-8          | Macrophages, endothelial cells                            | T cells, neutrophils  |
| Interleukin 9                                    | IL-9          | CD4 <sup>+</sup> T cells                                  | CD4 <sup>+</sup> T cells, CMP, ErP                              |
| Interleukin 10                                   | IL-10         | Macrophages, T cells                                      | T cells, B cells, NK cells                                      |
| Interleukin 11                                   | IL-11         | Macrophages   | CMP, ErP, GMP, T cells, B cells, macrophages, megakaryocytes    |

<sup>a</sup>Hemopoietic cytokines include colony-stimulating factors (CSFs), interleukins, and inhibitory factors. They are almost all glycoproteins with a basic polypeptide chain of about 20 kilodaltons. Nearly all of them act on progenitor stem cells, lineage-restricted progenitor cells, committed cells, and maturing and mature cells. Therefore, the targets listed above are target lines rather than individual target cells.

## Cytokiny

- Nízká MW (< 80 kDa), často bývají glykosylovány (glykoproteiny)
- účastní se imunity a zánětu, kde regulují intenzitu a délku trvání odpovědi
- jsou produkovány - lokálně, po přechodnou dobu
- působí zejména autokrinně a parakrinně
- jsou vysoce účinné (pM)
- interagují vysoce specificky s povrchovými receptory
- po vazbě na receptory indukují přenos signálu vedoucí k transkripci cílových genů, **výsledný efekt je závislý na konkrétním kontextu**
- působí v síti, kde
  - svoje efekty vzájemně ovlivňují (zejm. svoji produkci)
  - indukují transmodulaci povrchových receptorů
  - mohou působit na buněčné funkce aditivně, synergicky anebo antagonisticky

# Cytokiny jsou multifunkční

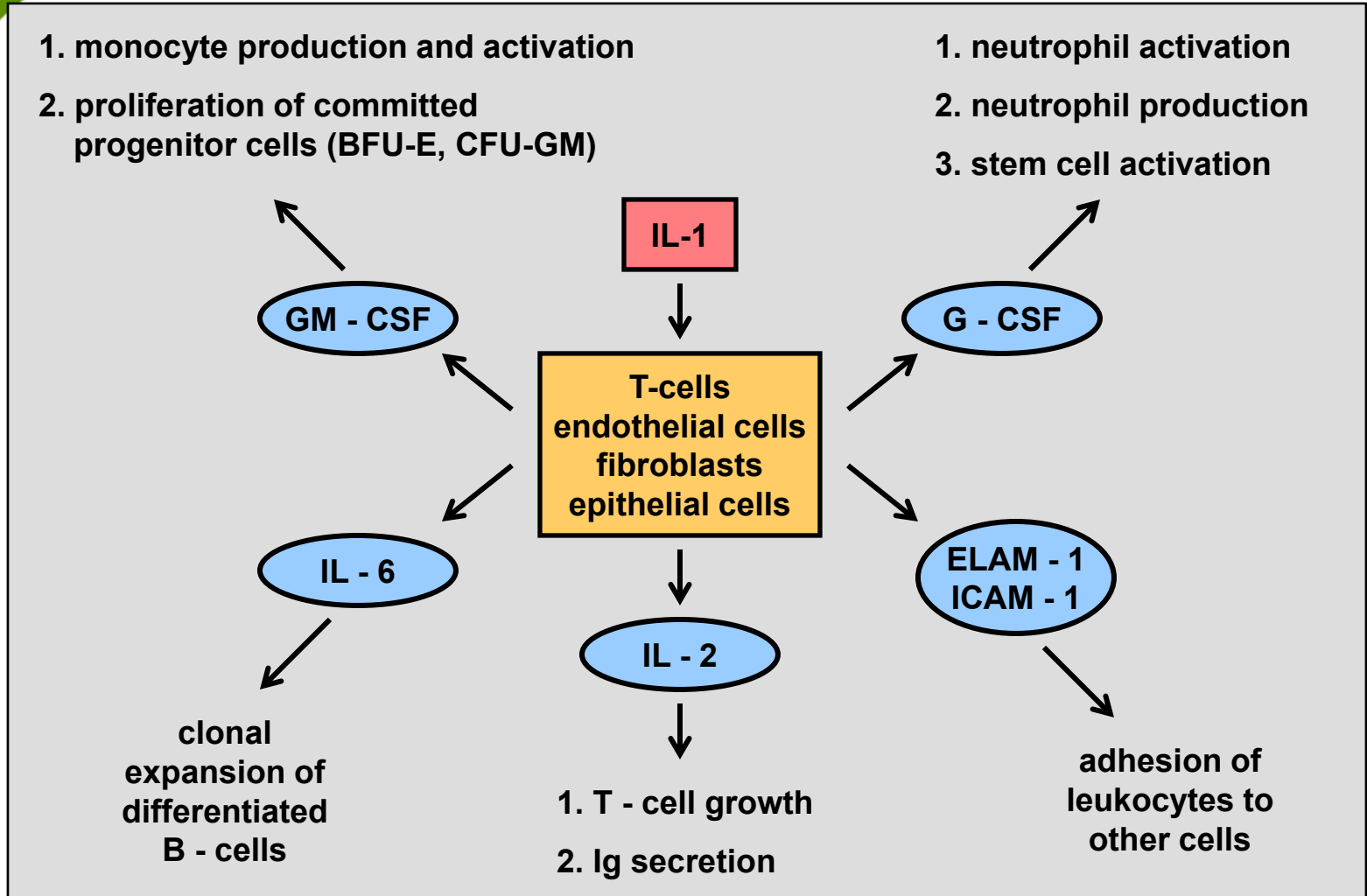


(a) cell production is dependent on regulator stimulation

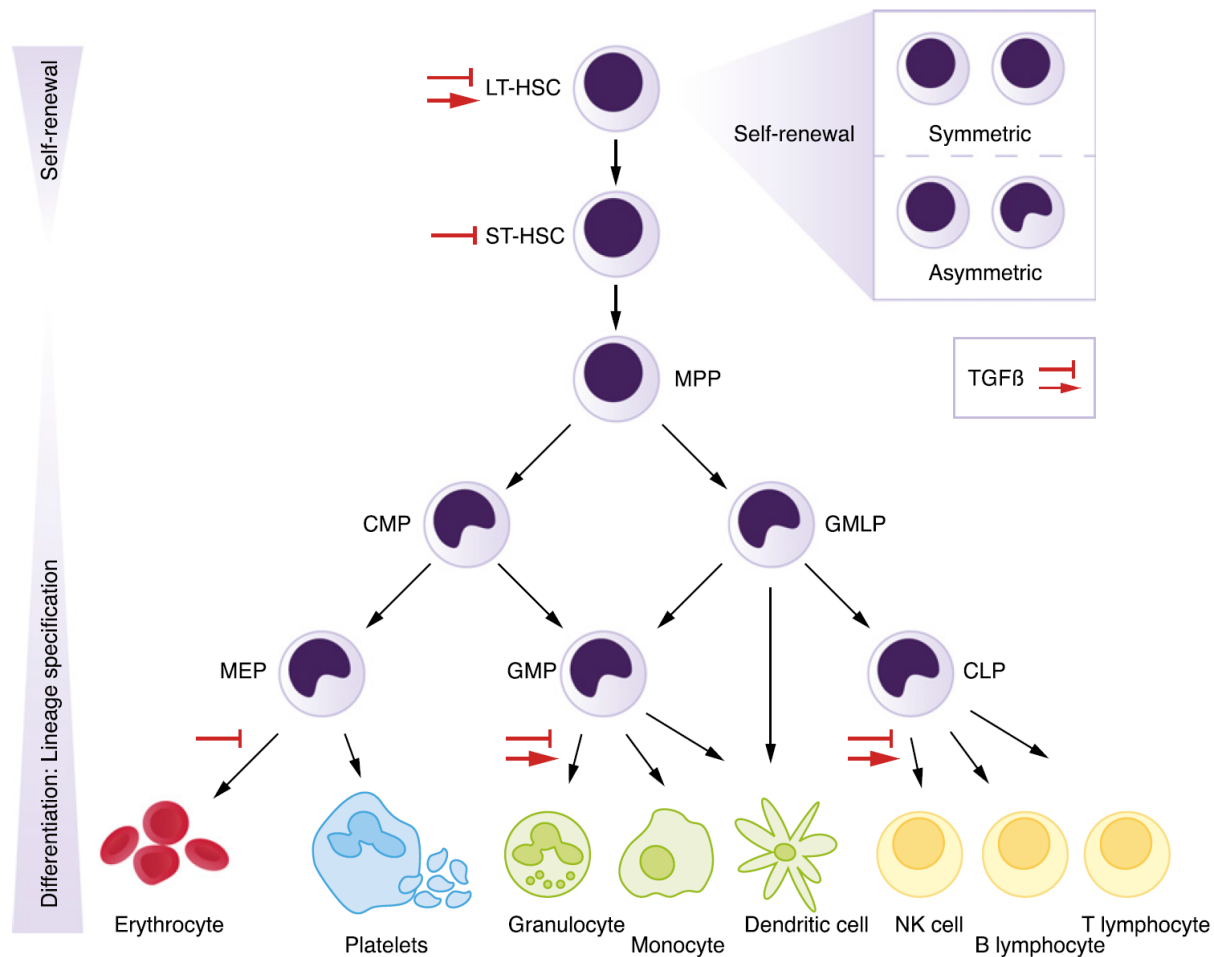
(b) induction of commitment to form cells in a restricted lineage



# Úloha IL – 1 v hematopoéze



# Úloha TGF- $\beta$ v hematopoéze



## TGF- $\beta$ signaling in the control of hematopoietic stem cells

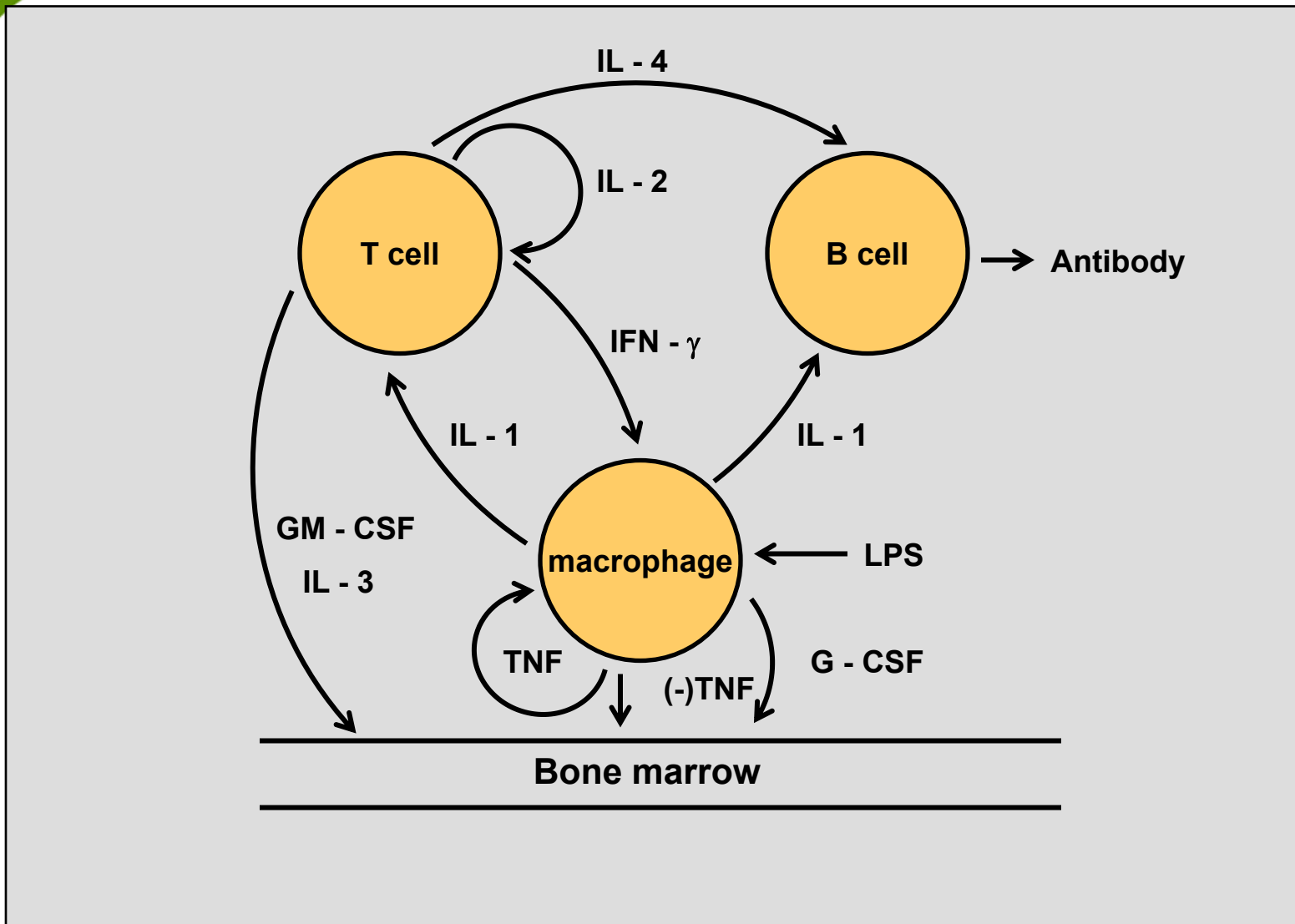
Ulrika Blank and Stefan Karlsson

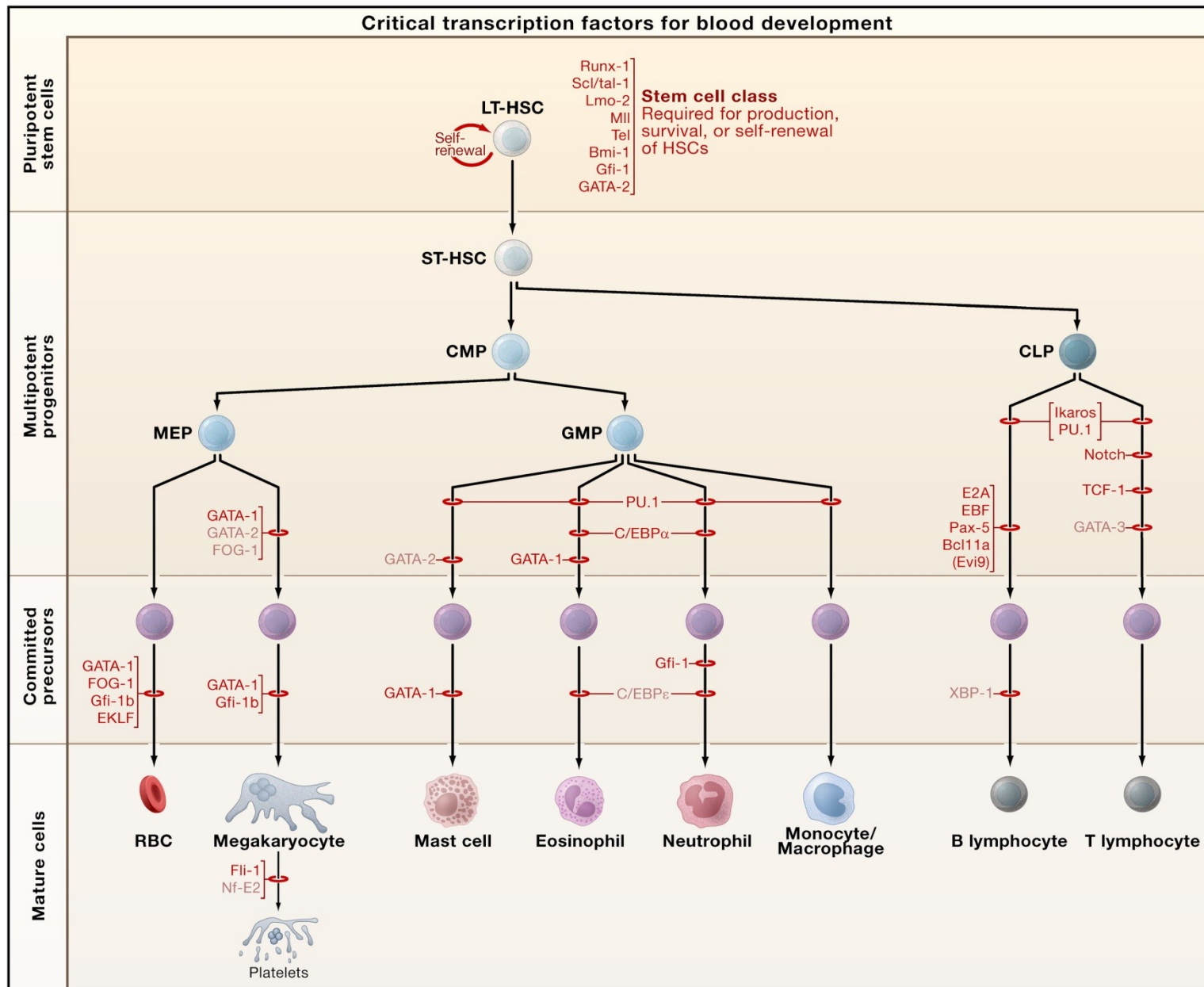
Division of Molecular Medicine and Gene Therapy, Lund Stem Cell Center, Lund University Hospital, Lund, Sweden



blood™

# Cytokiny působí v síti vzájemných interakcí





Cell 2008 132, 631-644 DOI: (10.1016/j.cell.2008.01.025)

LT-HSC, long-term hematopoietic stem cell; ST-HSC, short-term hematopoietic stem cell; CMP, common myeloid progenitor; CLP, common lymphoid progenitor; MEP, megakaryocyte/erythroid progenitor; GMP, granulocyte/macrophage progenitor; RBCs, red blood cells.

# Hierarchické působení transkripčních faktorů

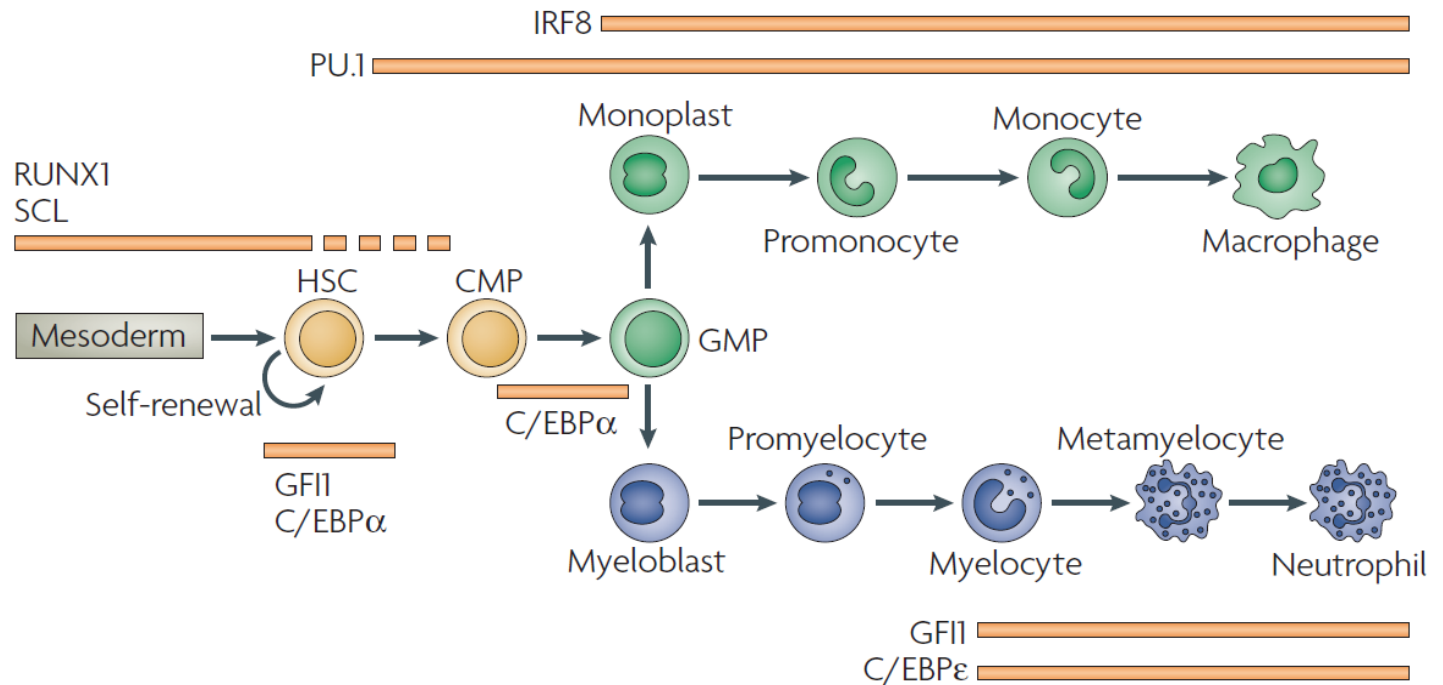


Table 1 | **Phenotypes of mice deficient in lineage-specific transcription factors involved in the myeloid system**

| Transcription factor | Site of expression   | Haematopoietic phenotype in knockout mice and conditional knockout mice  | References  |
|----------------------|--|--|-------------|
| RUNX1                | Haematopoietic cells, nervous tissue, skeletal muscle, reproductive tissue   | Knockout: lack of all definitive haematopoiesis<br>Conditional knockout: impaired megakaryocytic maturation, defective B-cell and T-cell development, myeloid proliferation      | 31,37,38    |
| SCL                  | Haematopoietic cells ('haemangioblasts', HSCs, multipotential progenitors, erythrocytes, megakaryocytes and mast cells), endothelial cells, brain tissue | Knockout: complete absence of yolk sac haematopoiesis, lack of angiogenesis<br>Conditional knockout: decreased erythrocytes and megakaryocytes, impaired ST-HSCs, normal LT-HSCs | 39,133–135  |
| PU.1                 | Haematopoietic cells (HSCs, CMPs, CLPs, GMPs, monocytes, granulocytes and B cells)   | Knockout: lack of mature myeloid cells and B cells<br>Conditional knockout: block prior to CMP and CLP stages, increased granulopoiesis, defective HSCs                          | 23,24,40,41 |
| C/EBP $\alpha$       | Haematopoietic cells (HSCs, CMPs, GMPs and granulocytes), liver, adipose tissue  | Knockout: lack of GMPs and granulocytes, impaired monocytes, increased immature myeloid cells<br>Conditional knockout: same as knockout mice, plus increased HSC self-renewal    | 26,54       |
| IRF8                 | Haematopoietic cells (B cells, macrophages, dendritic cells and stimulated T cells)  | Knockout: increased susceptibility to viral infections, increased granulocytic cells, CML-like disease   | 30          |
| GFI1                 | Sensory epithelial cells in the inner ear, neuroendocrine cells of the lungs, neutrophils, B and T cells, HSCs   | Knockout: reduction in earliest lymphoid progenitors, complete block in late neutrophil maturation, defective HSCs   | 29,70–72    |
| C/EBP $\epsilon$     | Preferentially in myeloid and lymphoid cells   | Knockout: abnormal late neutrophil maturation, block in eosinophil development, defective macrophage function  | 28,136      |

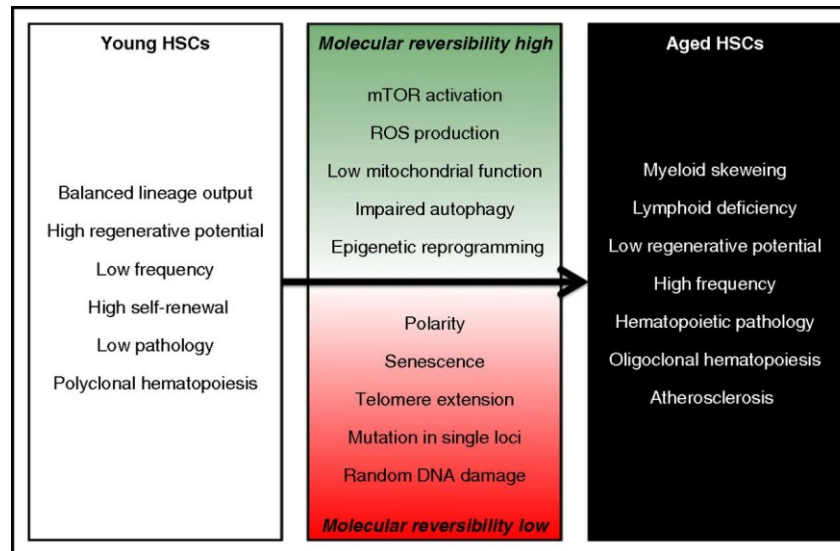
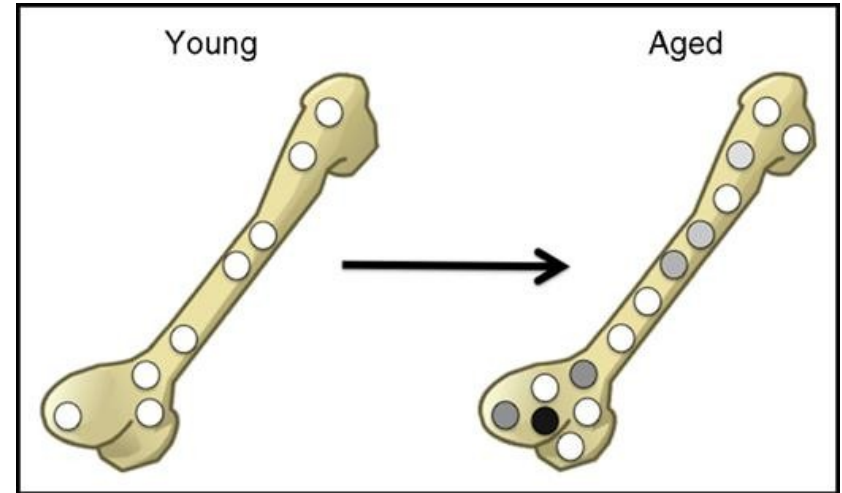
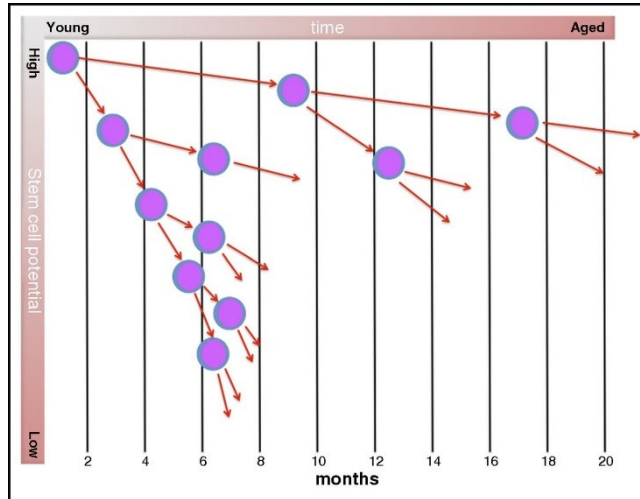
C/EBP, CCAAT/enhancer binding protein; CLP, common lymphoid progenitor; CML, chronic myeloid leukaemia; CMP, common myeloid progenitor; GFI1, growth-factor independent 1; GMP, granulocyte/monocyte progenitor; IRF8, interferon-regulatory factor 8; LT-HSC, long-term haematopoietic stem cell; PU.1, transcription factor encoded by *SP11*; RUNX1, runt-related transcription factor 1; SCL, stem-cell leukaemia factor; ST-HSC, short-term haematopoietic stem cell.

Table 2 | **Examples of transcription factor mutations in patients with AML**

| Transcription factor        | Mutations and effects   | Frequency in AML                                    | FAB system subtype                                 | References |
|-----------------------------|---|---|--|------------|
| RUNX1-ETO (t(8;21))         | RUNX1 DNA-binding domain fused to the transcriptional corepressor ETO; downregulates expression or activity of PU.1, C/EBP $\alpha$ and RUNX1 | 12–15%  | M2   | 137        |
| CBF $\beta$ -MYH11 (inv16)  | Inversion of breaks in chromosome 16; joins CBF $\beta$ with the myosin gene <i>MYH11</i>   | 8–10%   | M4 <sub>Ed</sub>                                   | 137        |
| PML-RAR $\alpha$ (t(15;17)) | <i>PML</i> gene fused to <i>RARA</i> ; blocks myeloid transcription factors (such as C/EBP $\alpha$ and PU.1)                                 | 6–7%  | M3   | 138        |
| MLL fusions (t11q23)        | <i>MLL</i> gene fused with one of 30 distinct genes encoding partner proteins; believed to dysregulate HOX genes                              | 4–7%  | Diverse pattern of myeloid and lymphoid leukaemias | 139        |
| C/EBP $\alpha$              | Amino-terminal dominant negative; carboxy-terminal loss of DNA binding  | 7–9%  | M1, M2 (most), M4 (rare)                           | 56,140,141 |
| GATA1                       | Amino-terminal dominant negative  | Nearly 100% in AMKL associated with Down's syndrome | M7 with Down's syndrome                            | 96,97      |
| PU.1                        | Mutations decrease heterodimer formation and DNA binding*; PU.1 activity downregulated by RUNX1-ETO, PML-RAR $\alpha$ and FLT3-ITD            | <7%   | M0, M4, M5, M6                                     | 3          |
| RUNX1                       | Missense, nonsense or frameshift mutations (often biallelic); clustered within the runt domain  | 9%  | M0 (most)  | 108        |

\*Japanese cohort only. AML, acute myeloid leukaemia; AMKL, acute megakaryoblastic leukaemia; CBF $\beta$ , core-binding factor- $\beta$ ; C/EBP $\alpha$ , CCAAT/enhancer binding protein- $\alpha$ ; FAB, French-American-British; FLT3, FMS-related tyrosine kinase 3; GATA1, GATA-binding protein 1; HOX, homeobox; ITD, internal tandem duplication; MLL, mixed lineage leukaemia; MYH11, myosin heavy chain 11; PML, promyelocytic leukaemia; PU.1, transcription factor encoded by *SPI1*; RAR $\alpha$ , retinoic acid receptor- $\alpha$ ; RUNX1, runt-related transcription factor 1.

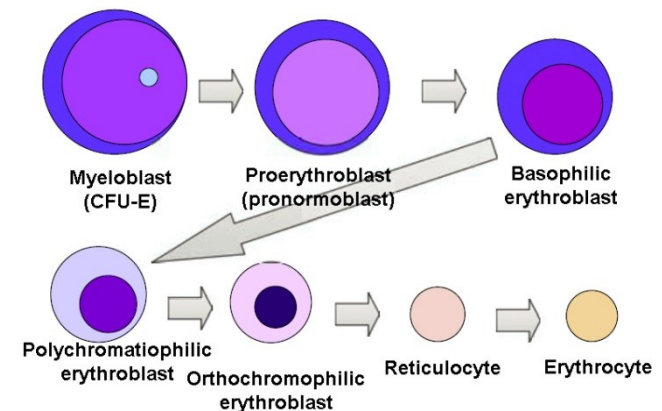
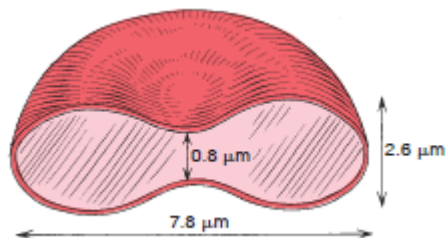
# Stárnutí hematopoetických kmenových buněk





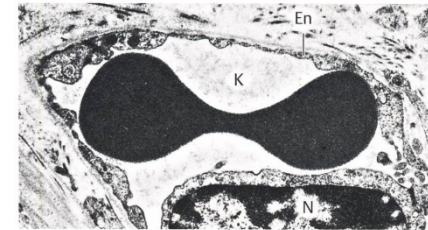
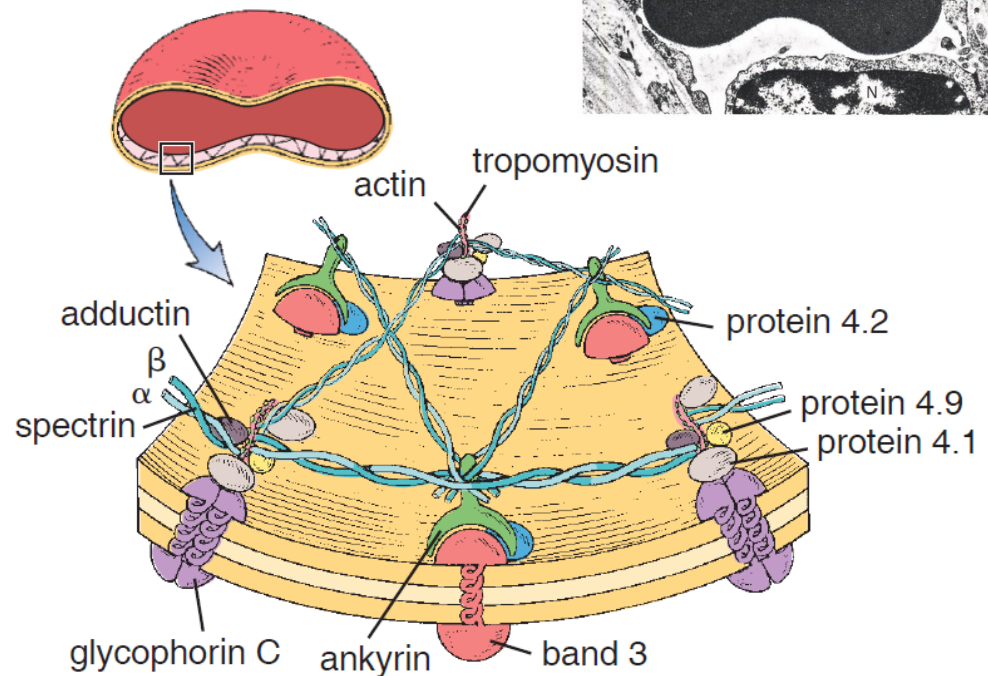
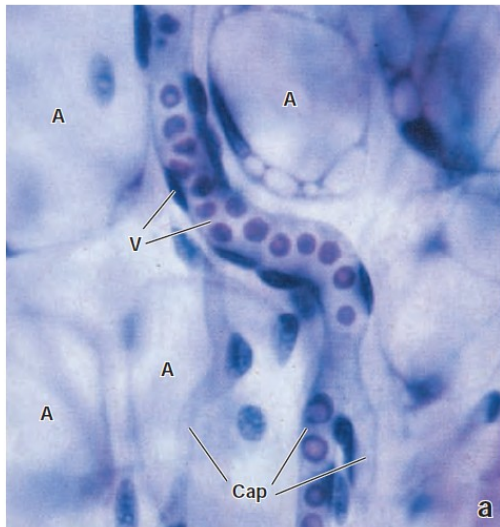
# Erytrocyty

- Buňky (bikonkávní disky,  $7,5 \mu\text{m}$ ) bez jádra a dalších organel (u savců), malé kondenzované jádro a organely u ptáků plazů, obojživelníků a ryb
- Vnikají z jaderných prekurzorových buněk
- Obsahují hemoglobin, 95% všech proteinů erytrocytu
- Vývoj v kostní dřeni cca 8 dní
- Doba života cca 120 dní
- Staré erytrocyty likvidovány makrofágy v kostní dřeni, v játrech a slezině



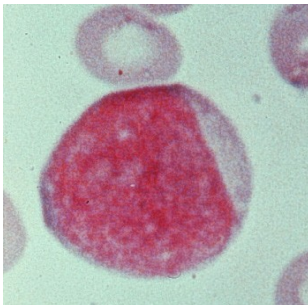
## Membránová organizace erytrocytu

- Plochá síť filament spektrinu propojena krátkými filamenti aktinu je ukotvena pomocí adaptorových proteinů k membráně
- Jsou pasivně tvarovatelné, důležité pro prostupnost kapilárami, stárnoucí buňky ztrácí flexibilitu

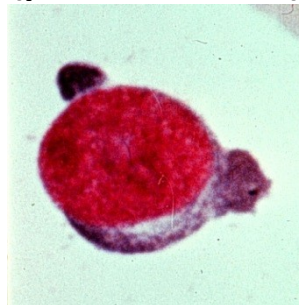


## Vývojová stádia erytrocytů

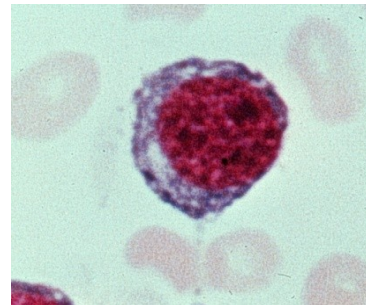
kmenová  
buňka



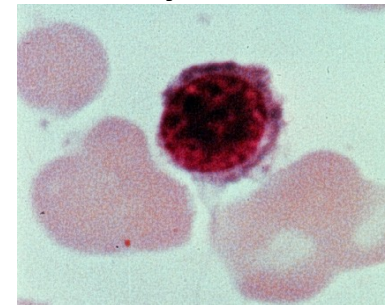
proerytroblast  
(pronormoblast)



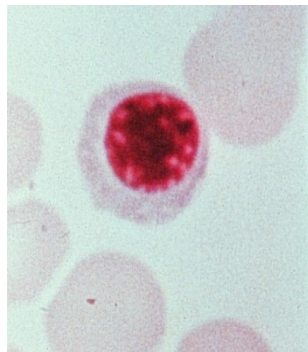
basofilní erytroblast



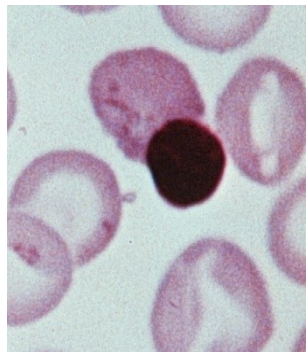
polychromatofilní  
erytroblast



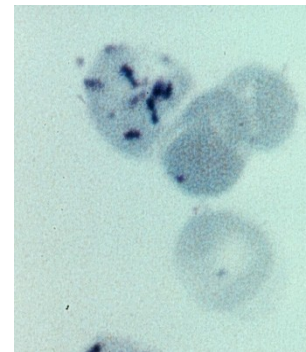
ortochromatofilní  
erytroblast  
(normoblast,  
metaerytroblast)



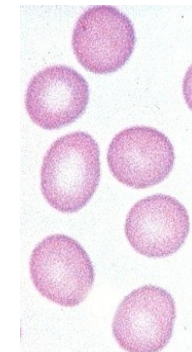
ortochromatofilní  
erytroblast  
extrudující jádro



reticulocyt  
(polychromatofilní  
erytrocyt)



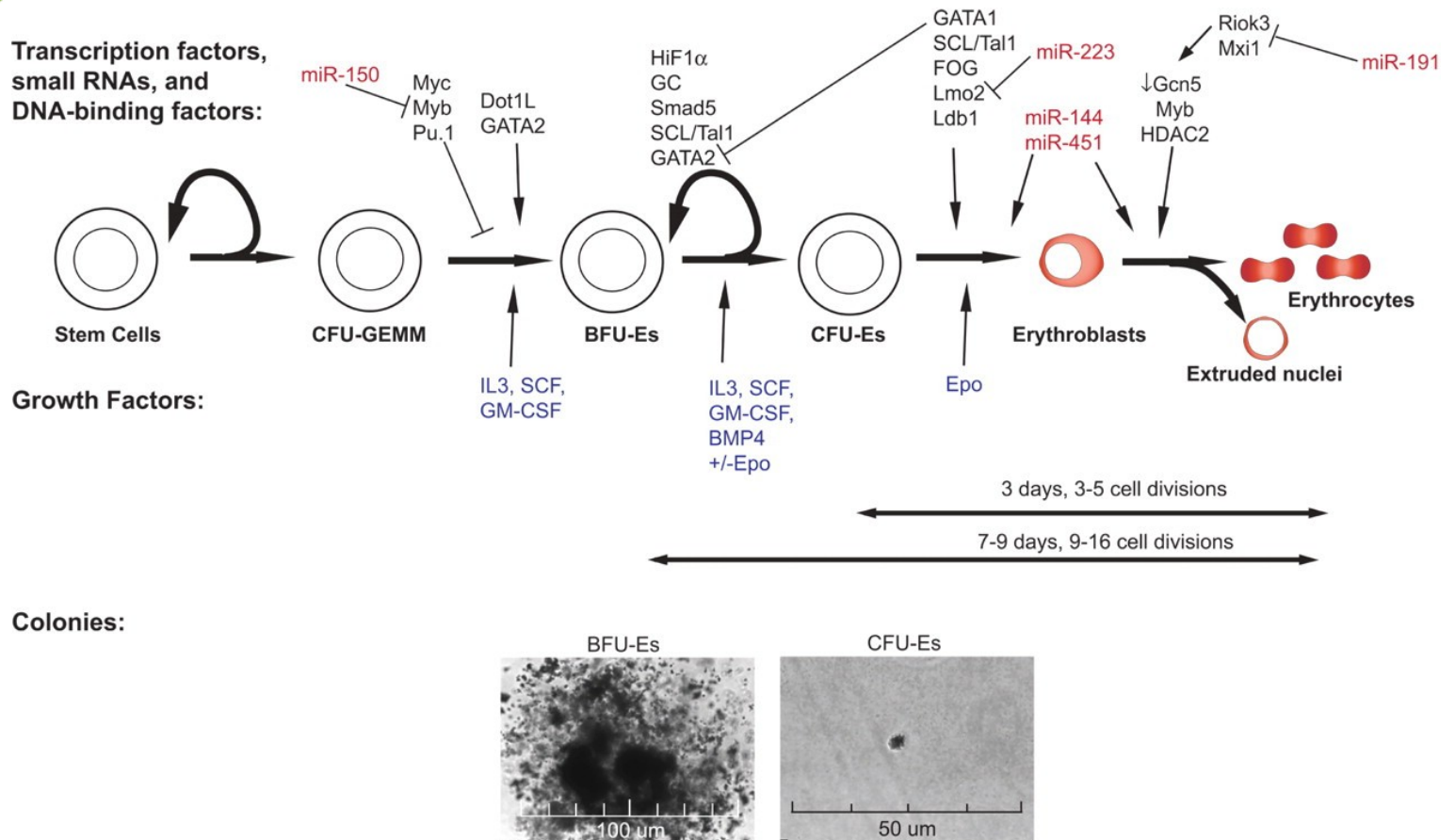
zralý erytrocyt



## Regulace erythropoézy

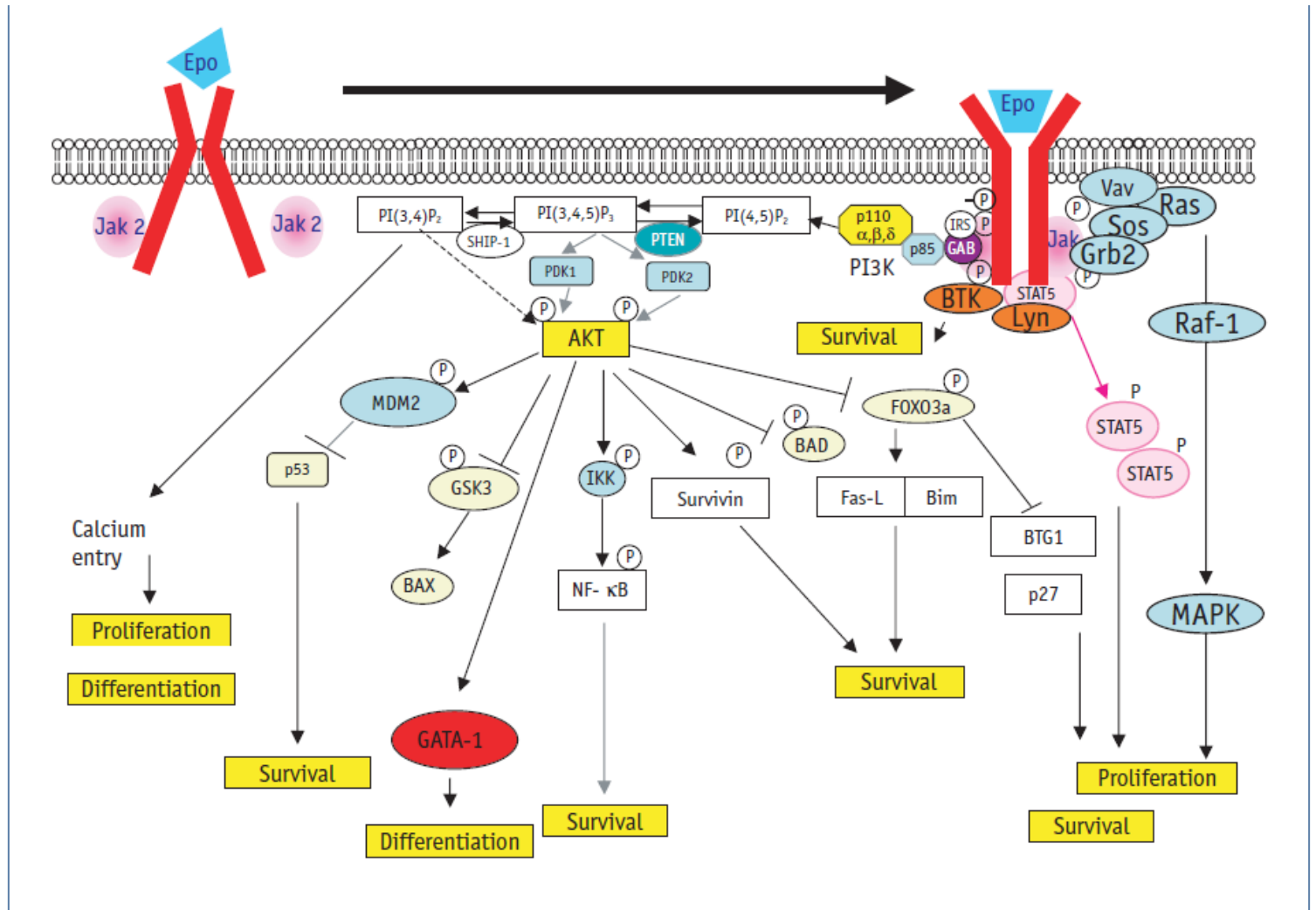
- **Obecné faktory**
  - hypoxie → erythropoietin (embryogeneze - játra, po narození v peritubulárních buňkách kortexu ledvin)
  - růstové faktory, hormony (testosteron vs. estrogeny)
  - vitamíny
- **Maturační faktory**
  - Vitamin B 12
  - Folic acid
- **Faktory nezbytné pro produkci hemoglobinu**
  - Vitamin C – napomáhá absorpci železa ( $Fe^{+++}$  -  $Fe^{++}$ )
  - Proteiny – aminokyseliny pro syntézu globinu
  - Železo a měď pro syntézu hemu
  - Vápník, kobalt, nikl

# Regulace erytropoézy



Shilpa M. Hattangadi et al. Blood 2011;118:6258-6268

# Erythropoéza a EpoR



## Cyklistická legenda

# Vinen! Armstrong přišel o tituly z Tour, do smrti nesmí závodit


















22.10.2012 13:20 Aktualizováno 09.10. 19:32

SDÍLEJTE:

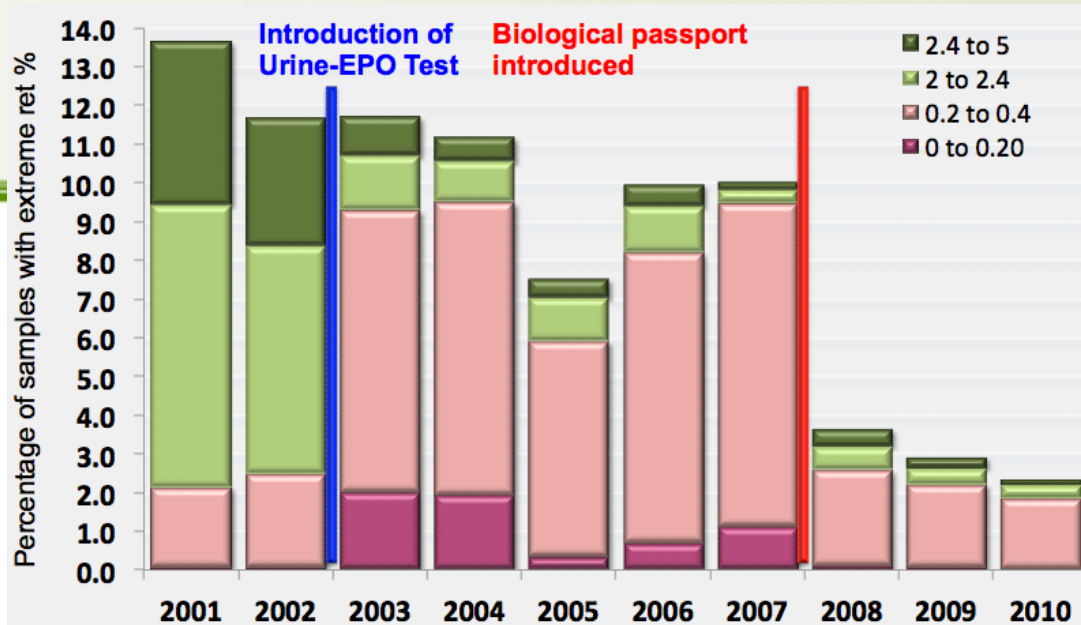


Mezinárodní cyklistická unie potvrdila, že Američan Lance Armstrong přišel kvůli dopingu o sedm titulů z Tour de France a má doživotní zákaz startu. Její zástupci v pondělí na tiskové konferenci oznámili, že souhlasí se sankcemi, které bývalému závodníkovi udělila Americká antidopingová agentura.

# Fyziologie buň. systémü

|                       | 1996   | 1997  | 1998   | 1999  | 2000   | 2001   | 2002  | 2003   | 2004   | 2005   | 2006   | 2007  | 2008  | 2009  | 2010  | 2011  | 2012  |
|-----------------------|--|---|--|---|--|--|---|--|--|--|--|---|---|---|---|---|---|
| <b>1<sup>st</sup></b> | <br>Bjarne Riis       | <br>Jan Ullrich      | <br>Marco Pantani | <br>Lance Armstrong    | <br>Lance Armstrong | <br>Lance Armstrong | <br>Lance Armstrong   | <br>Lance Armstrong       | <br>Lance Armstrong | <br>Lance Armstrong | <br>Floyd Landis    | <br>Alberto Contador | <br>Carlos Sastre  | <br>Alberto Contador | <br>Alberto Contador | <br>Cadel Evans    | <br>Bradley Wiggins    |
| <b>2<sup>nd</sup></b> | <br>Jan Ullrich       | <br>Richard Virenque | <br>Jan Ullrich   | <br>Alex Zülle         | <br>Jan Ullrich     | <br>Jan Ullrich     | <br>Joseba Beloki     | <br>Jan Ullrich           | <br>Andreas Klöden  | <br>Ivan Basso      | <br>Oscar Pereiro   | <br>Cadel Evans      | <br>Cadel Evans    | <br>Andy Schleck     | <br>Andy Schleck     | <br>Andy Schleck   | <br>Christopher Froome |
| <b>3<sup>rd</sup></b> | <br>Richard Virenque | <br>Marco Pantani   | <br>Bobby Julich | <br>Fernando Escartin | <br>Joseba Beloki  | <br>Joseba Beloki  | <br>Raimondas Rumsas | <br>Alexandre Vinokourov | <br>Ivan Basso     | <br>Jan Ullrich    | <br>Andreas Klöden | <br>Levi Leipheimer | <br>Bernhard Kohl | <br>Lance Armstrong | <br>Denis Menchov   | <br>Frank Schleck | <br>Vincenzo Nibali   |





File Datasheet Help

### Athlete's Biological Passport ABP

Athlete ID: **LAD 00481**

Datasheet: Athlete, Haematology, Steroidology, Endocrinology, Models, Results

Results

**HGB** (seq HGB: prob= 11%)

**OFFS** (seq OFFS: prob= 44%)

**ABPS** (seq ABPS: prob= 2%)

**RET%** (seq RET%: prob= 26%)

data:  haematology,  steroidology,  endocrinology

display:  ordinal,  temporal

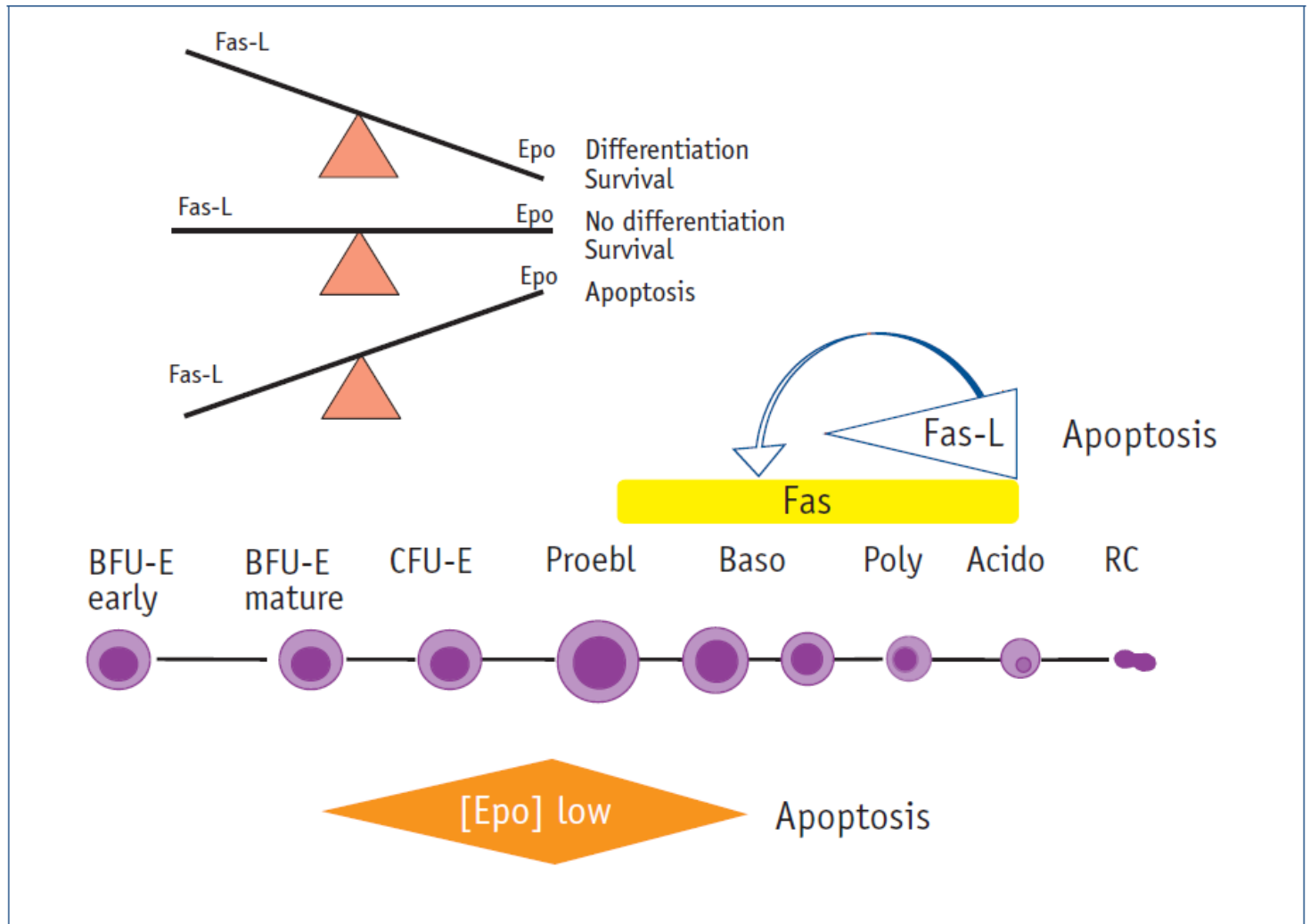
markers:  Haemoglobin,  OFF-score,  ABPS,  reticulocytes %,  tHGB mass,  OFF-mass

[update](#)

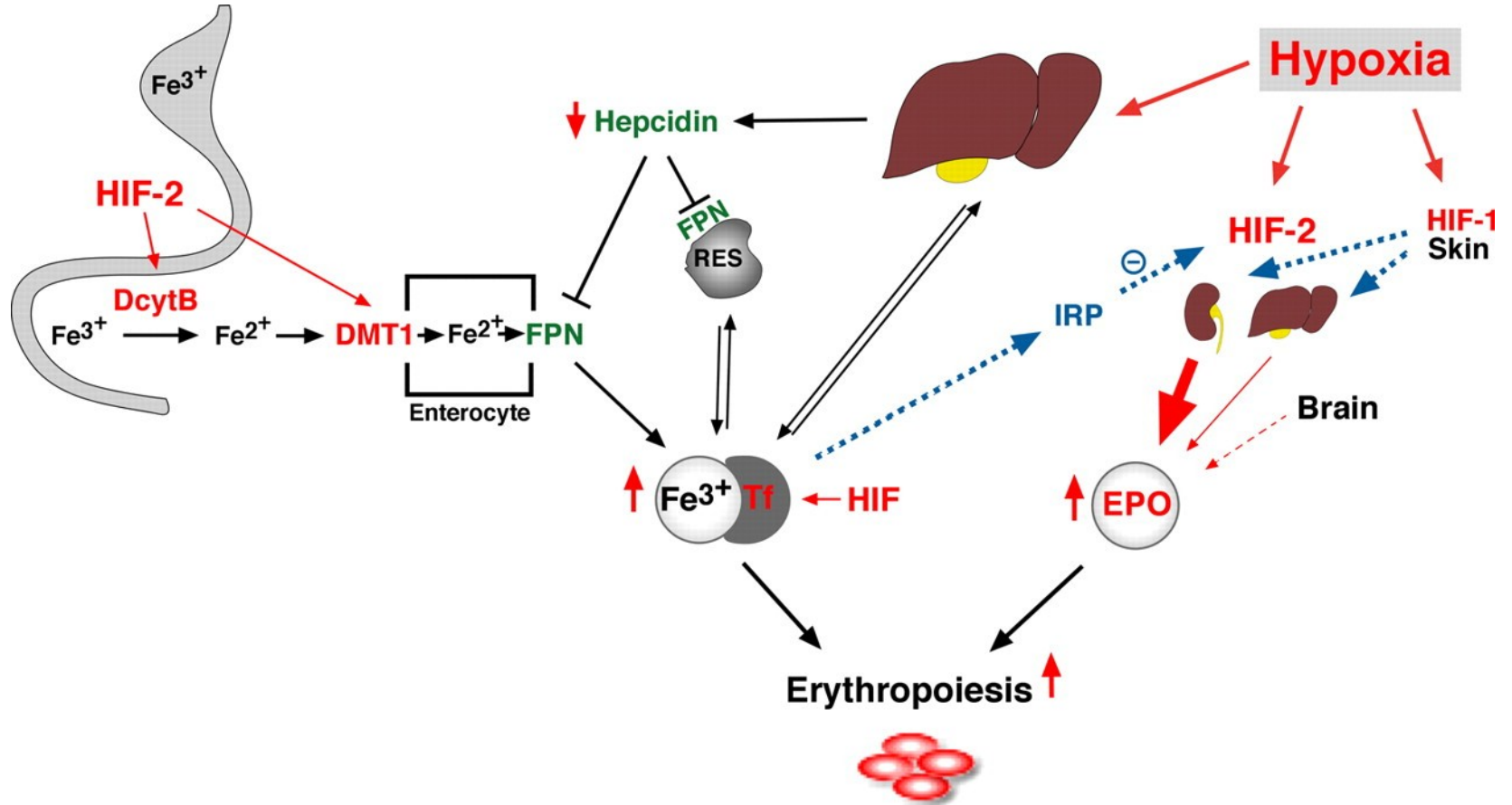
[new](#) [open](#) [save](#) [calculate](#) [export](#) [print](#) [quit](#)

Version: 2.1.2  
Date: 05/2009  
Pierre-Edouard Sottas

# Regulace erytropoézy



# Hypoxie koordinuje syntézu EPO s metabolismem železa

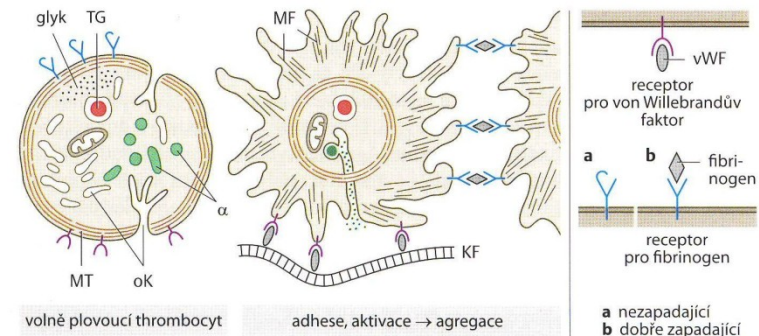
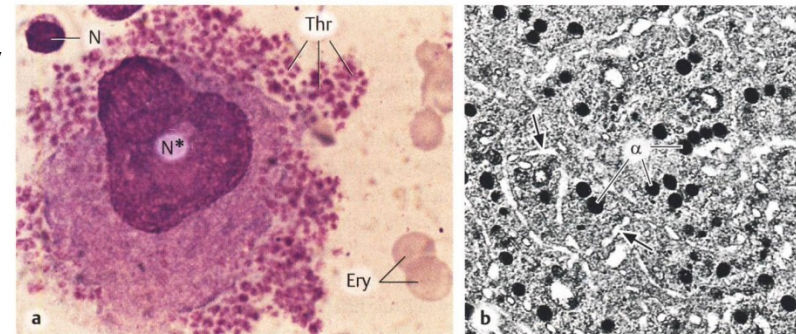


Volker H. Haase Am J Physiol Renal Physiol 2010;299:F1-F13

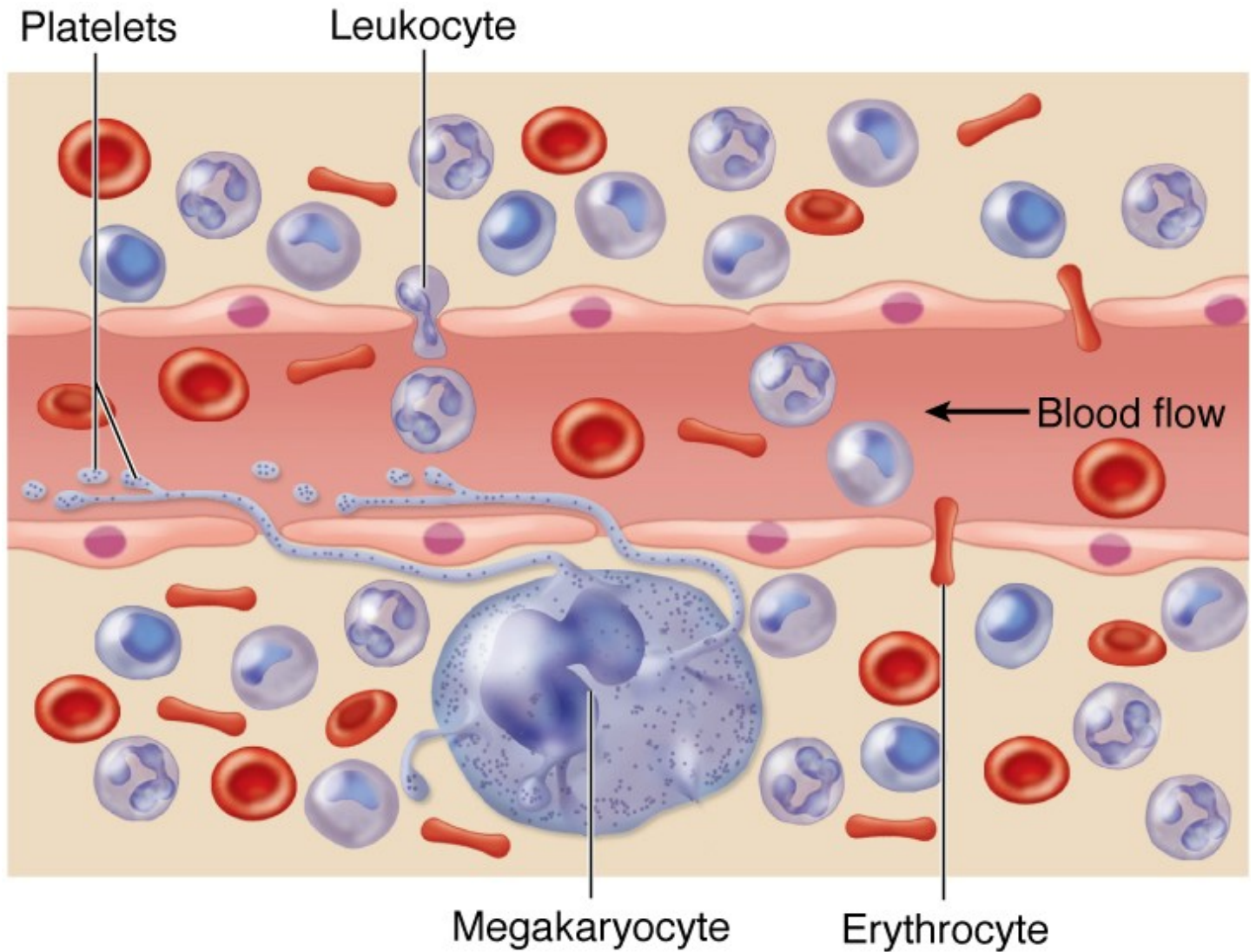
# Trombocyty

- ◆ Krevní destičky, 250 tis./ul
  - ◆ Klíčová role při srážení krve
  - ◆ Bejzaderné fragmenty megakaryocytů
  - ◆ postupné zvětšování buňky jako výsledek tzv. endomitózy (replikace chromosomů bez rozdělení jádra)
  - ◆ vznik obrovské polyploidní buňky (až 64 sad chromosomů) – megakaryocytu (až **150 μm**)
  - ◆ vznik cytoplazmatických granul
  - ◆ odštěpování fragmentů (trombocytů) z periferie (až 8 000 z jedné buňky)
  - ◆ stadia: megakaryoblast, promegakaryocyt, megakaryocyt
- ◆ V cirkulaci cca 10 dní, likvidace makrofágy sleziny

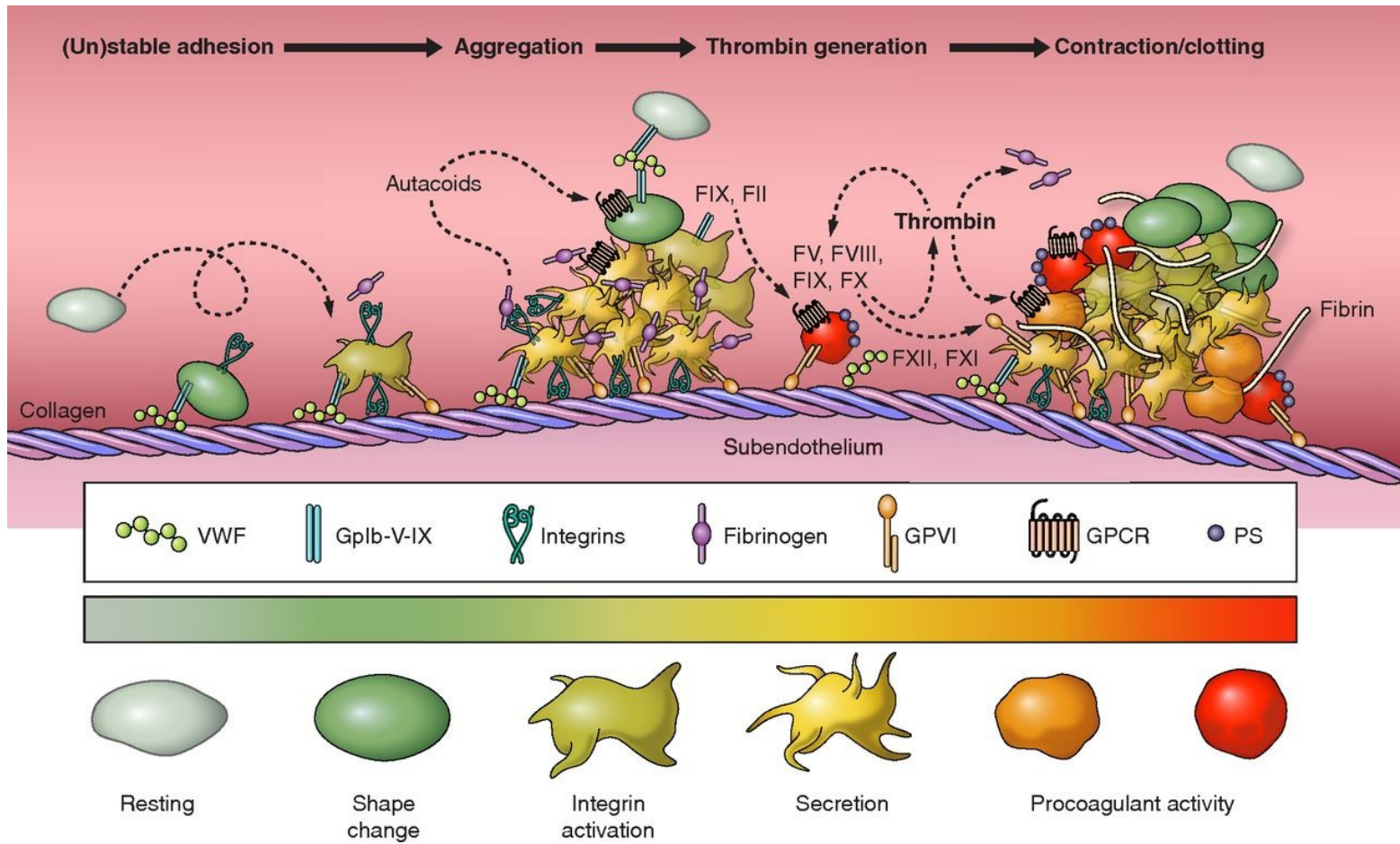
- ◆ Tvar bikonvexního disku, 2,5μm
- ◆ Tvar udržován mikrotubuly
- ◆ Na membráně receptory pro adhezi
- ◆ Obnažený kolagen při poranění cévy vyvolá adhezi - > aktivace, vytvoření pseudopodií a uvolnění granul



# Trombocyty



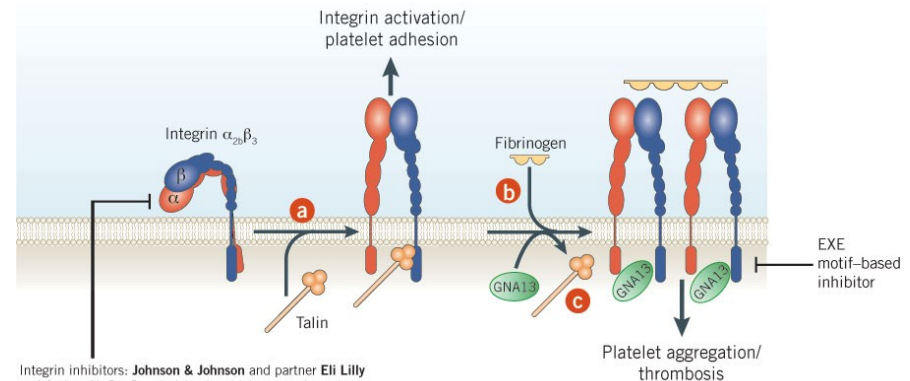
# Aktivace a adheze trombocytů



Henri H. Versteeg et al. *Physiol Rev* 2013;93:327-358

# Trombolýza

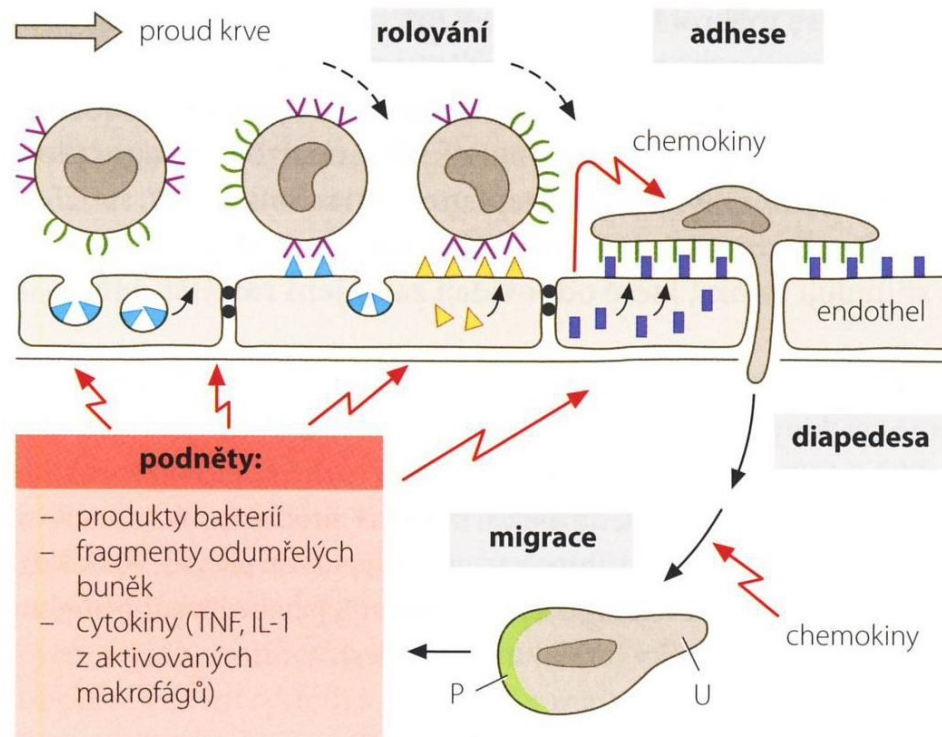
- léčebný proces, který má za cíl rozpuštění krevní sraženiny vzniklé v některé cévě (trombus), nebo zanesené do místa uzávěru krevním tokem z jiného místa (embolus)
- Aplikace látek která rozpouští krevní sraženiny, např. rekombinantních aktivátorů plazminogenu
- používá v akutních stavech, kdy je nutné sraženinu rozpustit rychle a účinně - ischemická mozková mrtvice, tepenný uzávěr na dolní končetině a klinicky se projevující masivní plicní embolie



Integrin inhibitors: **Johnson & Johnson** and partner **Eli Lilly and Co.**'s mAb ReoPro abciximab, which targets integrin  $\alpha_2\beta_1$  (CD49e/CD61) and integrin  $\alpha_3\beta_3$ , is marketed to treat angioplasty and to accompany percutaneous coronary interventions and is in Phase II to treat stroke. **Merck & Co. Inc.** markets Integrilin eptifibatid, a cyclic heptapeptide derived from a snake venom protein, and the nonpeptide antagonist Aggrastat tirofiban to treat coronary arterial indications and as a companion therapeutic for percutaneous coronary intervention. Both drugs target integrin  $\alpha_2\beta_3$ .

# Leukocyty

- Slouží k obraně organismu v **intersticiu**, 5 tis./ul krve
- Granulocyty, monocyty, lymfocyty
- Cirkulaci opouštějí po krátké době (kromě lymfocytů) a zůstávají v extravasálním prostoru



## endothel:

- ▲ P-selektin exponovaný exocytosou
- ▲ nově syntetizovaný E-selektin
- adhezí molekuly produkované aktivovaným endothelem

## leukocyt:

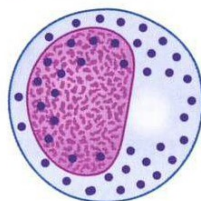
- ▲ ligand (glykoprotein) pro selektin
- ( ) integrin špatně zapadající
- || integrin dobře zapadající



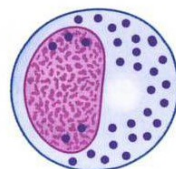
# Granulopoéza

- označení pro vývoj všech granulocytů (neutrofilních, eosinofilních a basofilních) nebo někdy jen vývoj neutrofilních granulocytů.
- Počáteční prekursory neutrofilních granulocytů jsou společné s monocyty. Na úrovni progenitorů GM-CFU se linie rozdělují.
- Granulocyty po dokončení diferenciace zrají v kostní dřeni a potom jsou uvolňovány do krevního řečiště. V případě zvýšené potřeby neutrofilů se uvolňují do krevního řečiště nezralé neutrofilny – tyčky.
- Z krve migrují do různých tkání na základě stimulace chemotaktickými faktory.

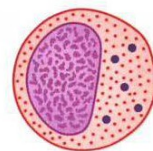
|                       |  |   |      |   |     |   |                |   |              |       |                    |   |       |   |      |
|-----------------------|--|---|------|---|-----|---|----------------|---|--------------|-------|--------------------|---|-------|---|------|
|                       | CFU-G  | → | MyBl | → | PMy | → | My,<br>nezralý | → | My,<br>zralý | →     | MMy                | → | tyčka | → | Segm |
| <b>procesy vývoje</b> | proliferace (cca 4 mitozy)<br>+ diferenciace |   |      |   |     |   | diferenciace   |   |              | krev  | inter-<br>sticiium |   |       |   |      |
| <b>trvání</b>         | cca 5 d                                      |   |      |   |     |   | cca 3 d        |   |              | < 1 d | 2–3 d              |   |       |   |      |



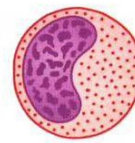
PMy



My, nezralý



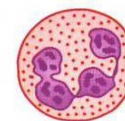
My, zralý



MMy



tyčka



Segm

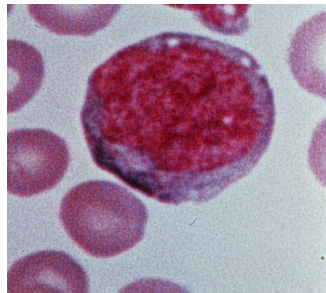
## Monocytopoéza

- obtížná identifikace stadií v běžném krevním nátěru
- monoblast, promonocyt, monocyt (vývoj trvá přibližně 55 hod.)
- změna tvaru jádra
- vývoj azurofilních granul (GER, GA)
- zralé vstupují do krve, cirkulují 8 - 16 hod., pak vstupují do tkání a dozrávají v různé typy makrofágů, které mají obvykle životnost několik měsíců

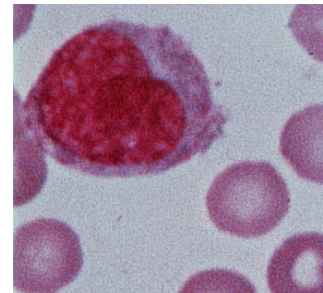
kmenová  
buňka



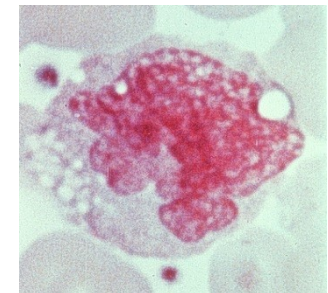
myeloblast



promonocyt

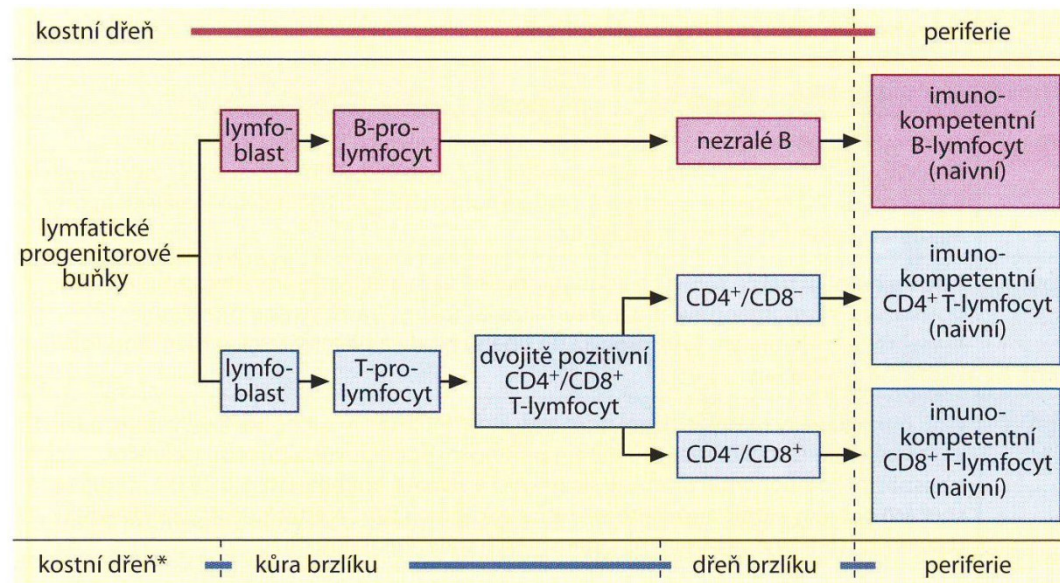


monocyt



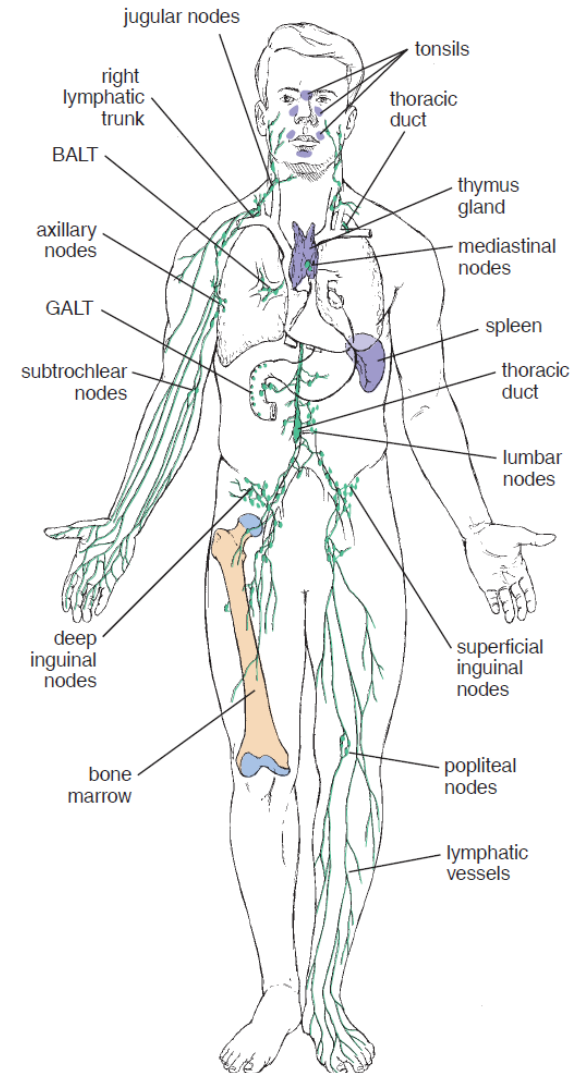
# Lymfocytopoéza

- progenitory všech lymfocytů vznikají v kostní dřeni
- některé migrují do thymu, kde se diferencují v T-lymfocyty
- ty, které zůstávají v kostní dřeni, se diferencují v B-lymfocyty a migrují do periferních lymfatických orgánů, kde se dále mohou množit (lymfatické uzliny, slezina)
- stadia: lymfoblast → 2-3 dělení → prolymfocyt (nemá ještě povrchové antigeny) → dělení → lymfocyt



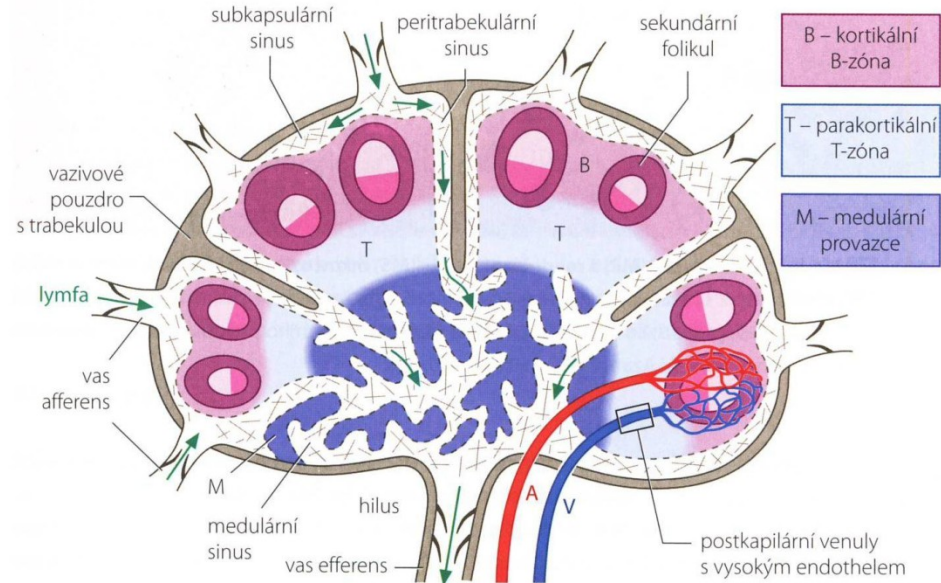
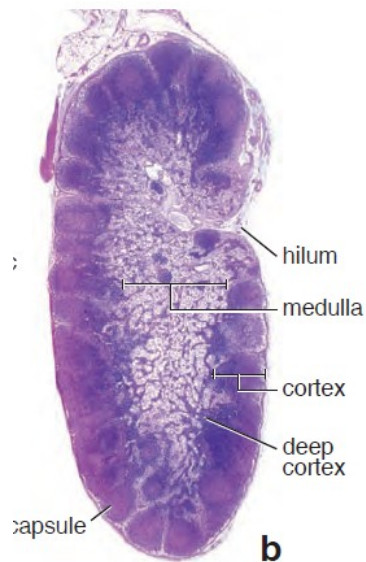
# Lymfatické orgány

- Primární
  - Kostní dřeň
  - Thymus (brzlík)
- Sekundární
  - Mízní uzliny
  - Slezina
  - Slizniční lymfatická tkáň (MALT)
  - Tonsily (mandle)
  - Peyerovy pláty
  - ...



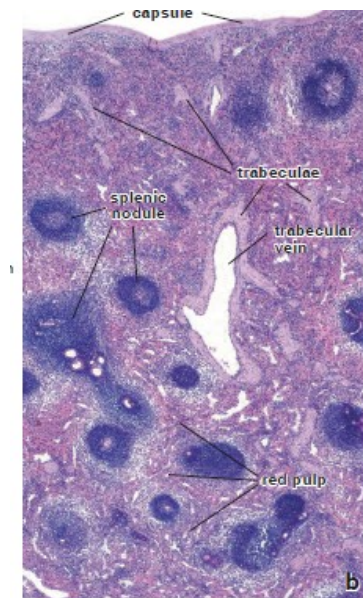
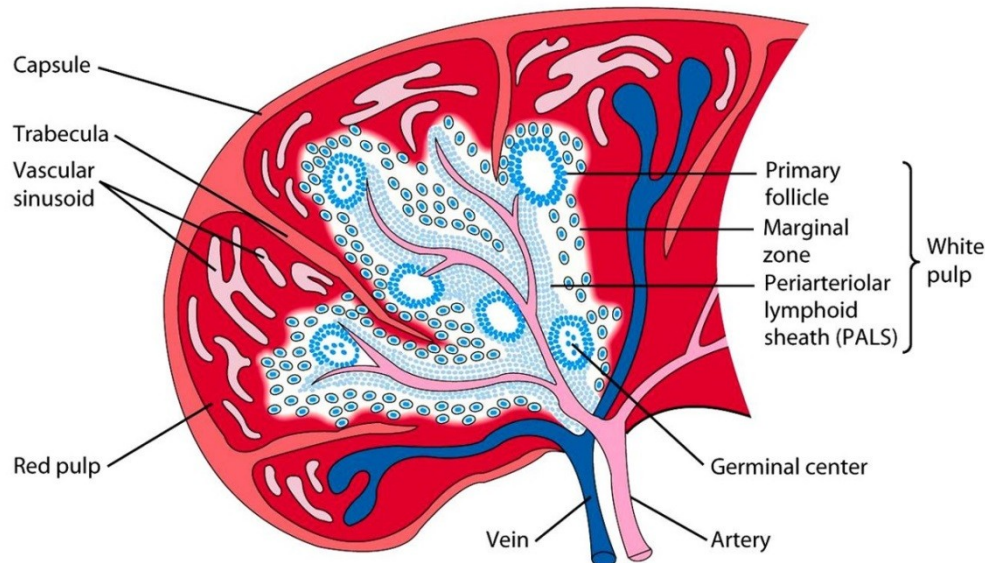
# Lymfatické uzliny

- ◆ Řetězec filtračních jednotek v systému lymfatických cév
  - ◆ vkleslina = hilus, vstup artérií, nervů, výstup vén, lymfatických cév
  - ◆ na povrchu – pouzdro = capsula – husté kolagenní vazivo → trabekuly
  - ◆ podkladem - retikulární vazivo (retikulární buňky, retikulární vlákna, základní amorfní hmota)
  - ◆ Kůra, cortex, B-zóna
  - ◆ Parakortikální oblast, T-zóna
  - ◆ Dřeň, medulla
- ◆ Kapilární prostory, lymfatický sinus, vystlány endoteliálními buňkami
- ◆ V případě aktivace zůstávají lymfocyty v uzlině, prolifерují a diferencují do efektorových buněk
- ◆ Neaktivované cirkulují, 5 mil. buněk/min vstupuje z krve do sekundárních lymfoidních orgánů



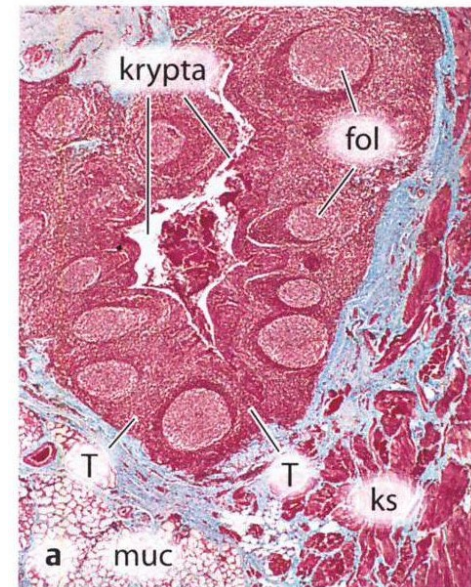
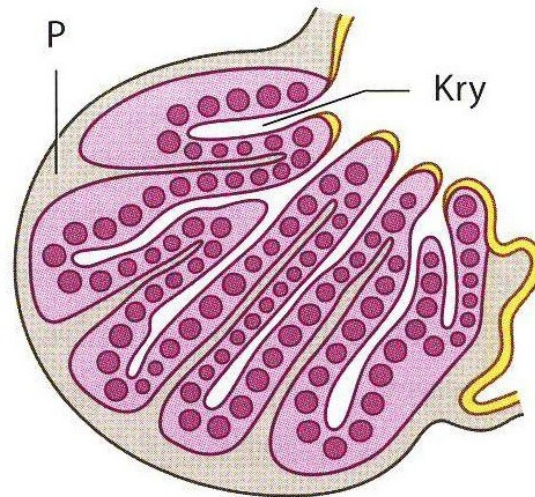
# Slezina

- ◆ Filtrační a imunitní orgán v krevním oběhu
- ◆ Funkce
  - ◆ Odstranění zestárlých a poškozených erytrocytů
    - ◆ Červená pulpa (vazivové retikulum protkané venózními sinusy)
    - ◆ Makrofágy pohlcují fagocytované erytrocyty – recyklace
      - ◆ Hemové železo navázáno na ferritin, transport pomocí transferinu do erythropoetických buněk
      - ◆ Z hemu vzniká bilirubin, v komplexu s albuminem transportován do jater, v konjugaci s kys. glukuronovou vyloučen z jater ve žluči
  - ◆ Sekundární lymfoidní orgán
    - ◆ Bílá pulpa, systém lymfatických folikulů (B- lymfocyty, folikulární dendritické buňky)



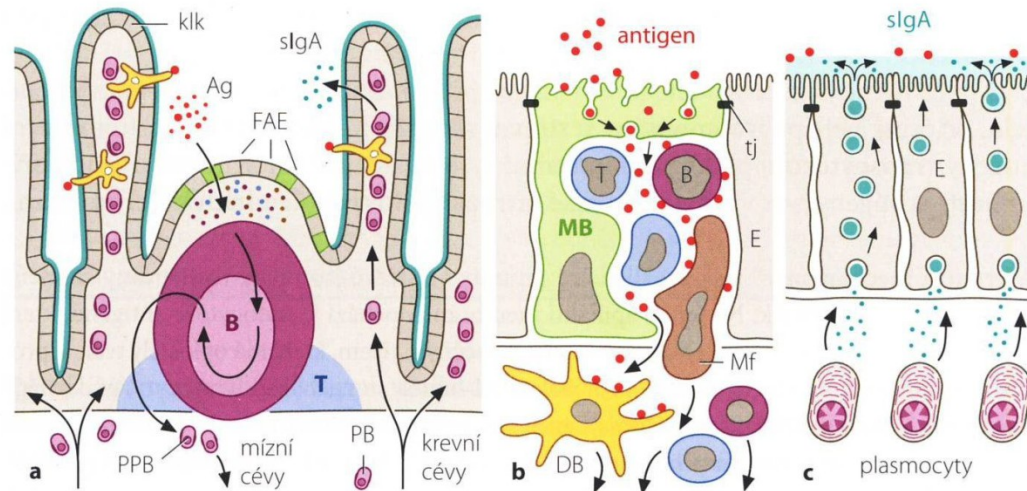
## Slizniční lymfatická tkáň

- ▶ Patrová mandle
  - ▶ Povrch tvořen nerohovějícím epitelem, rozbrázděn do cca 20ti krypt
  - ▶ Krypty obsahují epiteliální buňky, leukocyty, mikroorganismy
  - ▶ Pod kryptami – sekundární lymfatické folikuly – B-dependentní oblast
  - ▶ Interfolikulární zóna – T-dependenční oblast



## Slizniční lymfatická tkáň

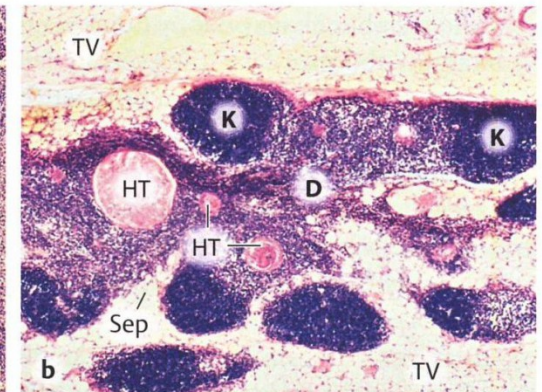
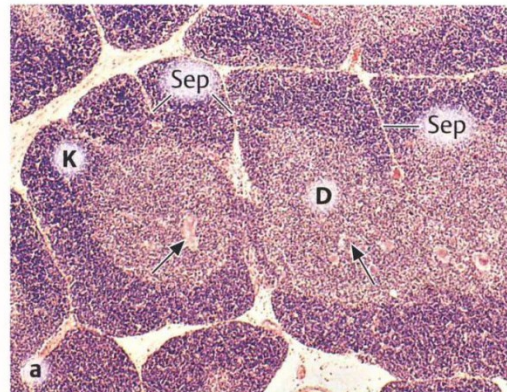
- Lymfatická tkáň střevní sliznice (MALT, Mucosa-associated lymphoid tissue)
  - Shlukováním lymfatických folikulů v některých částech trávicí trubice vznikají Peyerovy pláty
  - B dependentní oblast – folikul, T-dependentní zóna vyplňuje interfolikulární oblasti
  - Povrch epitelu nad folikulem (FAE) neobsahuje mucinózní vrstvu (nebo jen tenkou), chybí klky a pohárkové buňky
  - M-buňky bez mikrokلكů, dochází na nich k endocytóze antigenů
  - Enterocyty transportují protilátky transcytózou
    - Protilátky IgA jsou tvořeny subepitelenými plasmatickými buňkami
    - IgA spolu se sekretem exokrinních žláz vážou antigeny a mikroorganismy – shlukování a opsonizace
    - IgA i v mateřském mléce – pasivní imunizace trávicího a dýchacího traktu kojení





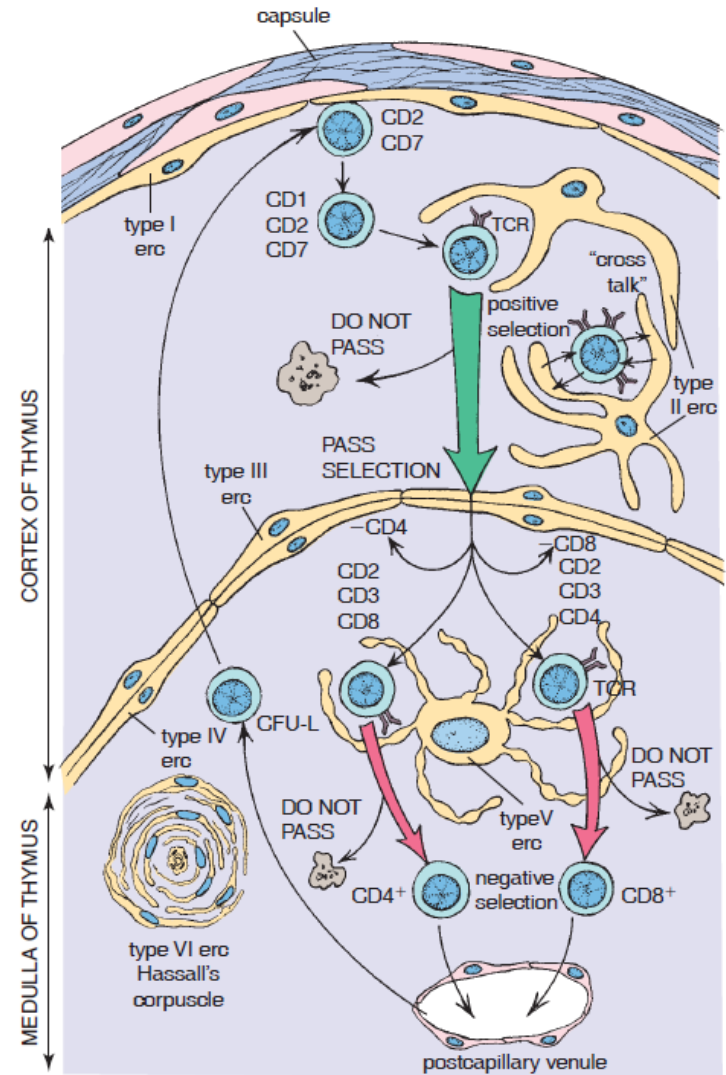
## Thymus, brzlík

- Umístěn v mezihrudí, za sternem před perikardiem
- Maxima rozvoje dosahuje v dětství (cca 20-30g)
- S koncem puberty rychlá involuce, zůstávají jen rezidua v tukovém vazivu
- Primární lymfatický orgán systému T-buněk, tvořen retikulárním epitelem (rozvětvené, navzájem spojené buňky, mezi kterými je tkáňový mok)
- V časném fetálním období je osídlen prekursorsy T-lymfocytární linie – thymocyty
- Vyžívání imunokompetentních T-lymfocytů pod vlivem diferenciačních faktorů a kontaktu s retikulárním epitelu thymu, autotolerance



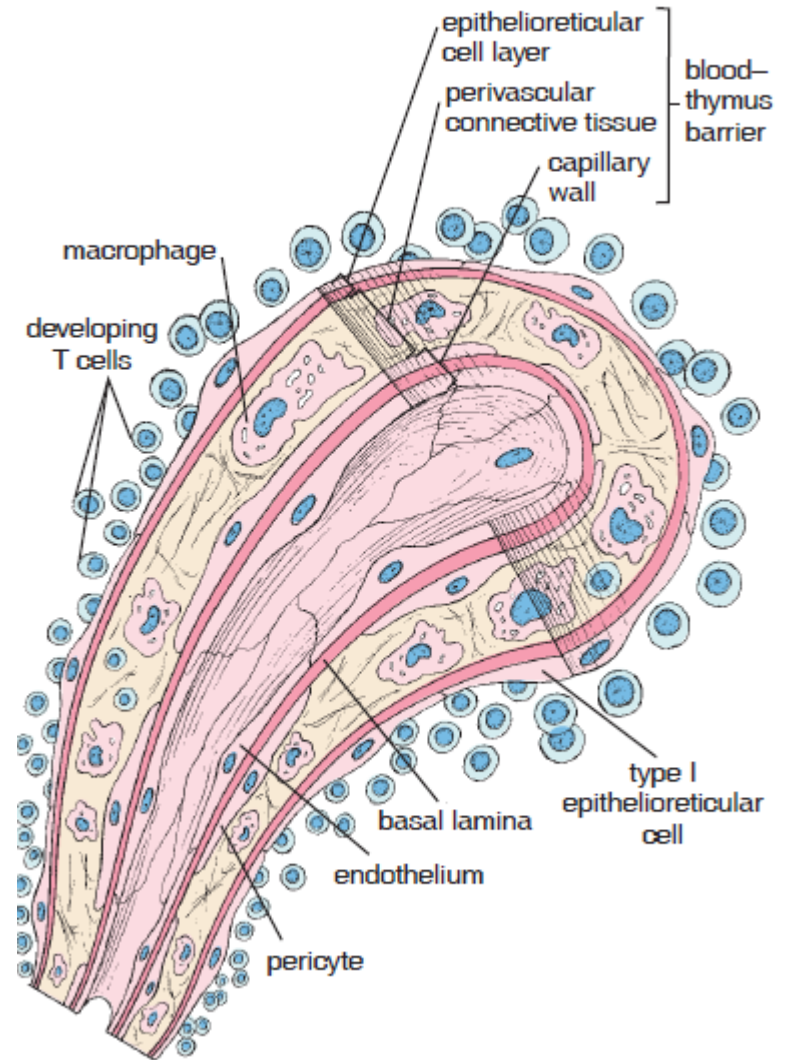
# Thymus, brzlík

- ▶ Retikulární epitelové buňky – obsahují CK vlákna, jsou spojeny desmosomy,
- ▶ Vrstva u kortexu – obaluje thymocyty – „pečovatelské“ buňky
- ▶ vytváří trojrozměrnou síť osídlenou thymocyty
- ▶ Podílí se na pozitivní a negativní selekci T-buněk
- ▶ Hassalova tělíska – podoba eosinofilních agregátů (jejich počet a velikost roste s věkem)

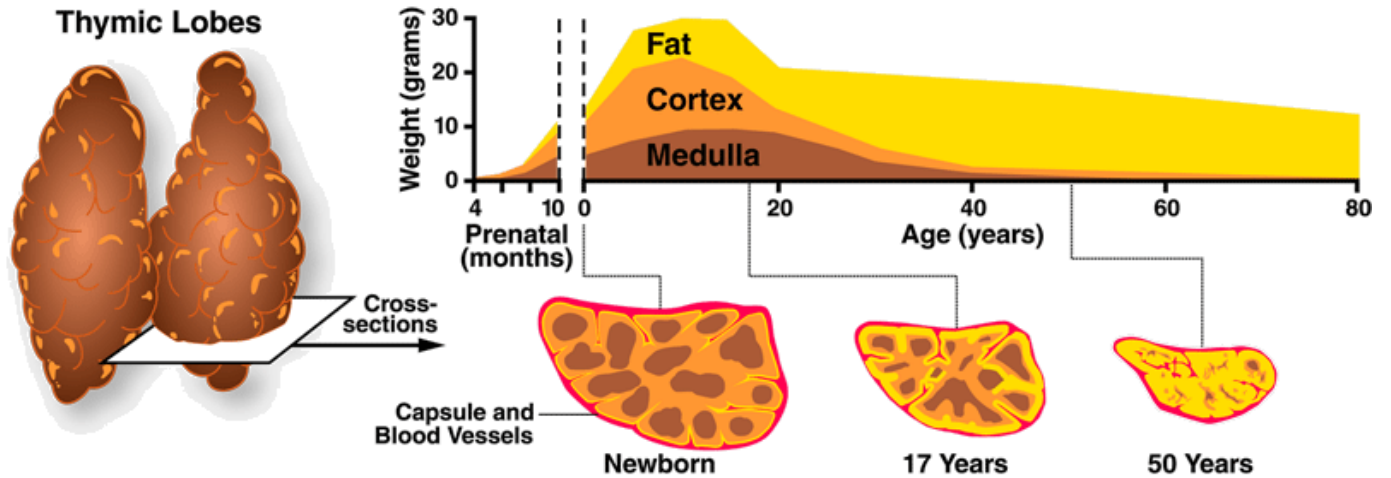
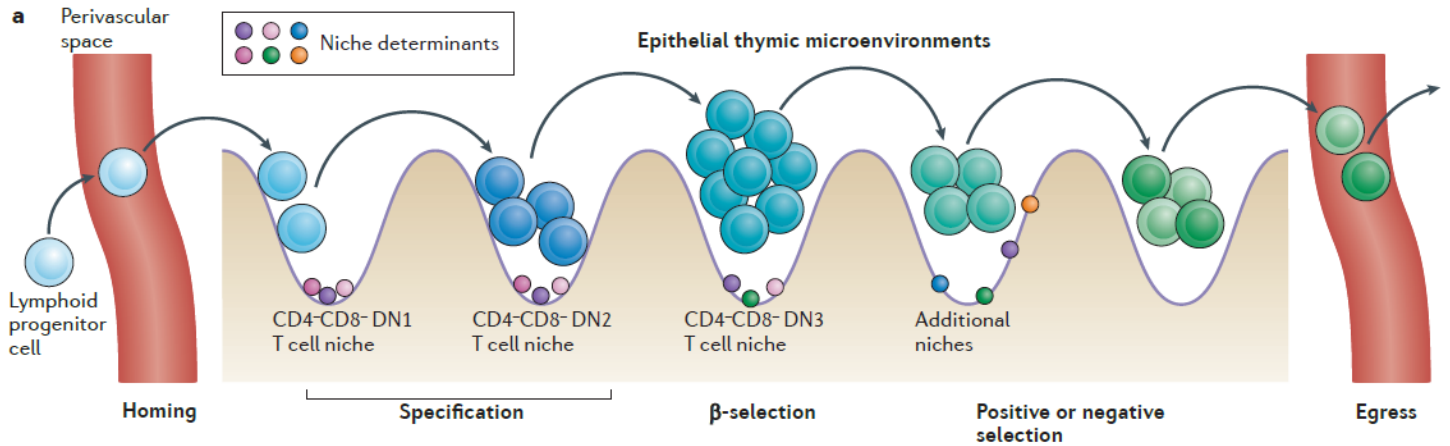


## Hemothymová bariéra

- ochraňuje T lymfocyty před antigeny cirkulujícími v krvi
- souvislá endotelová výstelka kapilár
- BL endotelu (perikapilární prostor) - vazivo + perivaskulární makrofágy fagocytují malá množství materiálu, který pronikne cévní stěnou)
- BL retikulárního epitelu
- perivaskulární hraniční membrána
- HTB je vyvinuta v kůře, chybí ve dřeni



# Involuce thymu



## Shrnutí

- Krev představuje tkáň s vysokou mírou sebeobnovy,
- krvetvorba je hierarchicky organizována,
- je precizně řízena prostřednictvím mezibuněčných interakcí a signalizací prostřednictvím solubilních faktorů – cytokinů,
- všechny zralé krevní buňky vznikají z hematopoetické kmenové buňky jejíž funkce ovlivňuje prostředí v níže kmenové buňky v kostní dřeni.

## Literatura

- Histologie, Renate Lullmann-Rauch, GRADA, 2012
- Histology – A Text and Atlas, M. H. Ross. W. Pawlina, Wolters Kluwer, 2011
- GUIDE to GENERAL HISTOLOGY and MICROSCOPIC ANATOMY, Petr Vaňhara, Miroslava Sedláčková, Irena Lauschová, Svatopluk Čech, Aleš Hampl, Published by Masaryk University, ISBN 978-80-210-8453-7
- Atlas fyziologie člověka, S. Stefan, D. Agamemnon, Grada, 2016