

6. KREV

- transport látek

- živiny
- plyny

- regulace homeostázy

- pH
- osmotický tlak
- rozvod tepla

- obranná funkce

- imunita (buněčná – humorální)
- obranné toxiny (ropušníci - *Phrynosoma*)

- vzácně mechanická funkce

- tlak v očním sinu usnadňuje plazům čištění povrchu oka



Krevní objem: 3-16 % (obratlovci)

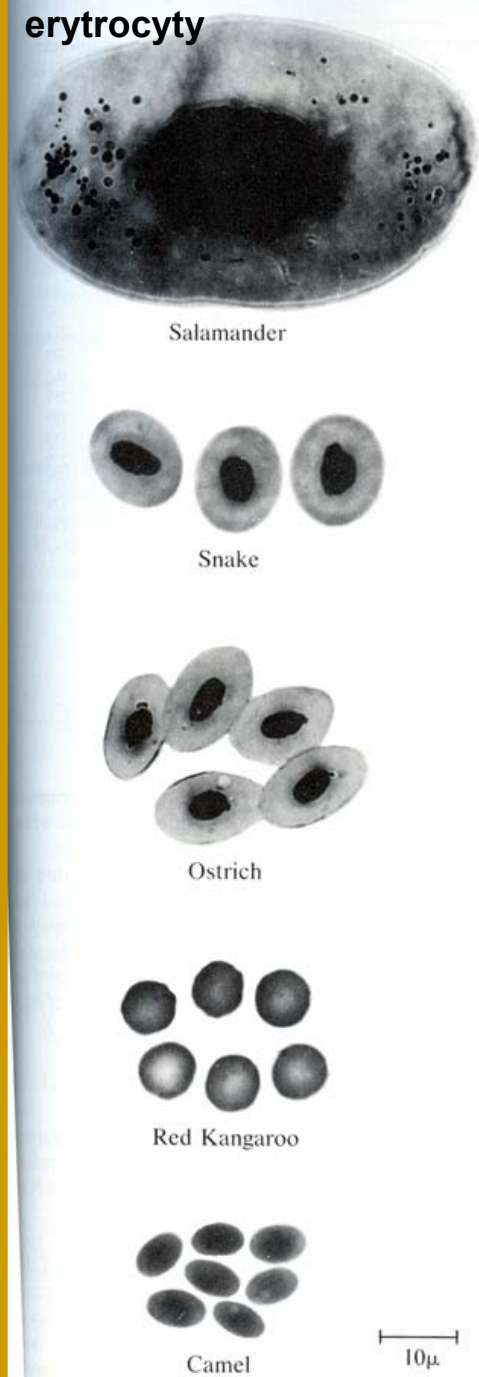
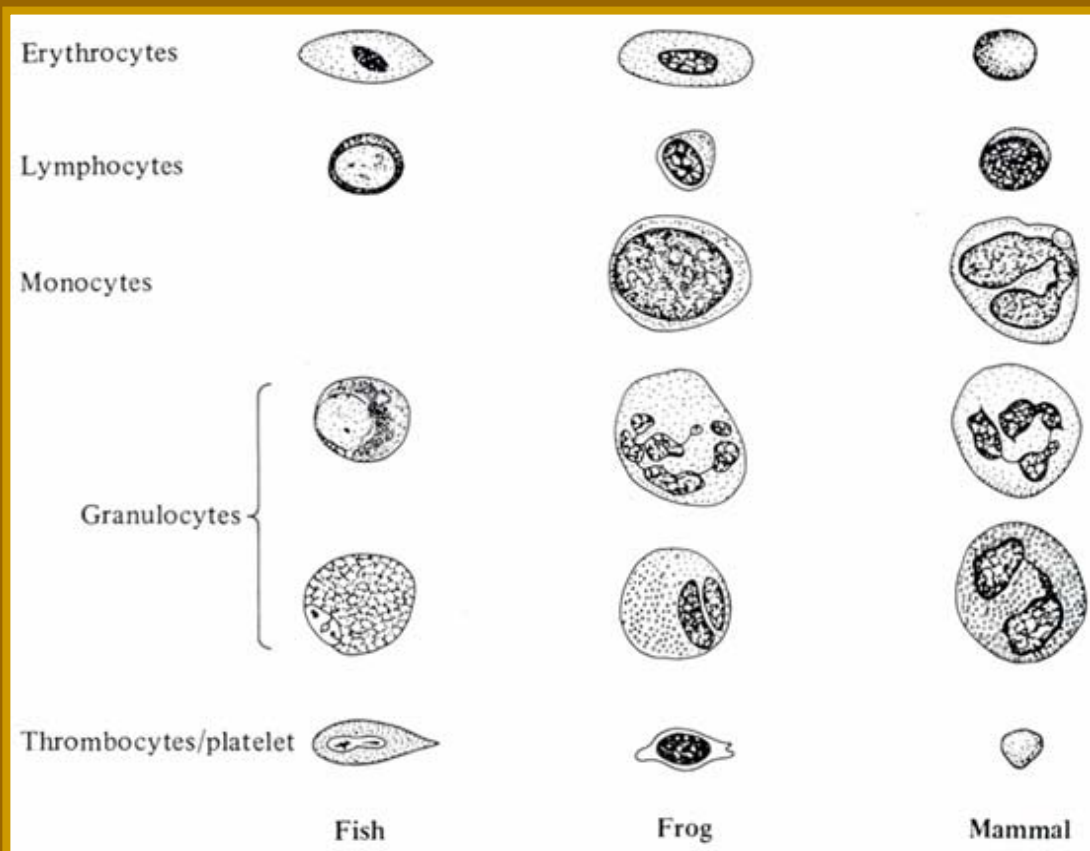
- objem v cirkulačním systému

- hematokrit (objem buněk)

- objem plasmy

Složení krve

- Ionty – potenciál na membránách, pH
- neelektrolyty – močovina, glukóza,.. (metabolismus)
- proteiny - koloidní osmotický tlak
 - pufrční schopnosti - pH
- metabolity, toxiny,..
- buňky



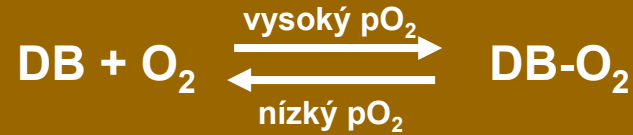
Hematologické parametry některých obratlovců

Ery – objem erytrocytu/velikost; **EryK** – počet erytrocytů v 1 litru krve; **Hct** – hematokryt; **Hb** – koncentrace hemoglobinu; **PEry** – množství hemoglobinu na buňku; **PEryK** – koncentrace hemoglobinu v buňce; **OK** – kapacita krve pro O₂

	Ery fL	EryK 10 ¹² /L	Hct %	Hb g/L	PEry pg	PEryK g/L	OK ml O ₂ /L
mlok (<i>Amphiuma</i>)	10800	0,027	29	76	2830	262	102
skokan	845	0,296	25	70	232	285	94
želva	394	0,52	21	69	133	335	92
velbloud	319	11,0	35	158	14	494	211
slon africký	141	3,03	43	153	51	356	205
krocan	136	2,72	37	123	45	336	165
běluha	134	3,34	46	193	57	427	259
člověk	90	4,99	44	146	29	335	196
myš	60	8,3	50	159	19	320	213
pytlouš	45	11,8	54	193	17	367	259
rejsek	31	11,5	36	162	15	477	217
koza	18	16,1	29	104	7	356	139
kančil	6	55,9	31	117	2	380	154



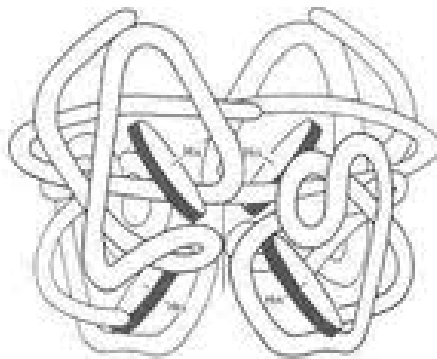
Dýchací barviva (DB)



- u obratlovců zejména svalový *myoglobin* (1x globin) a jeho krevní derivát *hemoglobin* (4x globin)

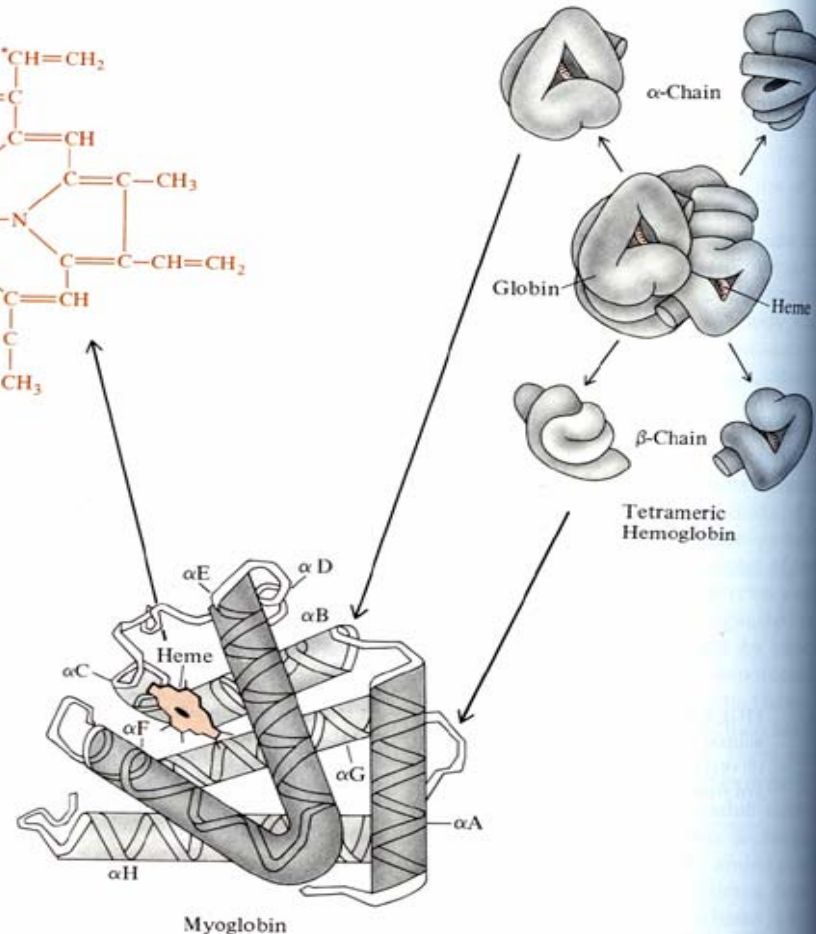
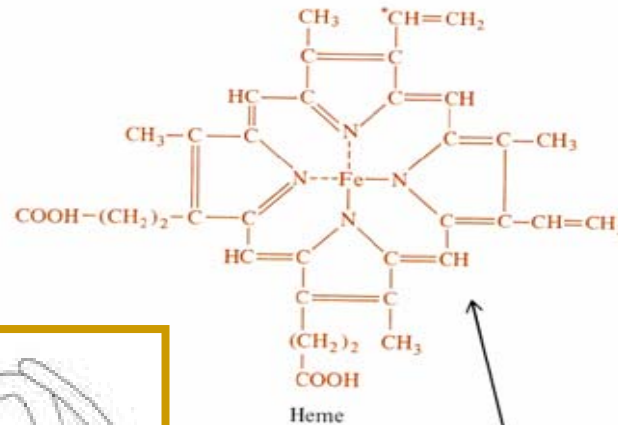


Myoglobin

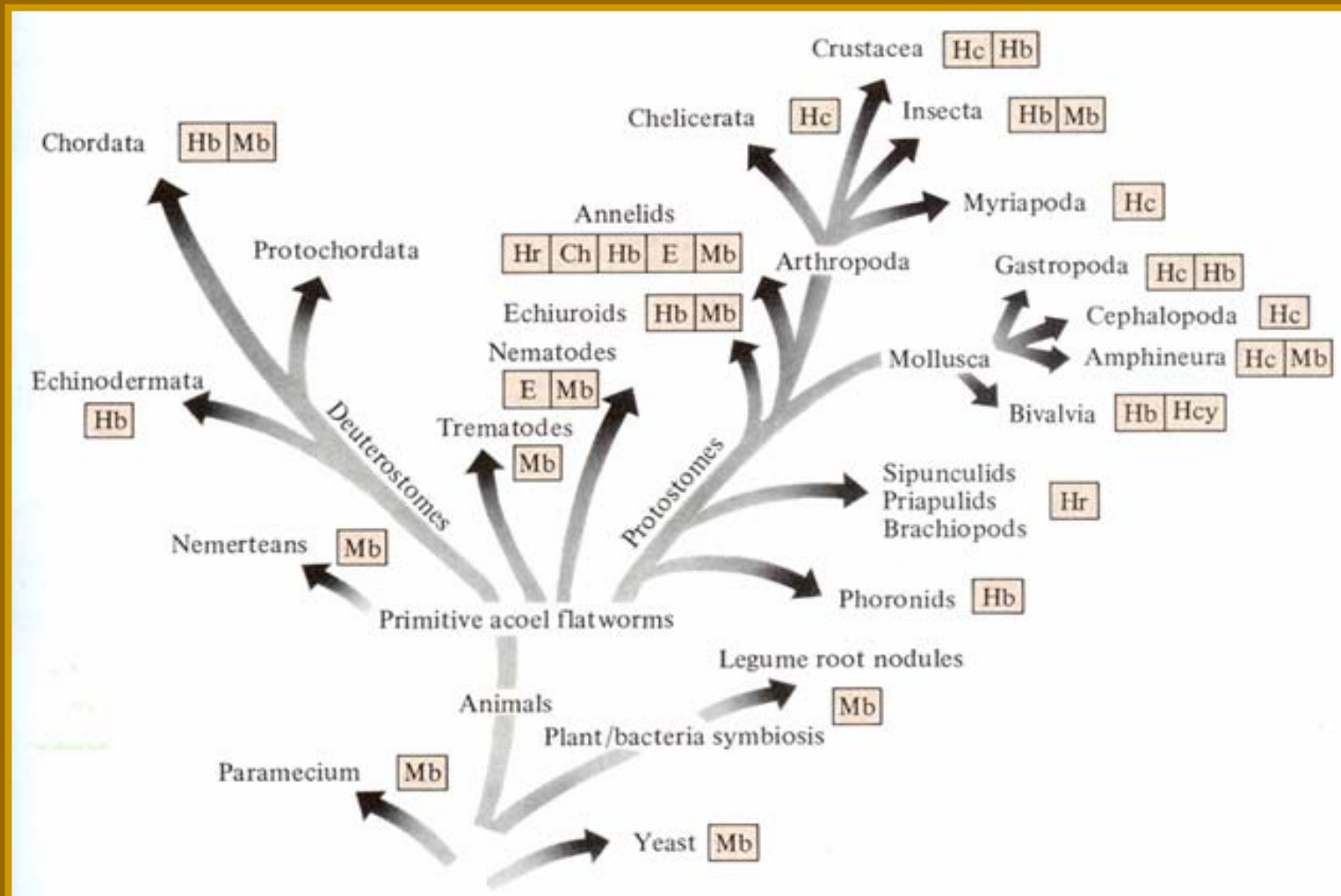


Haemoglobin

Figure 3 Myoglobin versus haemoglobin



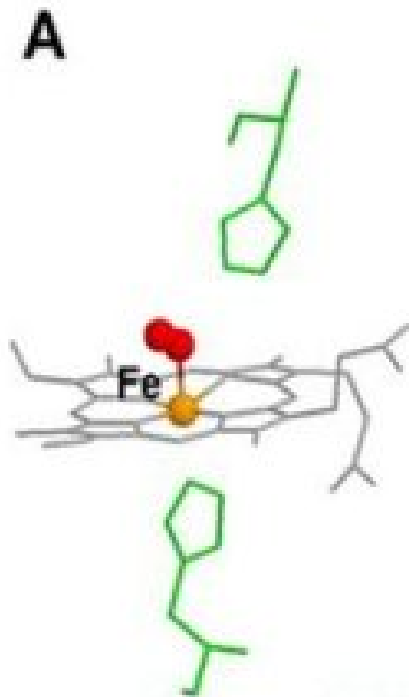
Fylogeneze dýchacích barviv u živočichů



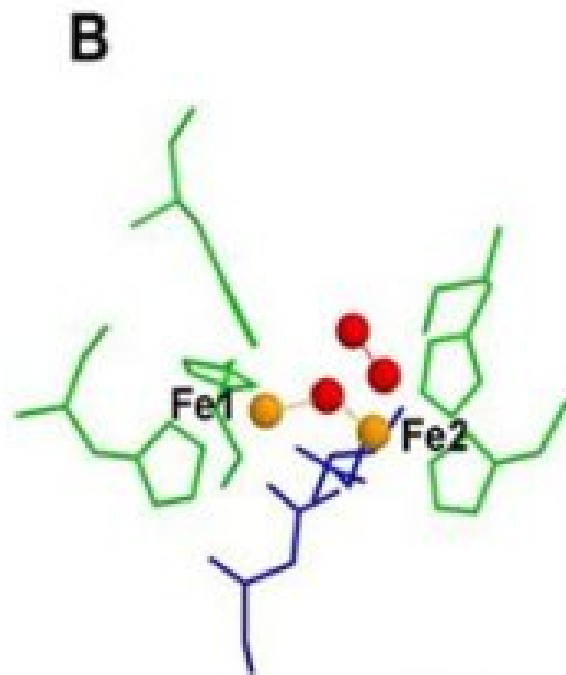
Hb – hemoglobin; **Mb** – myoglobin; **E** – erytrokrurin (hemoglobin bezobratlých); **Ch** – chlorokrurin (zelený);
Hr – hemerytrin (bez hemu, bezbarvý → fialový); **Hc** – hemocyanin (Cu^{2+} , bez hemu, bezbarvý → modrý)

Struktura některých hemových skupiny globinů

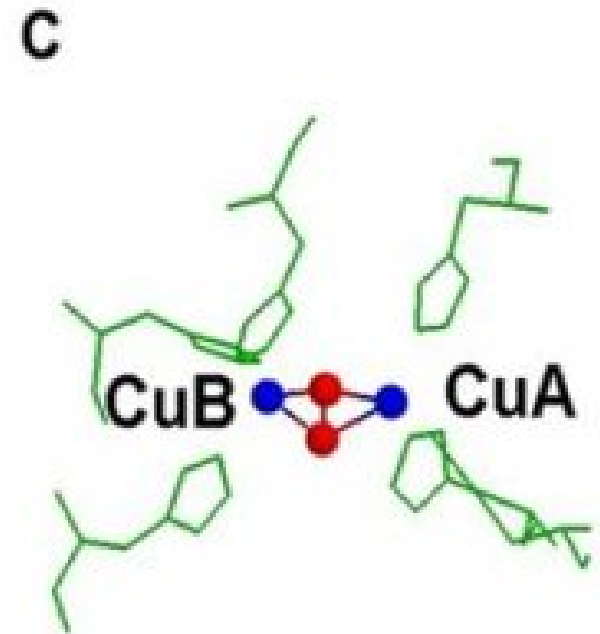
KYSLÍK - ●



Hemoglobin



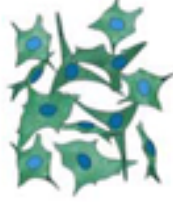




Hemerythrin

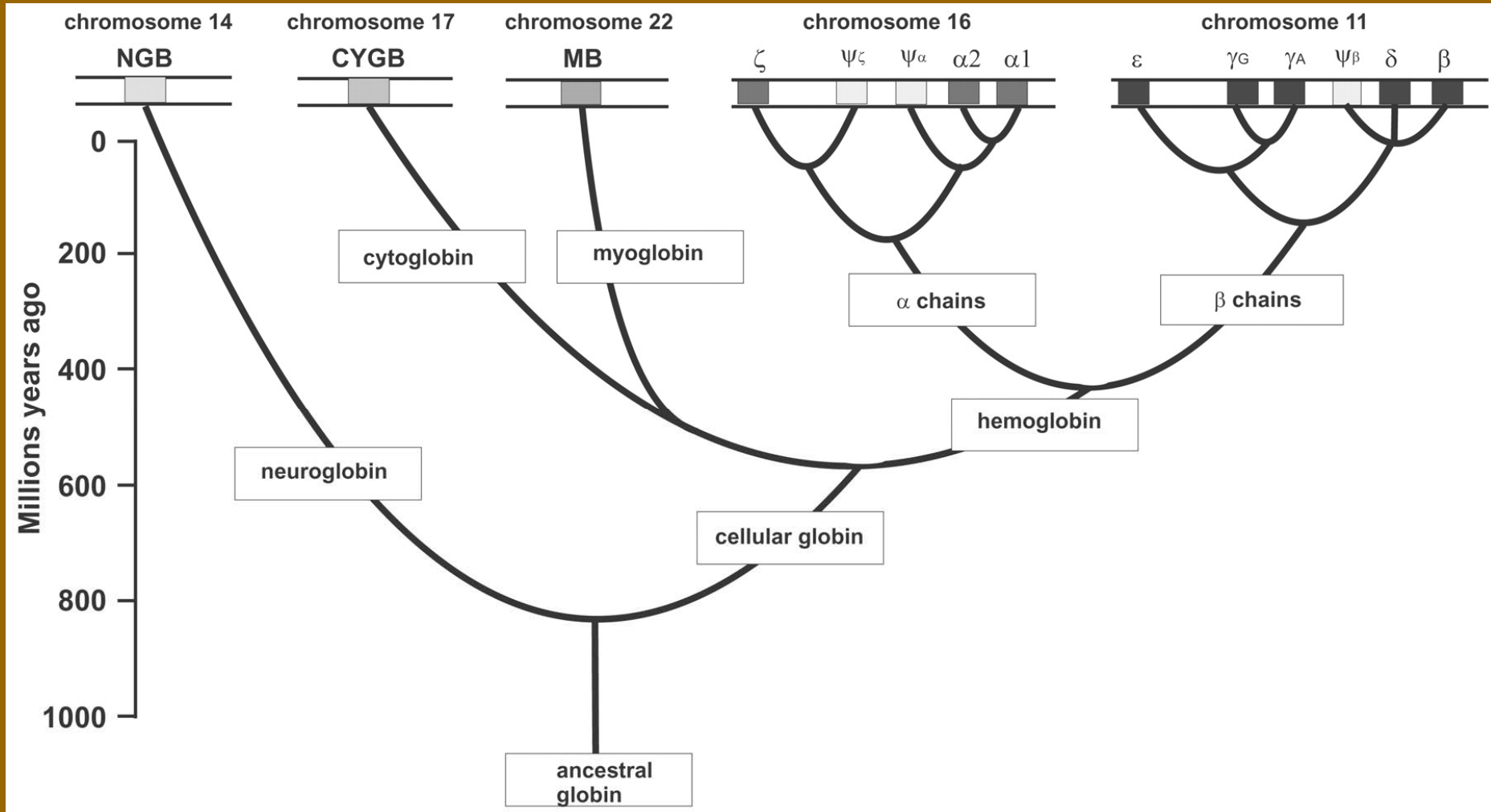


Hemocyanin

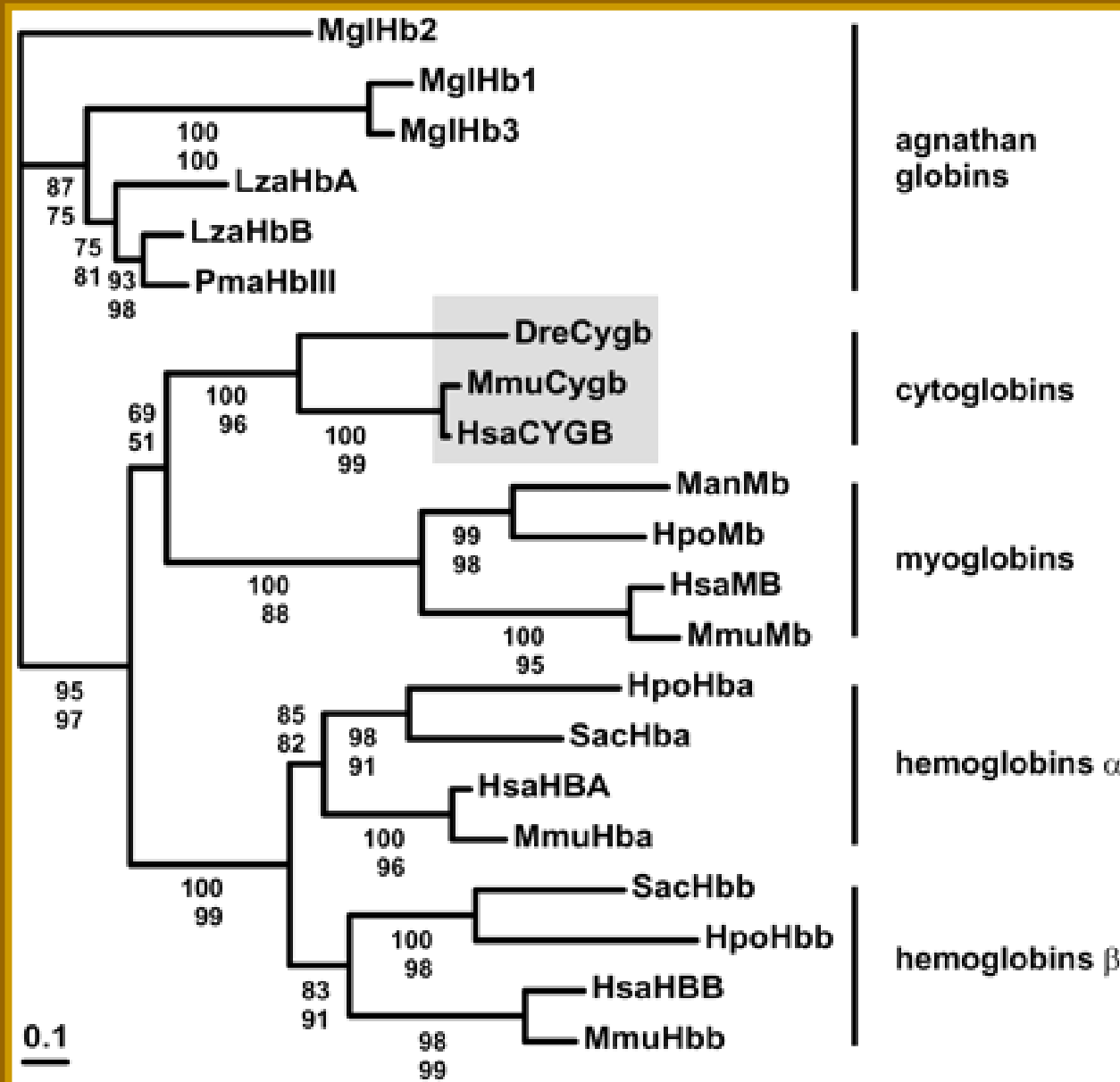
Základní skupiny globinů u savců

	hemoglobin	myoglobin	cytoglobin	neuroglobin
				
expression sites	red blood cells	skeletal muscle heart smooth muscle	fibroblast cell lineage liver stellate cells CNS/PNS	neurons (CNS,PNS) retina endocrine tissue fish gills
Fe-atom coordination	penta	penta	hexa	hexa
oxygen affinity (P₅₀(O₂) in torr)	26	1	1	1
gene location (human)	α-cluster 16p13 β-cluster 11p15	22q13	14q24	17q25
locus link	(α) 83587 (β) 64162	4151	114757	58157
phylogeny	HBA HBB	MB	CYGB	NGB
				

Evolve globinů (chromosomy člověk)

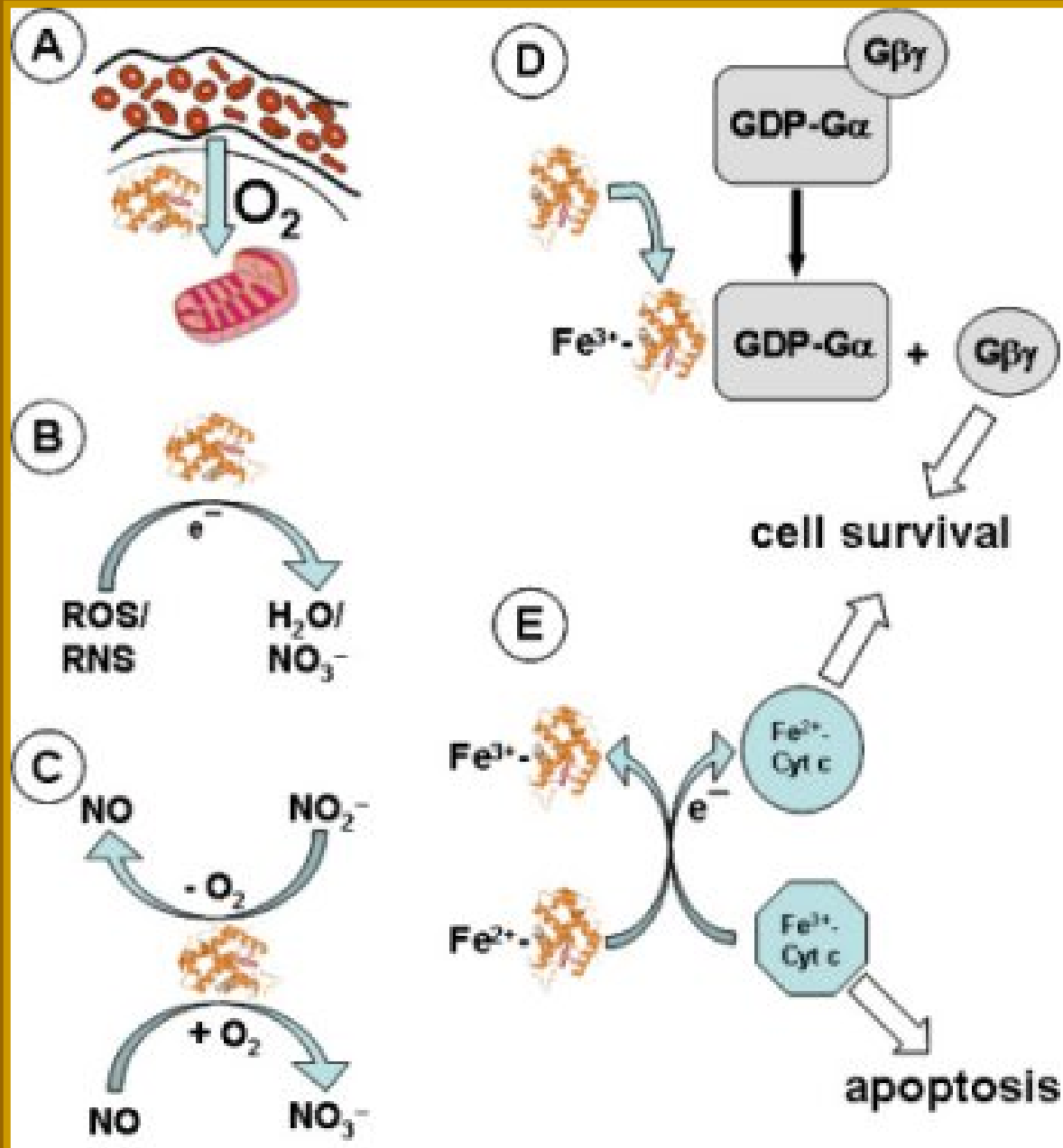


Podobnost jednotlivých globinů u obratlovců

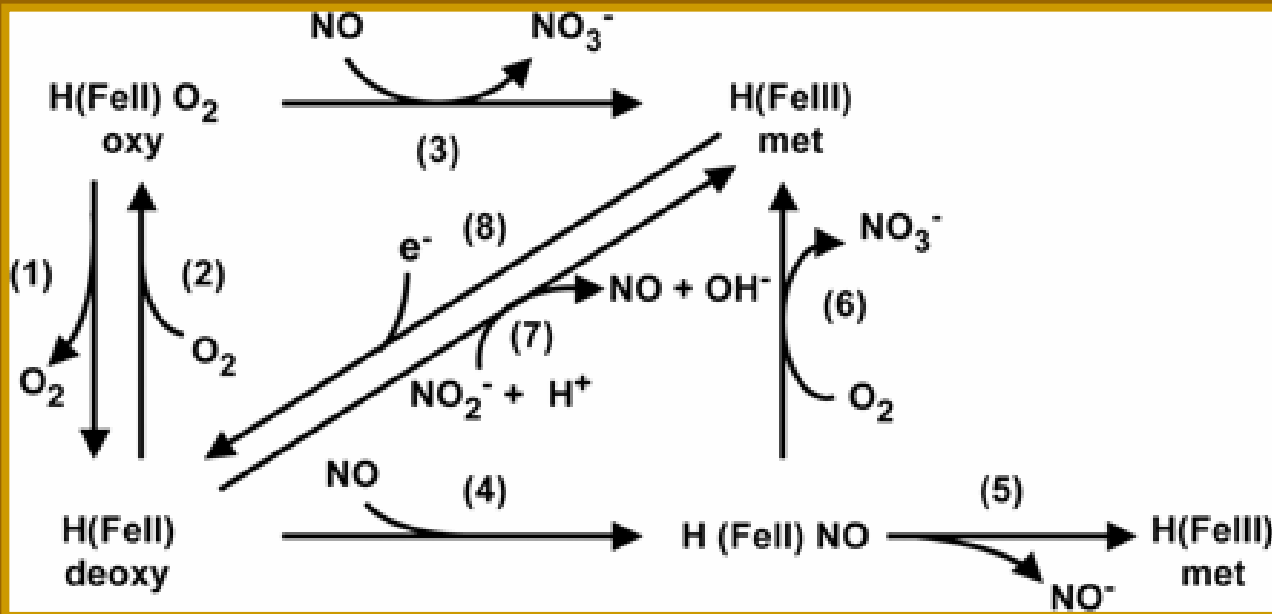


Úloha globinů

- A) Vazba a přenos O_2
- B) Redukce ROS a RNS
(reactive species – tzv. radikálů)
- C) Metabolismus NO_x ů
- D) Regulace GTPás
- E) Oxidačně redukční
reakce s cytochromy

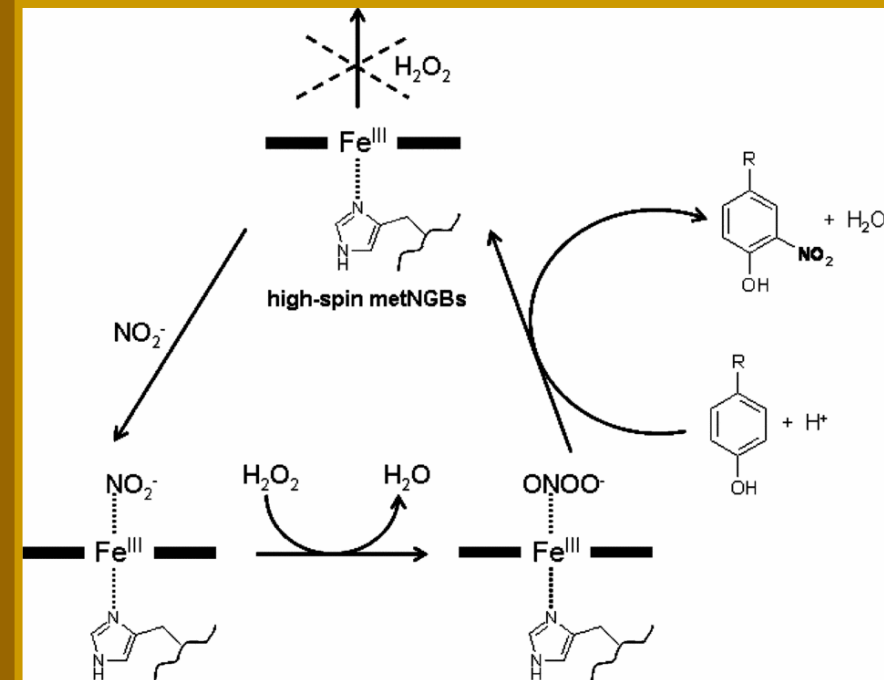


Metabolismus NOx Katalyzované hemoglobinem



- Reakce 1 – odkysličování
- Reakce 2 – okysličování
- Reakce 3 – NO dioxygenace
- Reakce 4 – nitrosylace
- Reakce 5 – NO redukce
- Reakce 6 – O₂nitrosylace (hem denitrosylace)
- Reakce 7 – NO₂⁻ redukce
- Reakce 8 – MetHb redukce

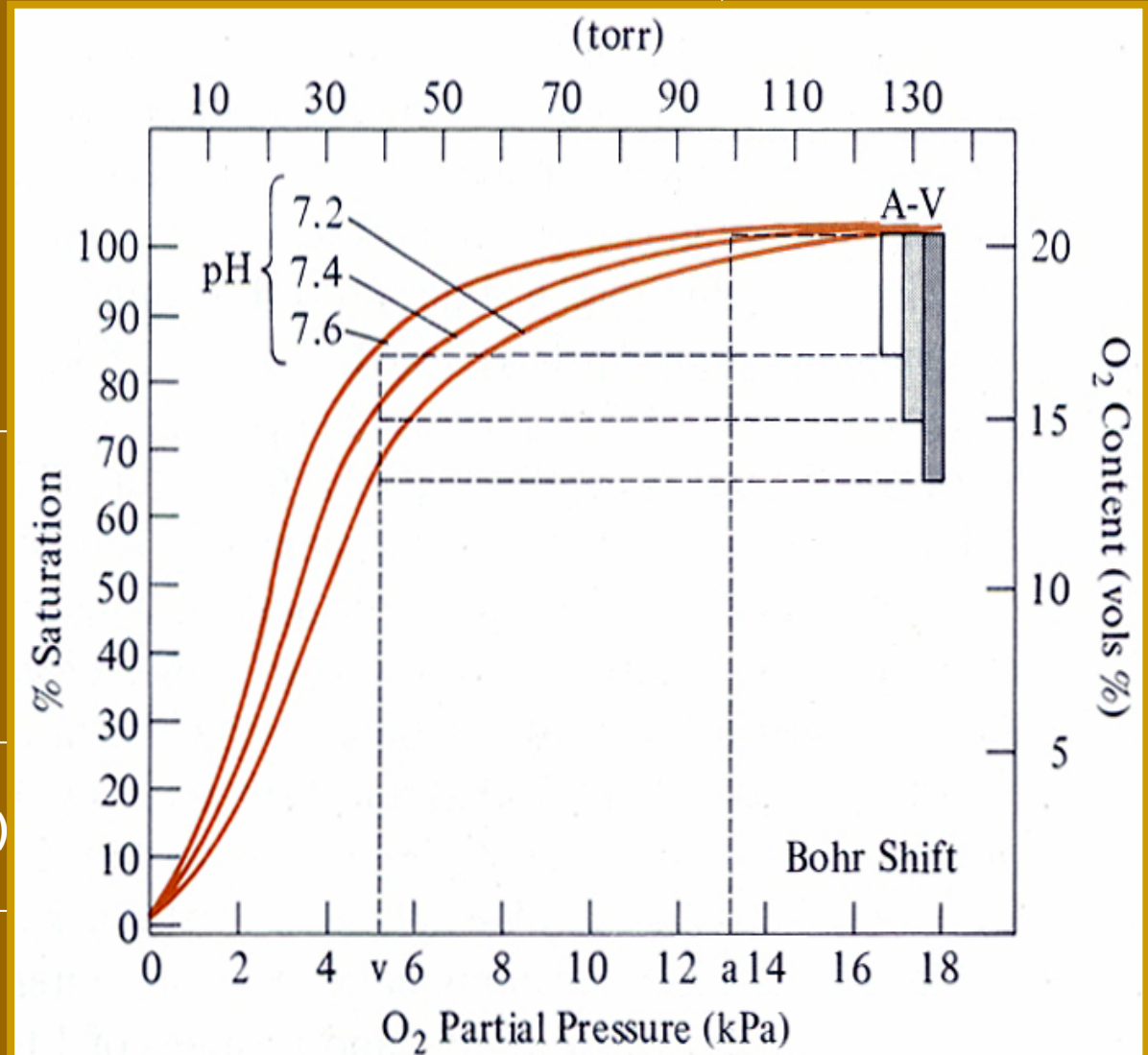
Nitrace fenolů zprostředkovaná neuroglobinem



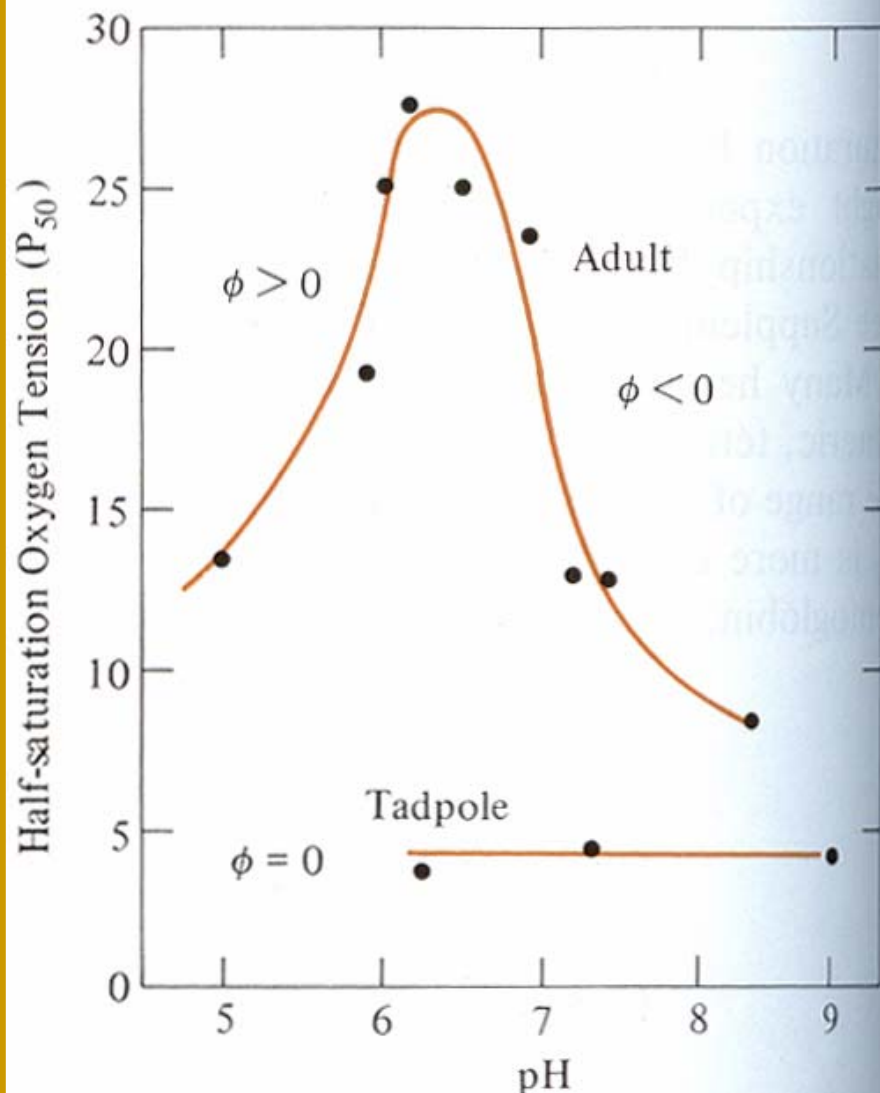
Saturační kapacita krve pro různé skupiny obratlovců a vody v ml O₂ na 100 ml média při plné saturaci a při pO₂ = 21,8 kPa pro vodu

voda (20°C)	0,65
kruhoústí	1 – 1,2
paryby	4,4 – 4,5
ryby	4,9 – 19,7
obojživelníci	6,3 – 10,4
plazi	6,6 – 12,5
ptáci	10 - 22
savci	14 - 32

Saturační křivka hemoglobinu kyslíkem a (negativní = normální) Bohrův efekt u člověka



Změny v 50% saturaci hemoglobimu kyslíkem (P50) v závislosti na pH (Bohrův efekt - ϕ) u dospělého skokana volského (*R. catesbeiana*) a jeho pulce



Faktor Bohrova efektu ($\phi = \Delta \log P_{50} / \Delta pH$) pro hemoglobiny obratlovců.

ryby	-0,54 / -0,31
obojživelníci	-0,29 / 0
plazi	-0,52 / -0,13
ptáci	-0,5 / -0,4
savci	-0,96 / -0,32

Bez Bohrova efektu

- hemoglobin sliznatek (*Polistotrema*)
- myoglobiny



Vazbu O₂ k hemoglobinu dále ovlivňují

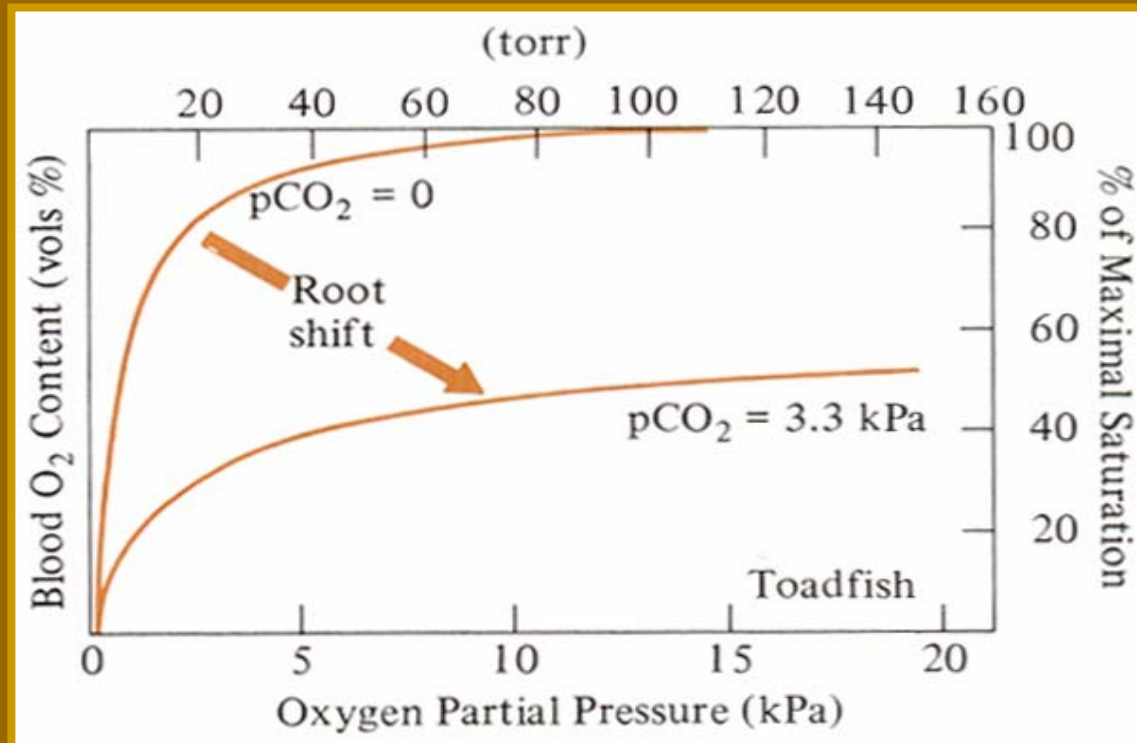
- *parciální tlak CO₂* => Rootův efekt

- u ryb napomáhá uvolňování plynů do plynového měchýře

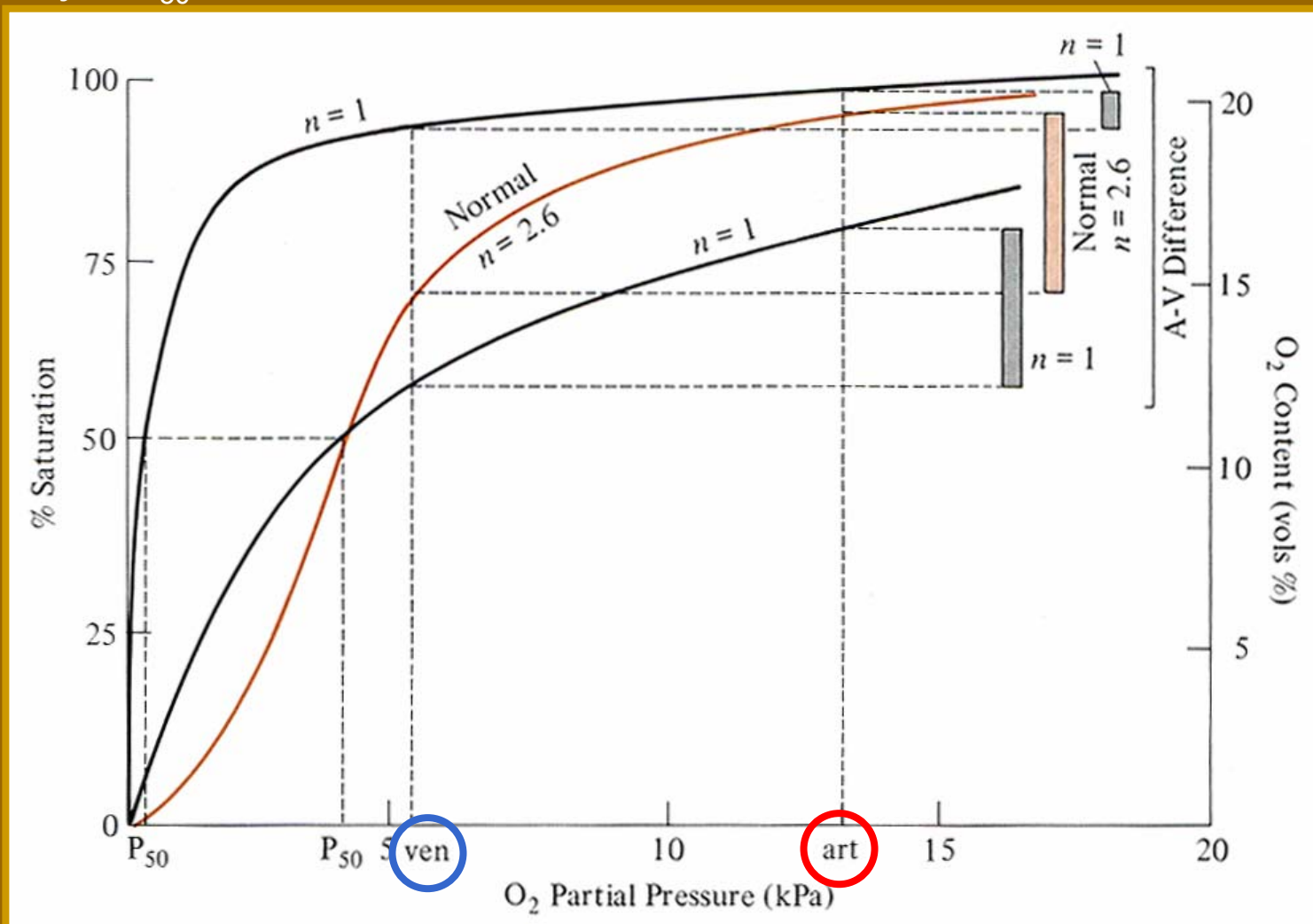
- *koncentrace iontů* – vyšší koncentrace = vyšší P₅₀ / nižší vazebnost (savci)

- *koncentrace organických fosfátů* (intracelulárně) - vyšší koncentrace = vyšší P₅₀ /
nižší vazebnost (savci)

- *teplota* – vyšší teplota = vyšší P₅₀ / nižší vazebnost

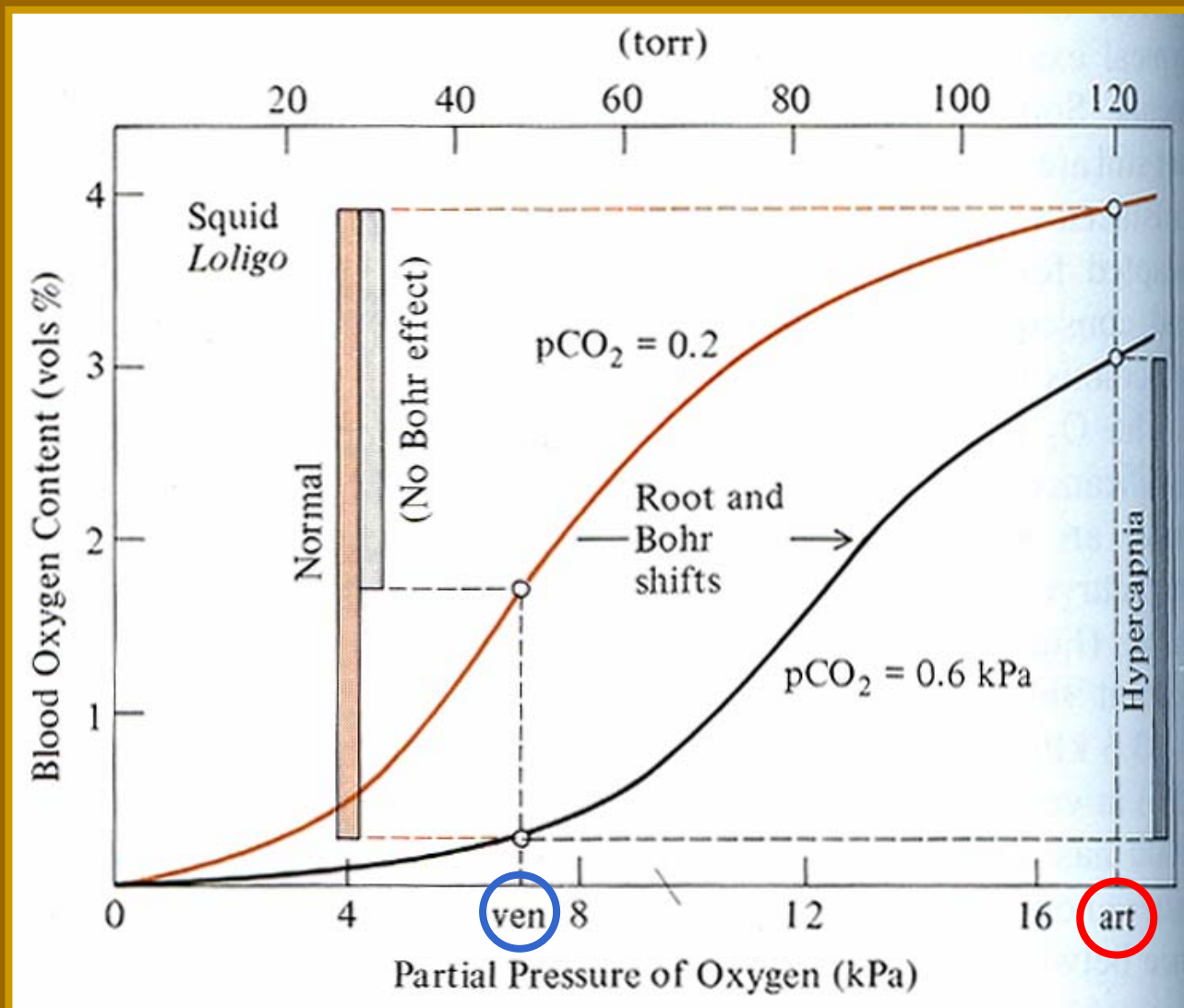


Význam normální sigmoidní křivky pro transport O_2 krví; $P_{50} = 3,8$ kPa, $n = 2,6$.
 Srovnání s hyperbolami pro $n = 1$ při „stejné“ arteriální saturaci O_2 ($P_{50} = 0,4$ kPa)
 a pro stejné P_{50} .



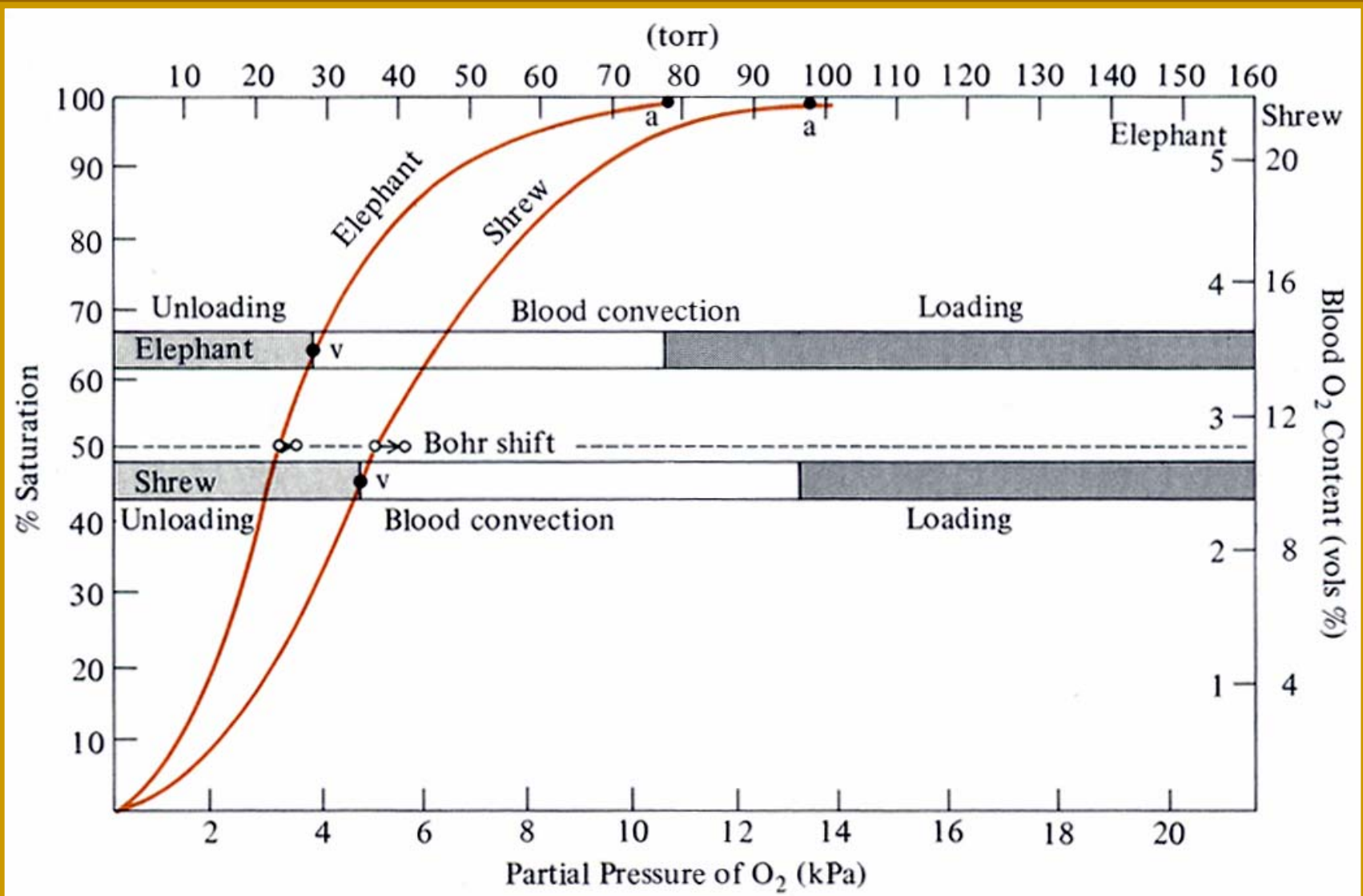
n – kooperativní koeficient interakce molekul hemu při vazbě O_2 , závislost na počtu hemových Molekul; $n = 1$ pro 1 molekulu Hb (monomer); $n = 2,6$ pro 4 molekuly Hb (tetramer); 200mer – $n \sim 8$ (*Arenicola*); některé hemoglobiny $n > 8$

Účinek Bohrova a Rootova efektu/posunu na transport O_2 krví

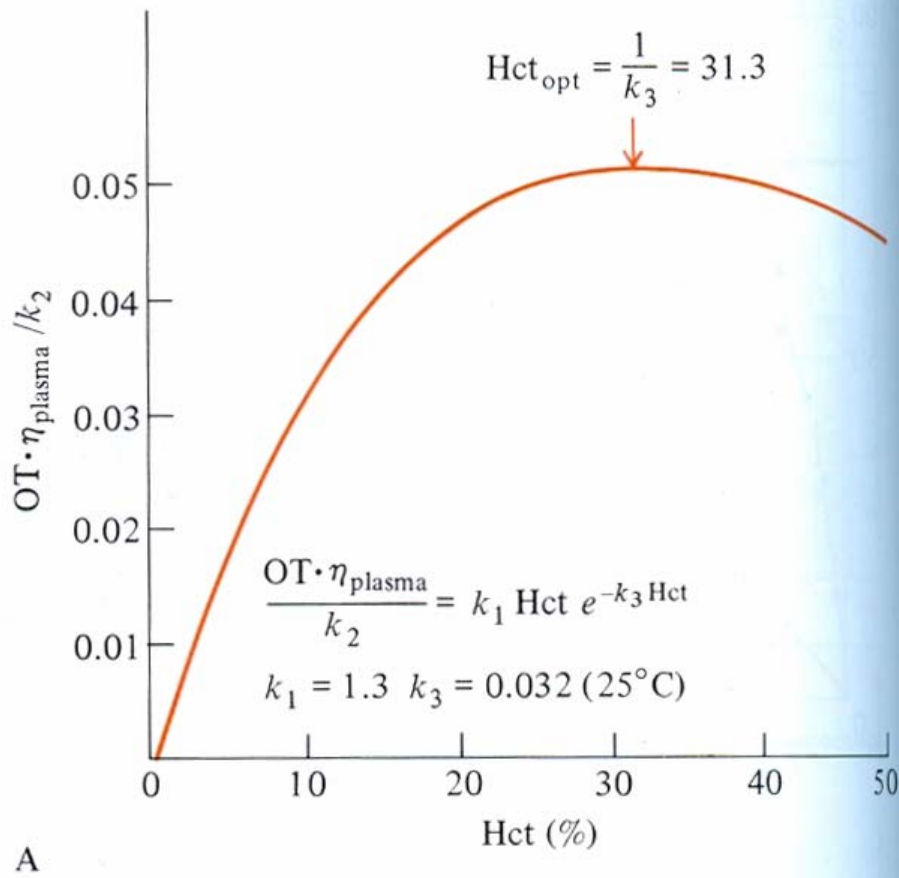


Vliv intenzity metabolismu na disociační křivku hemoglobinu pro O₂.

Menší živočichové mají intenzivnější metabolismus = větší spotřeba O₂ na 1g tkáně, rejsek (shrew) přibližně 40x větší než slon (elephant) => větší nároky na přenos O₂ z krve do tkání.



Účinnost transportu kyslíku krví v závislosti na hematokritu / koncentraci hemoglobinu



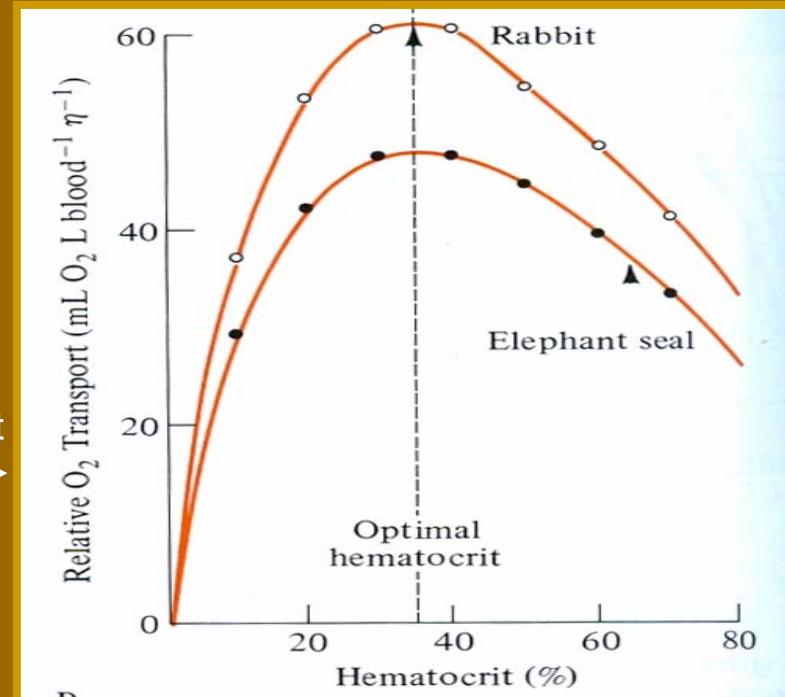
Hct – hematokrit
 OT – transportní kapacita O₂
 $OT = V_{bl} \cdot k_1 \cdot Hct$
 V_{bl} – průtok krve (ml za minutu)
 k₁ – relativní kapacita vazby O₂ krví
 v závislosti na Hct (ml O₂ / ml krve * Hct)
 $\eta_{krve} - \text{viskozita krve} = \eta_{plasma} e^{k_3 Hct}$
 k₂ – konstanta charakterizující tlak a odpor cév
 k₃ - konstanta



▲ OT *in vivo* x Opt. hematokrit



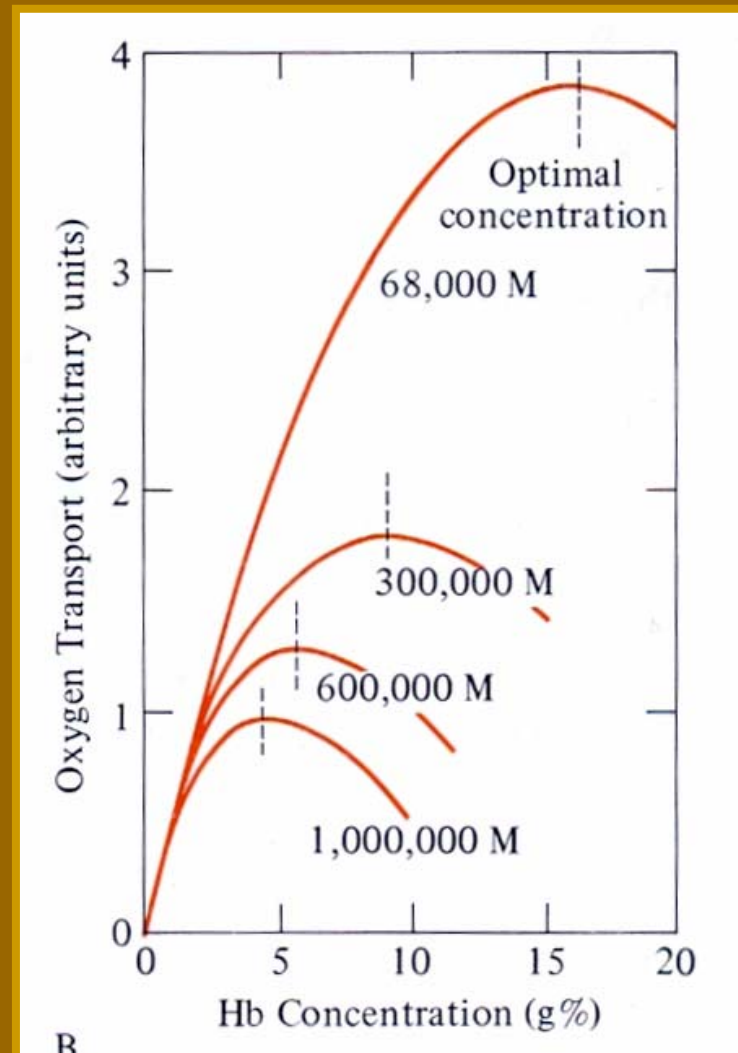
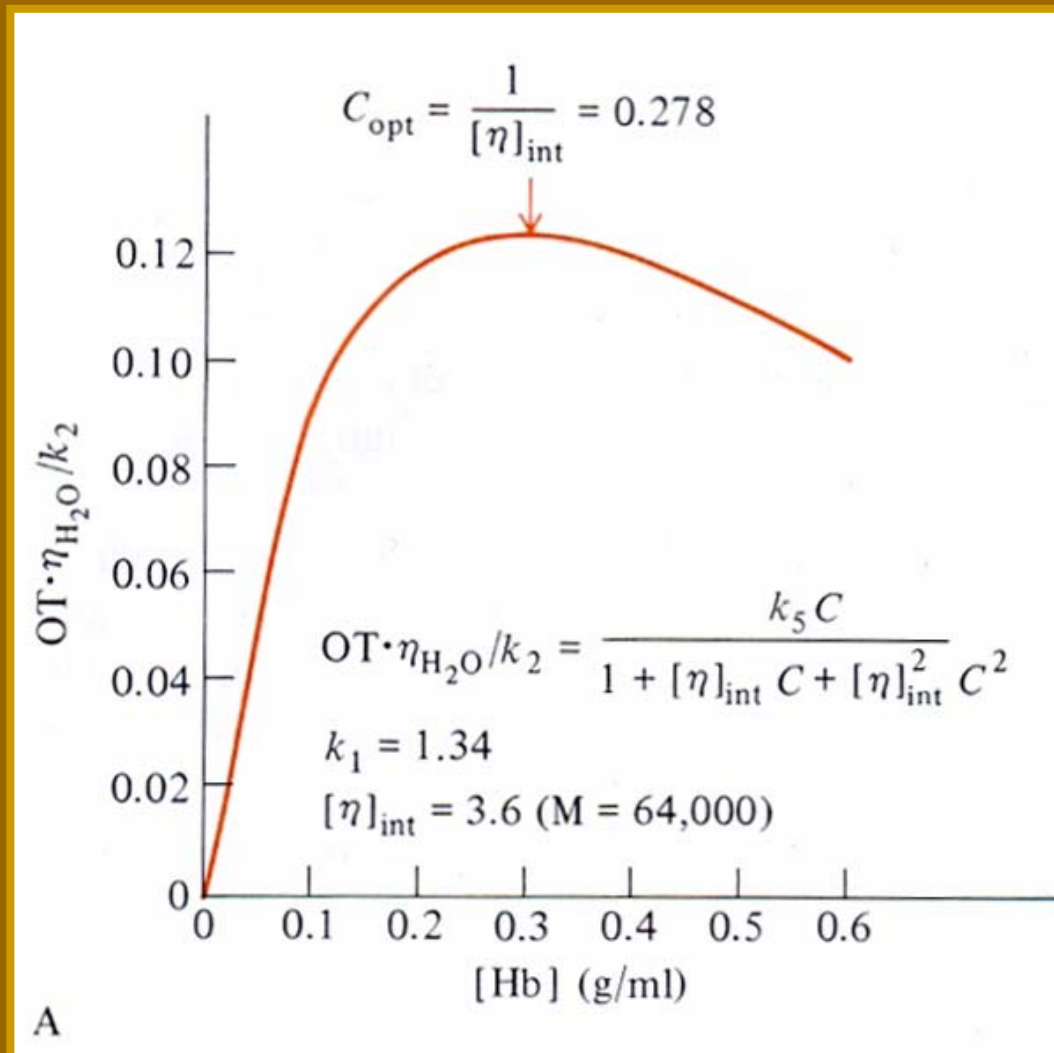
Posun umožňuje větší zásoby kyslíku v krvi



Vztah mezi transportní kapacitou O₂ (OT) a

A) koncentrací hemoglobinu

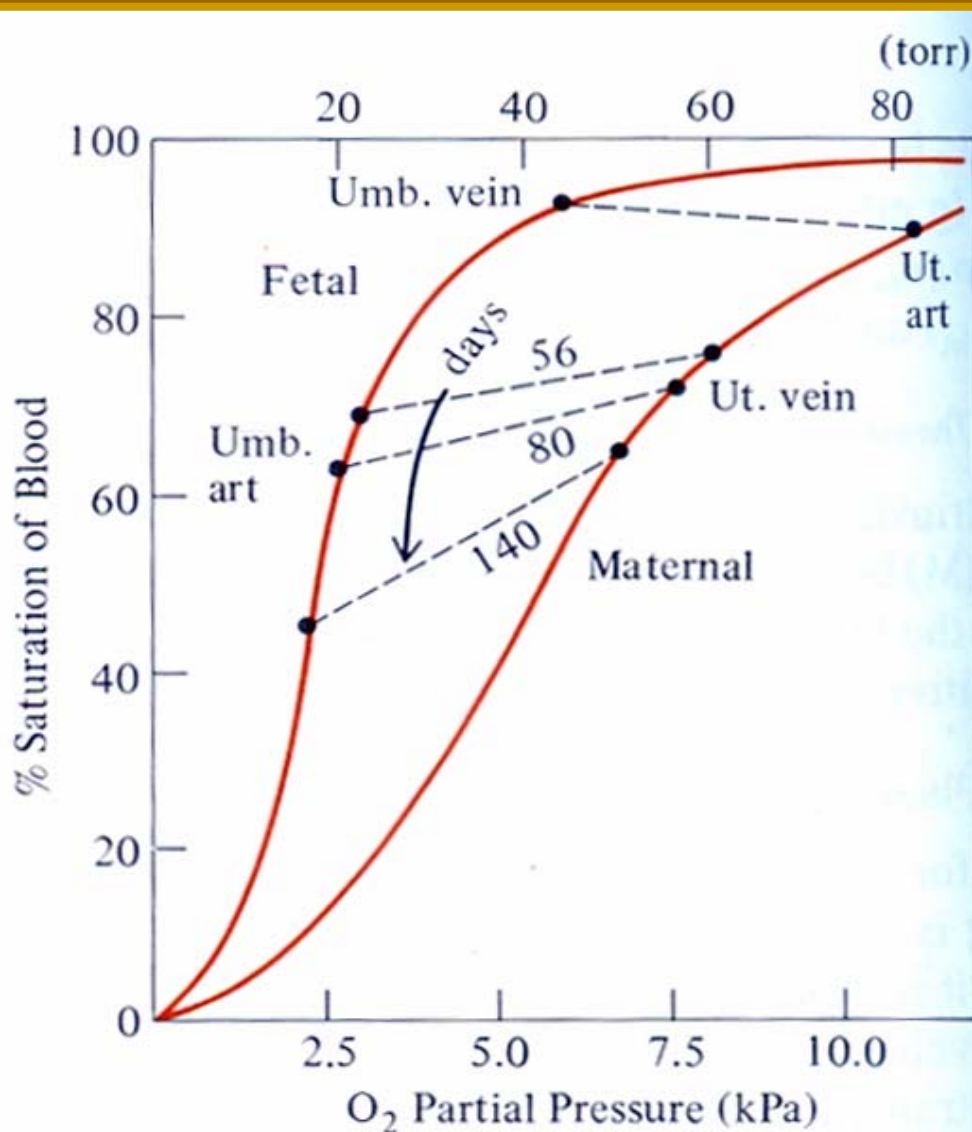
B) Molekulární hmotností hemoglobinu (M = Mr !!!)



viskozita x koncentrace (molární koncentrace)

Saturační křivky krve O₂ u matky a plodu

- různé hemoglobiny
- podobný vztah i mezi dalšími O₂ přenášejícími barvivy, dle parciálního tlaku O₂ (př. myoglobin x hemoglobin)



Zásoby O₂ - významné zejména pro potápějící se savce a ptáky

Hemoglobin jako zásobárna O₂

- 1,3 ml O₂ na 1g hemoglobinu
- > 15 g% hemoglobinu v krvi
- objem krve > 10 % tělní hmoty

Myoglobin jako zásobárna O₂

- koncentrace ve svalu > 5 %
- svaly 20-40 % tělní hmoty



Plicní zásoby O₂ – malý význam v důsledku redukce objemu vzduchu před potopením

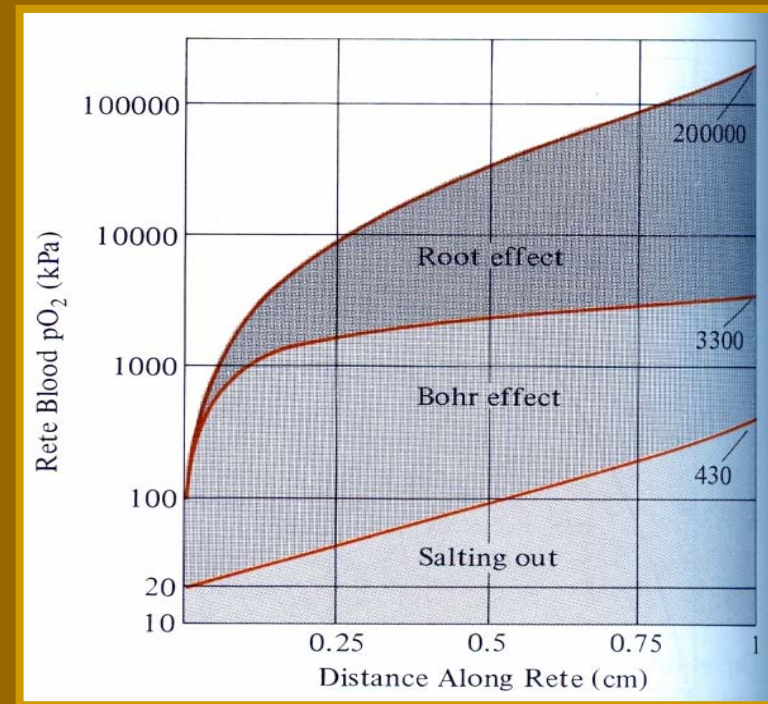
	Objem ml O ₂ na kg tkáňové hmoty					
	pľíce	arteriální krev	žilní krev	svaly	rozpuštěno	celkem
člověk	12,2	2,8	10,1	0,9	1,9	27,9
kachna divoká	12,3	4,7	10,2	1,8	2	31,0
lvoun	16,5	5,0	7,2	8,1	2	39,4
polák chocholačka	19,8	6,3	13,6	1,8	2	43,5
mrož	17,4	7,7	11,5	10,0	2	48,6
lachtan medvědí	21,8	6,7	9,9	11,7	2	52,1
tuleň obecný	13,6	12,2	18,8	18,6	2	65,2
vydra mořská	51,2	6,1	9,4	8,8	2	77,5
tuleň pruhovaný	12,6	14,3	22,6	27,2	2	78,7

Výměna O_2 v plovacím měchýři u kostnatých ryb

- objem je závislý na hloubce ponoření (10 m = 1 atm = 101 kPa)
- mechanismy pro uvolňování plynů do měchýře a zachování jeho konstantního objemu, mnohé druhy pak ještě žlázy pro zpětnou resorpci plynů
- problematické ve velkých hloubkách, parciální tlaky plynů v krvi obecně malé, parc. tlaky v měchýři značně narůstají s hloubkou
- nejsou mechanismy aktivního transportu, jen pasivně
- uplatnění Rootova (pCO_2) efektu

Plynové žlázy se sítí cév napojených na plynový měchýř

- navození Root efektu anaerobním metabolismem (produkce H^+ , laktátu, CO_2)
- vytěsnění O_2 z hemoglobinu
- zvýšení rozpuštěného pO_2
- část O_2 přejde do plynového měchýře



Transport CO₂ a jeho důsledky

za normálního stavu převažují hydrogen-uhličitanové ionty



zvyšující se pH zvyšuje množství uhličitanových iontů



CO₂ se také váže na –NH₂ skupiny proteinů (významné u odkysličené krve)



Obecně jsou malé rozdíly*) mezi obsahem CO₂ v arteriální a venózní krvi – 1.8 objem.%

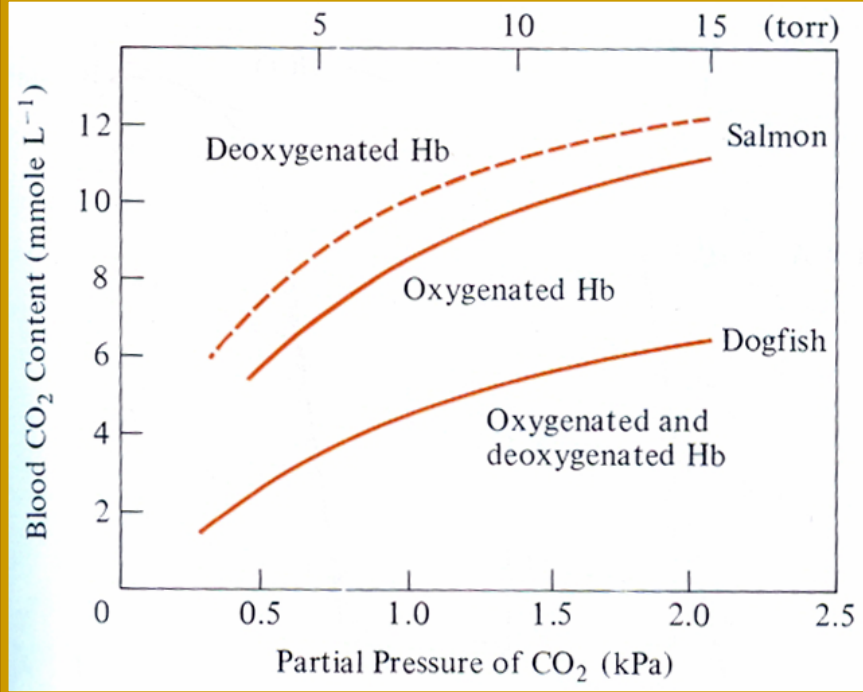
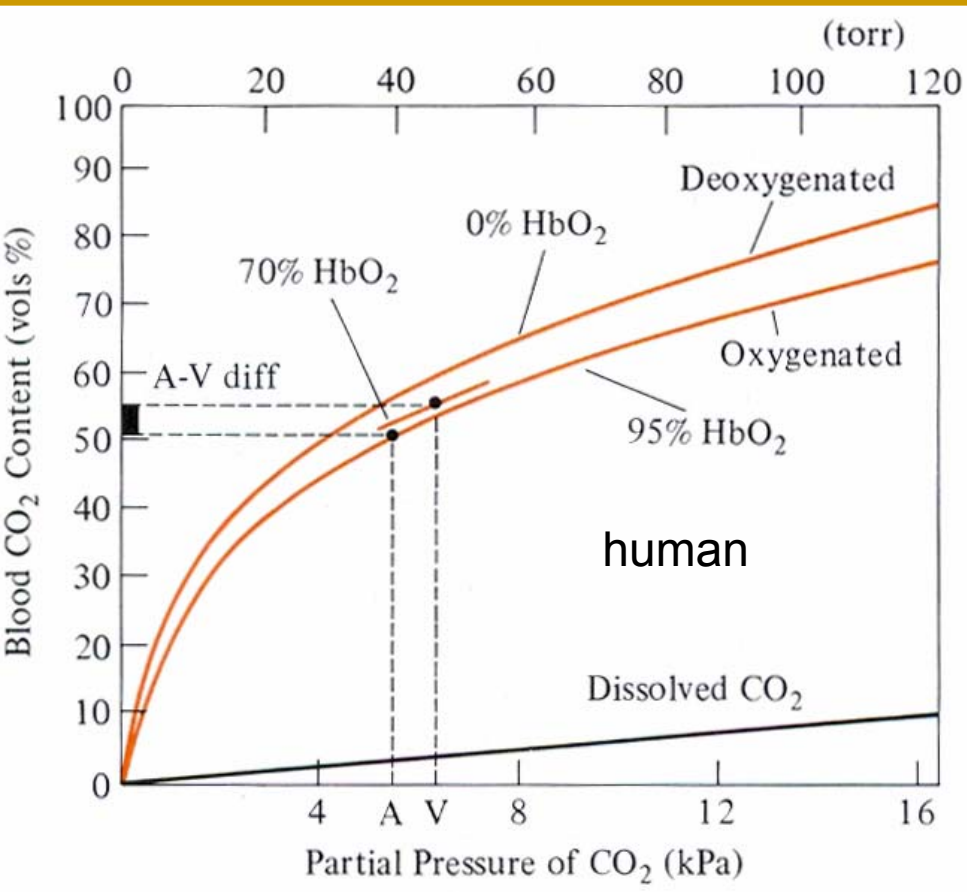
- okysličená krev: 48,2 objem.%, pCO₂ = 5,4 kPa (arterie)

- odkysličená krev: 50 objem.%, pCO₂ = 6,3 kPa (vény)

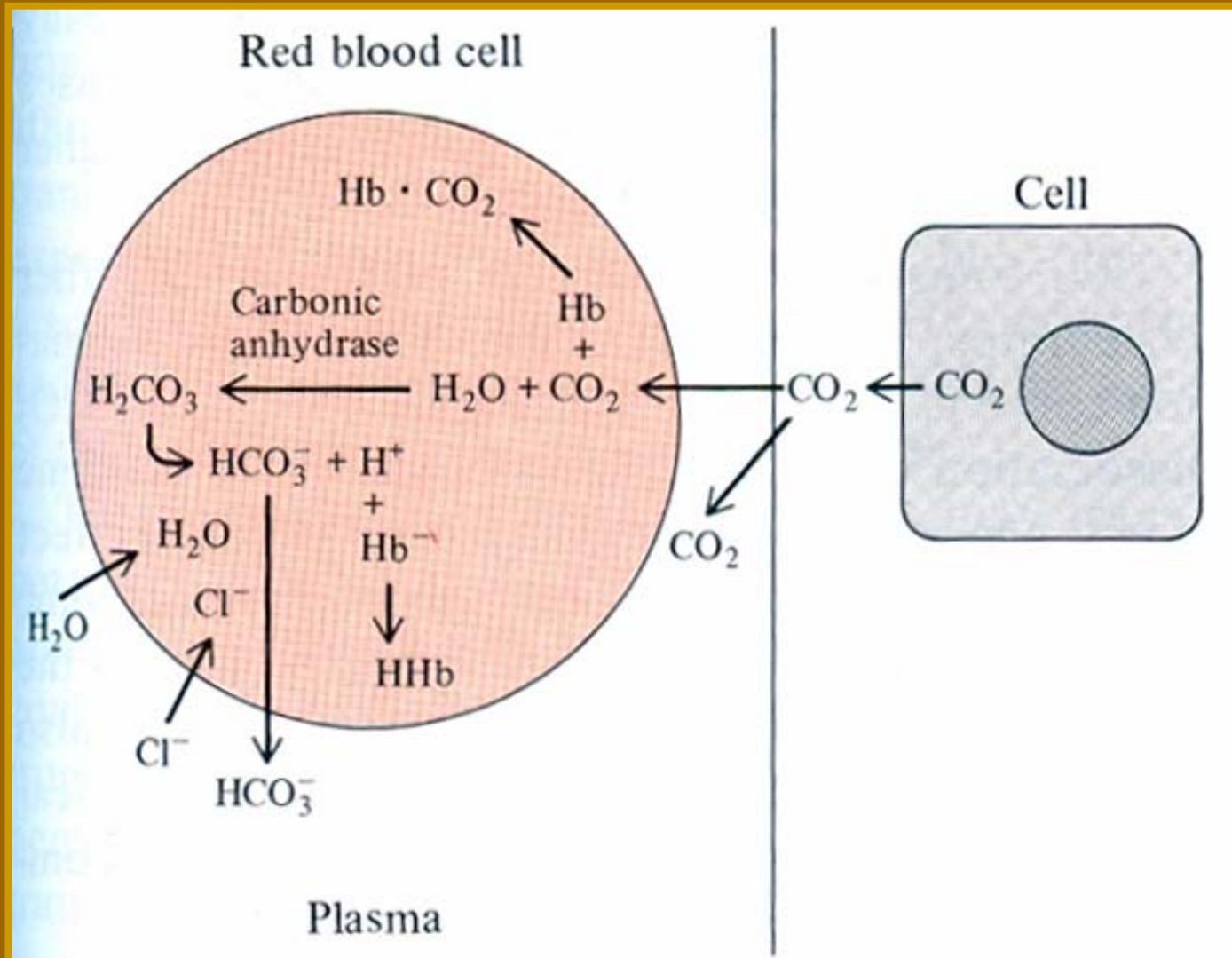
Odkysličená krev má vyšší obsah CO₂ pro stejný pCO₂ -> Haldanův efekt

*) – parametry lidské krve, ale nejsou moc odlišné od ostatních obratlovců

Haldanův efekt



Úloha erytrocytů v transportu CO₂



Membrána erytrocytů je málo prostupná pro kationty. Vznikající HCO₃⁻ je měněn za Cl⁻ (chloridový / Hamburgerův efekt), s Cl⁻ vstupuje i H₂O => větší erytrocyty = vyšší hematokryt

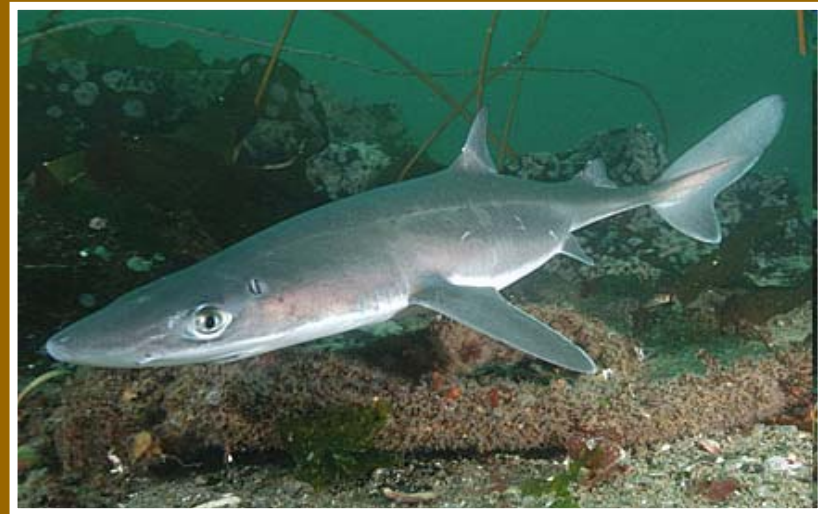
Acido-bazická rovnováha

- voda má pH = 7 při 25°C
- pH tělních tekutin člověka ~ 7,6
- intracelulární pH ~ 7



$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (\text{pK} = \text{pH pro } [\text{A}^-] = [\text{HA}])$$

β - pufrční kapacita; $\beta = \Delta \text{mmol} / \Delta \text{pH}$



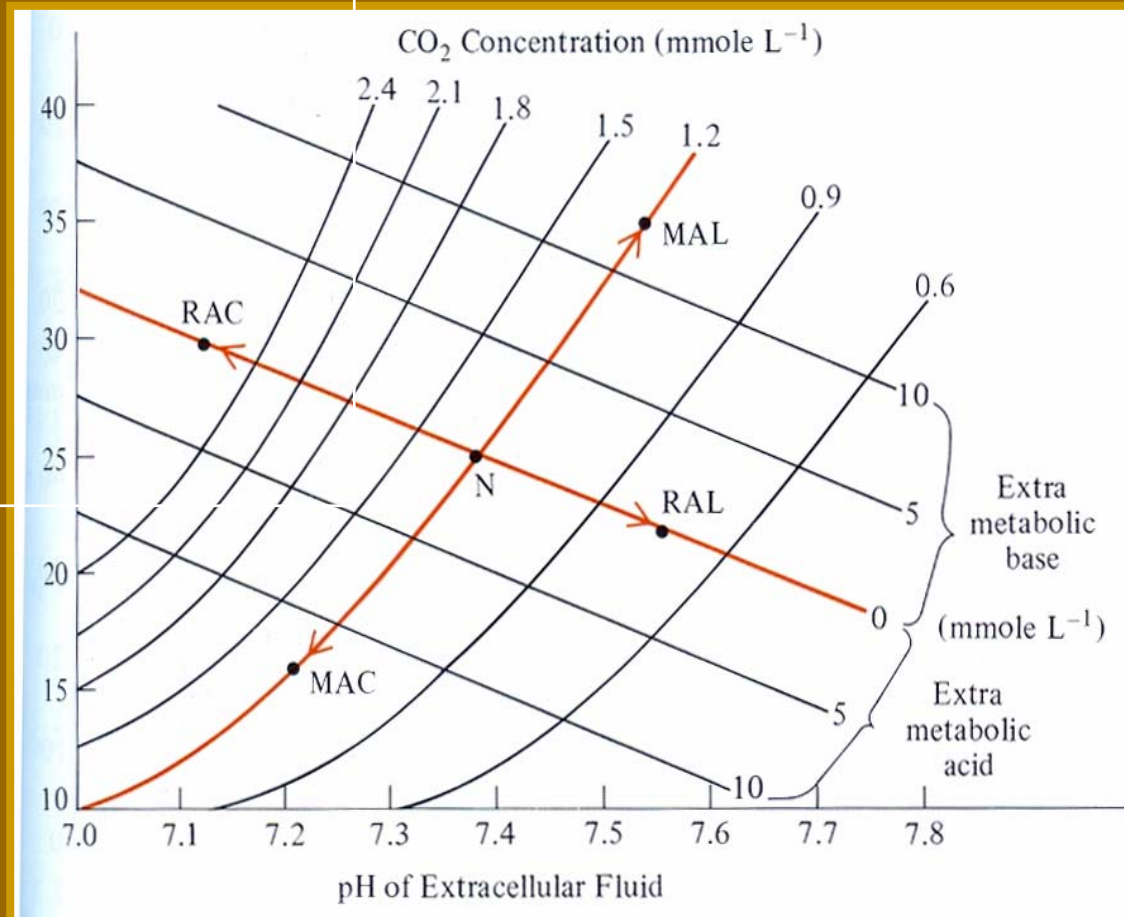
Pufrční základ

tělních tekutin tvoří celková koncentrace HCO_3^- , fosfátů a proteinových anionů. Ostatní ionty (tzv. silné ionty) jsou plně disociovány a nepodílí se na pH.

Pufrační kapacita plasmy a krve u různých druhů

		β
Bahník (<i>Protopterus</i>)		15,2
Žralok (<i>Squalus</i>)	plasma	6,5
	krev	9
Ďas (<i>Opsanus</i>)		6,7
Makrela (<i>Scomber</i>)		14,8
Žábronoš (<i>Necturus</i>)		8,0
Skokan (<i>Rana</i>)		16,4
Aligátor		22,6
Bobr		27
Člověk	plasma	6,5
	krev	30,8

Vztah mezi HCO_3^- (y; mM) a pH
(Daven-port diagram) - člověk



RAC / RAL

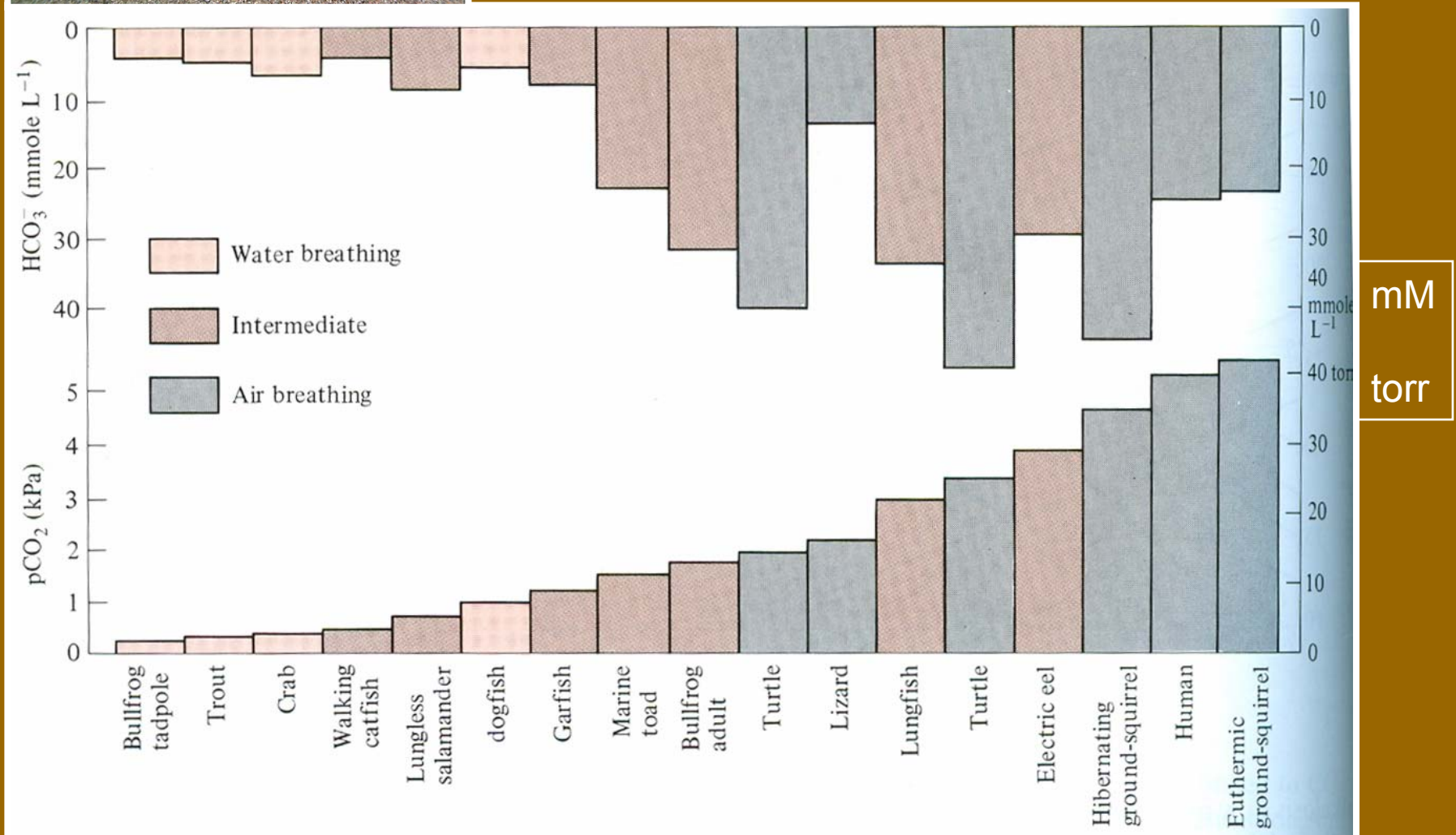
Respirační acidóza / alkalóza

MAC / MAL

Metabolická acidóza / alkalóza

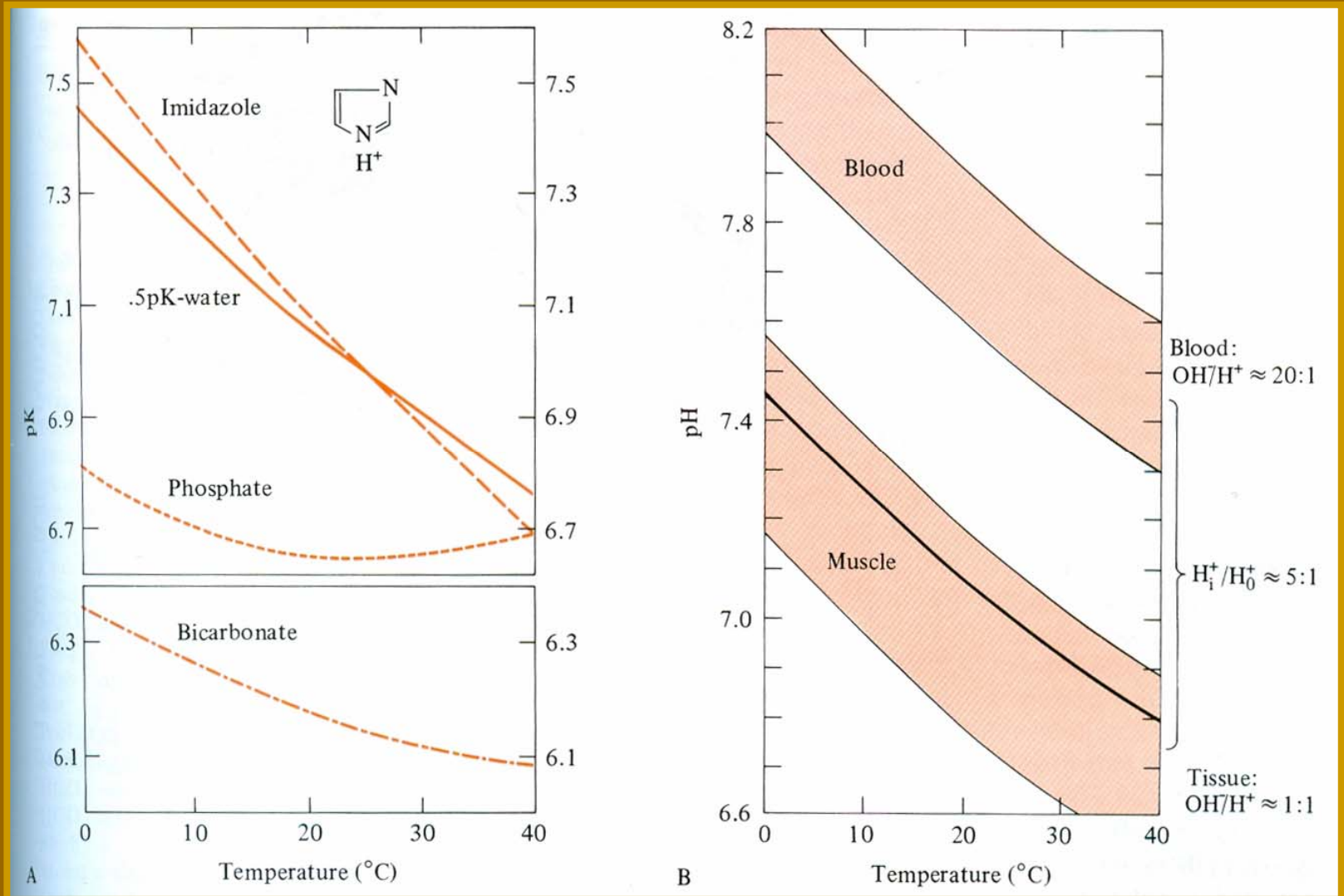


$p\text{CO}_2$ a koncentrace HCO_3^- u některých obratlovců,
- srovnání pro vodní a vzdušné dýchání

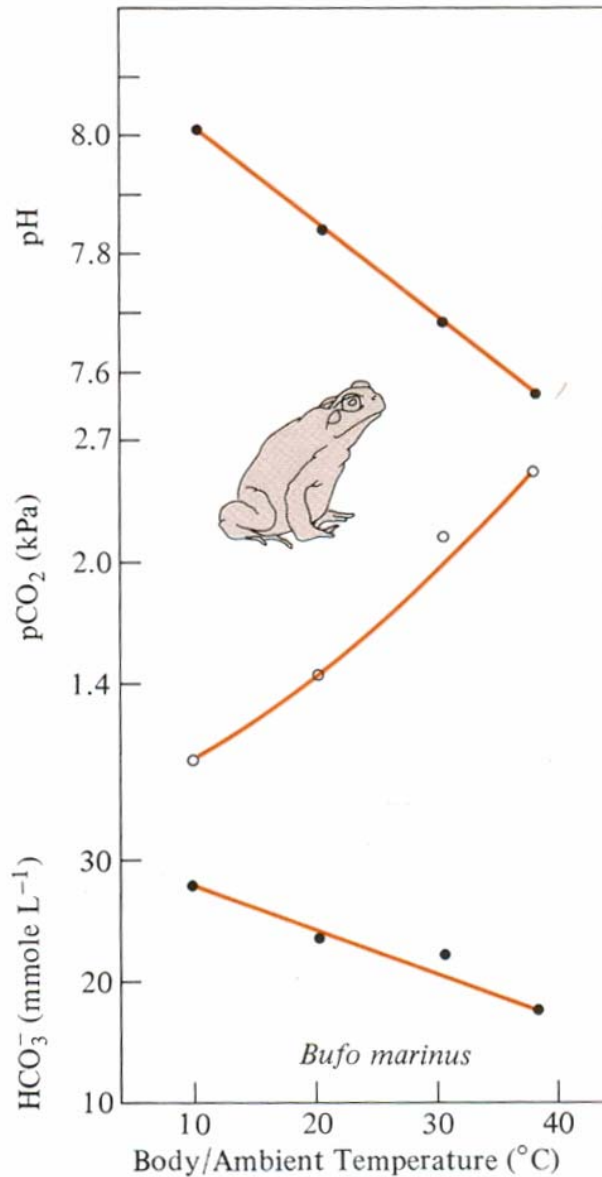


Závislost disociační konstanty na teplotě pro vodu a různé pufrý (A)

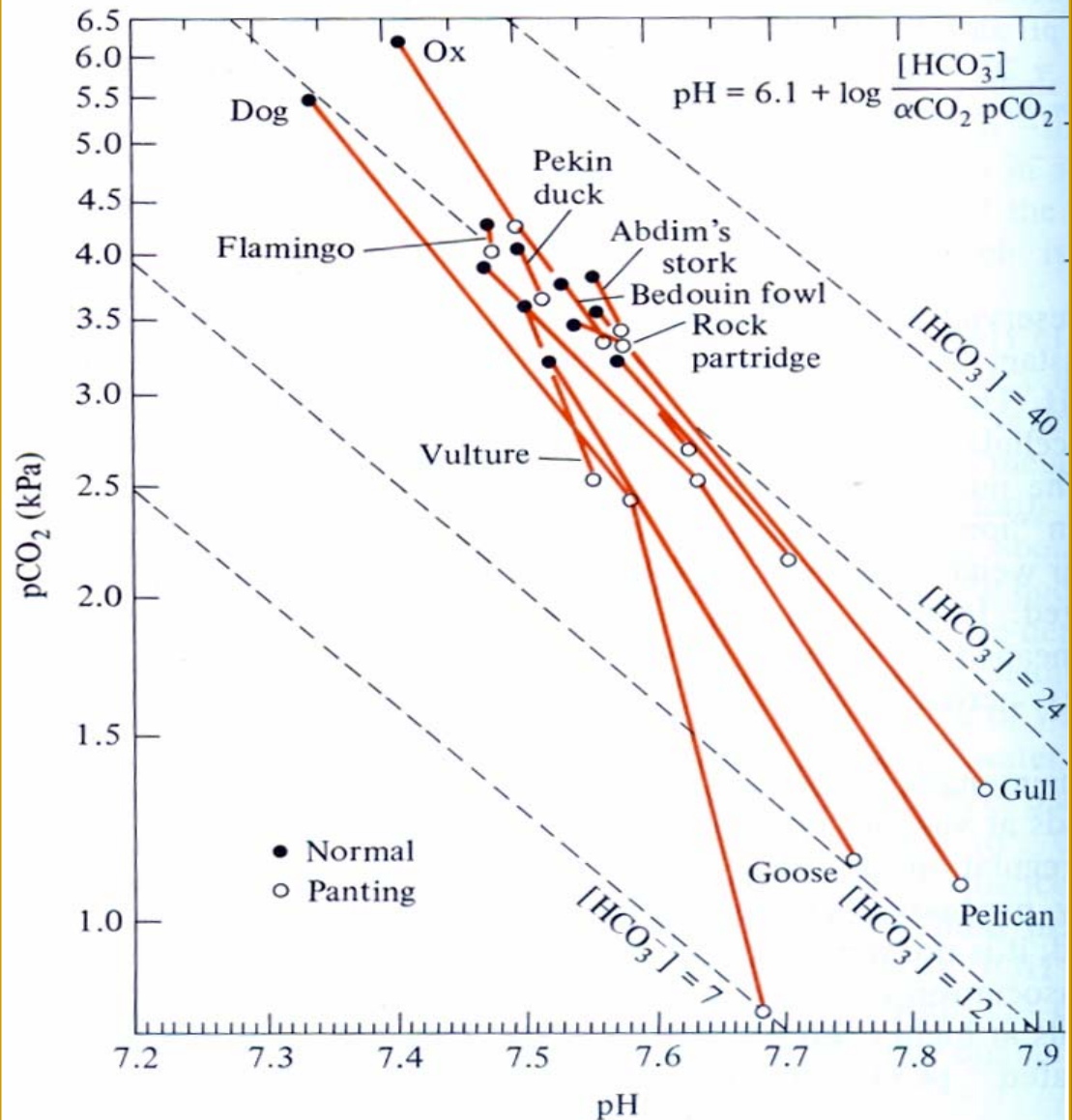
Závislost intracelulárního (svaly) a extracelulárního (krev) pH na teplotě (B)



pH krve, $p\text{CO}_2$ a HCO_3^-
versus teplota těla/okolí



Vtah mezi $p\text{CO}_2$ a pH krve u některých savců a ptáků
v klidu „●“ a při oddechování „○“
Přerušovaná linie nekompenzovaný poměr
pro danou koncentraci HCO_3^-



Změna pH v závislosti na teplotě (organismy x pufr)



$\Delta\text{pH}/\Delta^\circ\text{C}$

Kapr	-0,019
Aligátor	-0,018
Voda	-0,017
Žába	-0,017
Pstruh	-0,017
Mořská želva	-0,016
Ropucha	-0,016
HCO_3^- /imidazol pufr (25mM + 20mM)	-0,015
Žába	-0,013
netopýr	-0,009
myš	-0,009
Pouštní leguán	-0,008
HCO_3^- pufr (25mM)	-0,005
$\text{HCO}_3^-/\text{PO}_4^{3-}$ pufr (25mM + 20mM)	-0,004
Lenochod	-0,003
Ještěrka	-0,002
Hibernující ježek	-0,002
Hibernující křeček	-0,002
Hibernující netopýr	0
Hibernující pozemní veverka	0



IMUNITA



- základní homeostatický mechanismus
- udržování integrity organismu:
 - - obranyschopnost
 - - autotolerance
 - - imunitní dohled
- už u fylogeneticky nejstarších druhů

IMUNITNÍ MECHANIZMY:

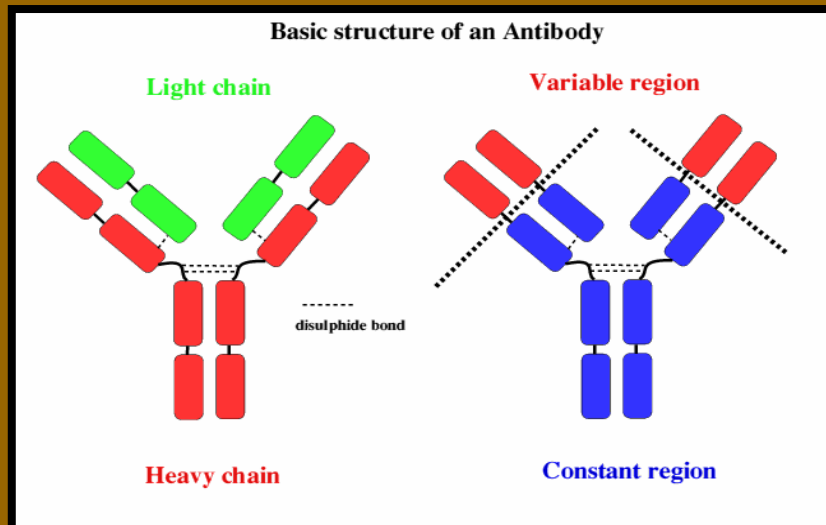
Nespecifické

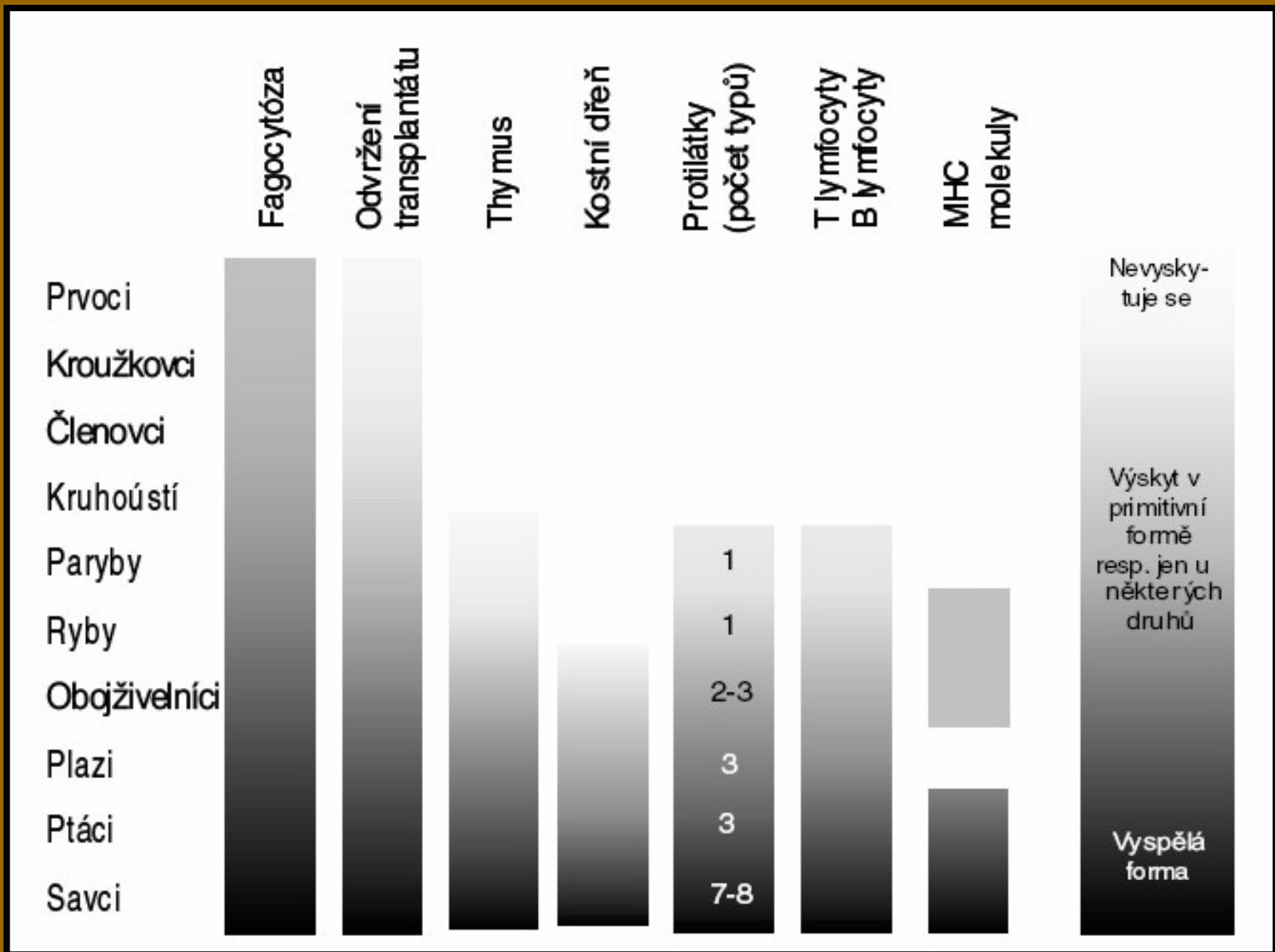
- evolučně starší
- bez imunologické paměti
- reakce na antigen (Ag) řádově v min.
- **bariéry** – mechanické, chemické (**lysozym**), mikrobiální
- složky: **buněčná** (fagocyty, NK) + **humorální** (komplement, interferony, lektiny, další sérové proteiny)

Specifické

- evolučně mladší
- imunologická paměť
- reakce na Ag: dny – týdny
- složky: **buněčná** (T-lymfocyty) + **humorální** (protilátky – Ab)
- Úrovně → geny → molekuly → buňky → orgány (primární + sekundární)

Fakta z roku 1980 (1992)	reakce	imun. spec. reakce	imun. paměť	fago-cytóza	enkap-sulace	nespec. humor. faktory	ameboid. fagocyty	diferen-ciace leuko-cytů	protilát ky
Protozoa	A	N	N	A	N	N	N	N	N
Porifera	A	A	A	N	A	N	N	N	N
Cnidaria	A	A	A	N	A	N	N	N	N
Annelida	A	A	?	A	A	A	A	asi A	N
Mollusca	A	?	?	A	A	A	A	N	N
Arthropoda	A	?	A	A	A	A	A	N	N
Echinodermata	A	A	A	A	A	A	A	A	N
Tunicata	A	asi A	A	A	A	A	A	A	N
Vertebrata	A	A	A	A	N	A	A	A	A





A. Bezčelistnatci (*Agnatha*)

Sliznatky (*Myxinoidea*) nemají organizovaný thymus a jsou vybaveny jen jednoduchými hematopoetickými a lymfopoetickými tkáněmi; krevní „lymfoidní hemoblasty“ zajišťují funkce jak krvinek, tak zánětlivých buněk. Sliznatky jsou schopny „senzibilizovanými lymfocyty“ vypudit cizí štěpy a projevit známky imunologické paměti. V séru se nachází několik bílkovin s vlastnostmi imunoglobulinů.

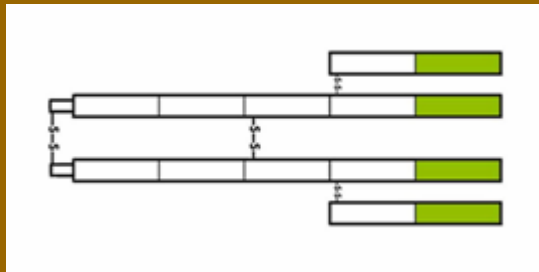


Mihule (*Petromyzones*) - v krvi hemaglutininy a antibakteriální látky odpovídající Ig vyšších obratlovců, fylogenetický přechod mezi protilátkami bezobratlých a obratlovců.



B. Čelistnatci (*Gnathostomata*)

Mají již zřetelný thymus, slezinnou bílou pulpu a dokonalejší tkáňové i krevní lymfocyty, a objevují se u nich **poprvé i plazmatické buňky**. Aloštěpová reakce je velmi účinná, v krvi přibýlo imunoglobulinů, prudčeji probíhají reakce zprostředkované protilátkami IgM.





Paryby (*Chondrichthyes*)

- typické Ig (2 lehké + 2 těžké řetězce),
1 typ Ab – IgM.
- u žraloků brzlík a slezina

Ryby (*Pisces*)

- tkáňové Ag – MHC
- aktivita IgM závisí na teplotě (jako u všech poikilotermů)
- proteiny komplementu uniformní
- plně diferencovaný brzlík a slezina



Obojživelníci (*Amphibia*)

V souvislosti s přechodem z vody na souš

- Kvalitativně vyšší stupeň imunity
- Jsou vytvořeny uzliny a již existuje systém T i B lymfocytů
- Ve střevní tkáni lze nalézt velké množství plazmocytů.



Mloci (*Urodela*)

- nejsou MHC
- hematopoéza v kostní dřeni neprokázána, probíhá v ledvinách a játrech



Žáby (*Anura*)

- Silný MHC
- 2 druhy Ab (IgM a IgG)
- prokázána alergická reakce
- hematopoéza v kostní dřeni
- sekundární lymfat. org. (slezina, ledviny, lymfatické uzliny)
- GALT (gut associated lymphoid tissue).

Plazi (*Reptilia*)

- Podobnost s IS obojživelníků
- Jsou zde přítomny protilátky IgM a objevují se předchůdci IgG, navíc i „slizničního“ IgA.
- Hematopoéza – kostní dřeň, slezina, thymus (s přibývajícím věkem involvuje), v hltanu tonzily
- Není spolehlivě prokázán MHC
- GALT v podobě kloakálního komplexu (anatomicky podobný Fabriciově burze ptáků, ale není jejím ekvivalentem)



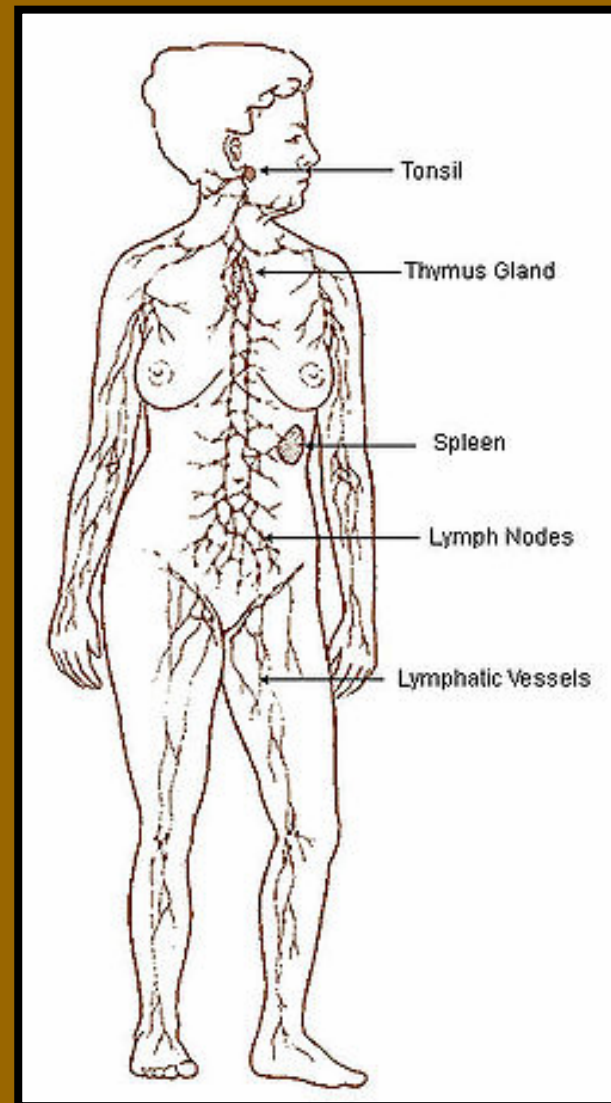
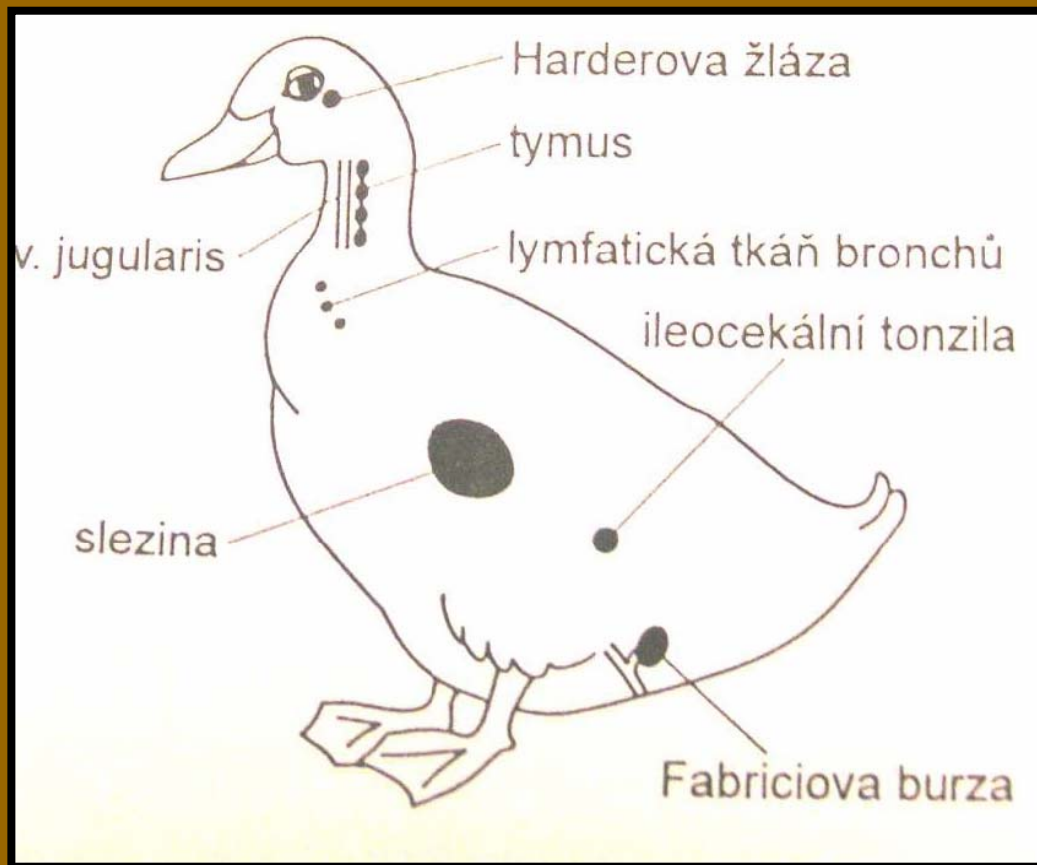
- Krokodýli (*Crocodylia*) mají velmi účinné baktericidní proteiny v krvi (odolnost i proti *Staphylococcus aureus*...)

Ptáci (Aves)

- Zdokonalení lymfoidního systému. Vedle plně vyvinutého thymu (všechny 3 typy T lymfocytů – Th, Tc i Ts) a kostní dřeně se vytvořila Fabriciova burza (bursa Fabricii) - hlavní orgán humorální imunity.
- Dále slezina, lymfat. uzliny (nejsou u kurovitých), Peyerovy plaky, Harderova a pineální žláza.
- Lymfat. tkáň má také difúzní podobu, její ohniska téměř ve všech orgánech – např. myokard, endokrinní org., játra, ledviny, pankreas i příčně pruhovaná svalovina
- BALT (bronchus associated lymphoid tissue)



Lokalizace lymfatických orgánů ptáků a savců

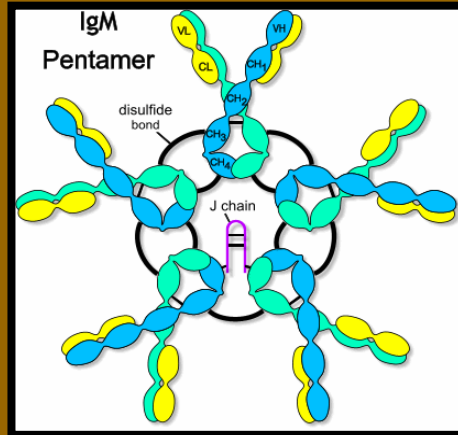


System lymfatických cév (*vasa lymphatica*) není u ptáků tak vyvinut jako u savců. Sbírají lymfu z pletení tvořených lymfatickými kapilárami a odvádějí ji do doprovodných krevních žil. Lymfatické srdce a lymfatické uzliny se vyskytují pouze u kachen a hus.

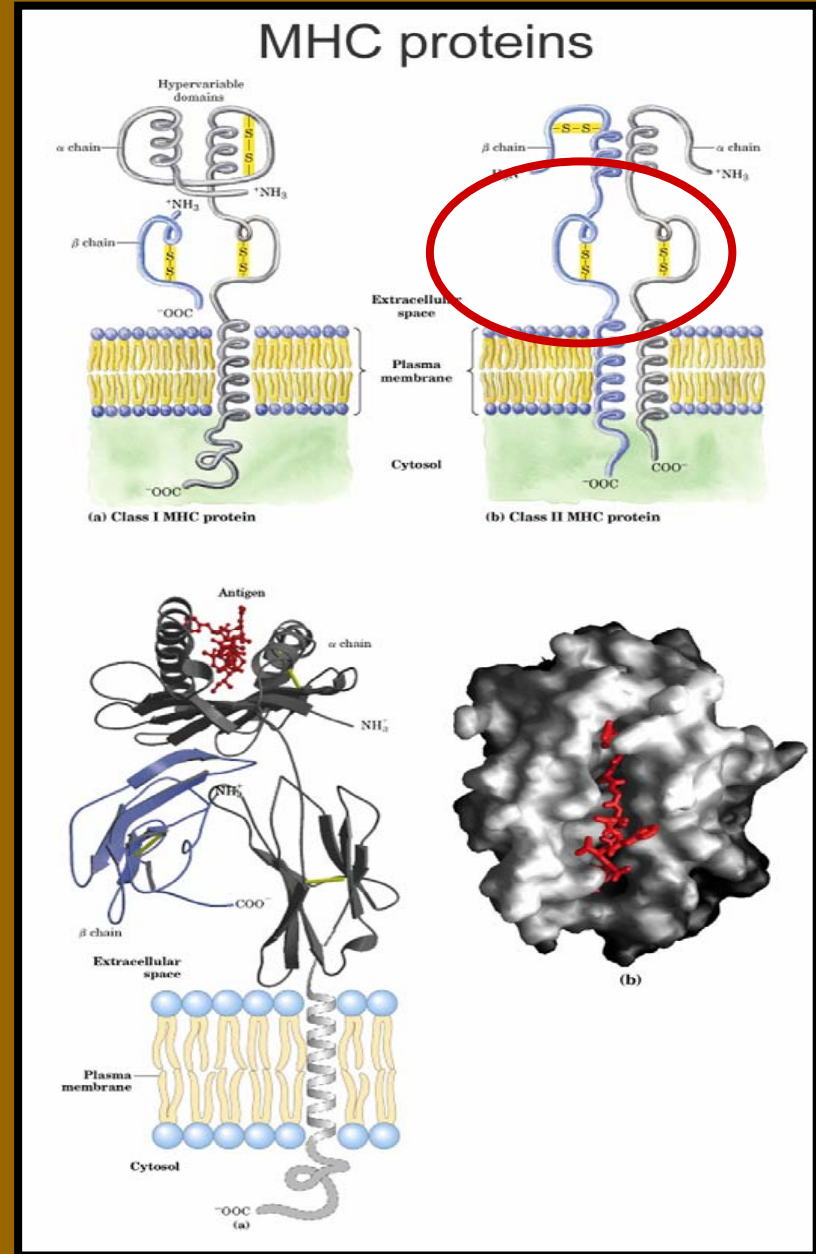
Savci

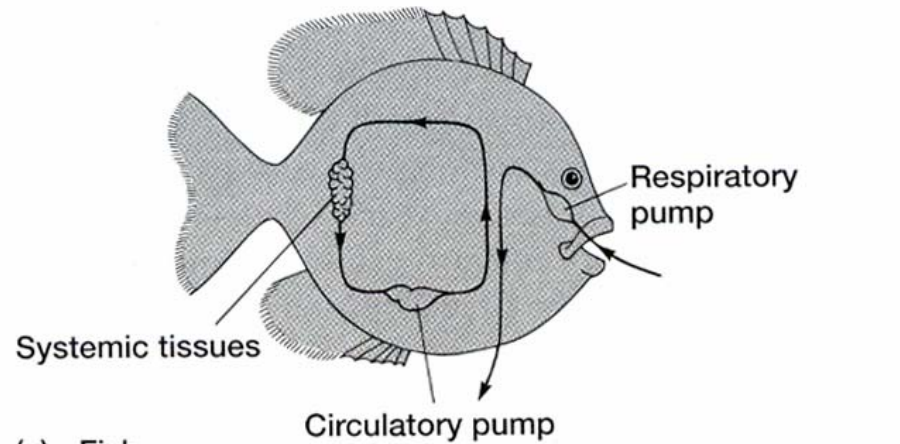
- Savci včetně člověka mají dokonale vybudovaný thymus a systém buněčné imunity. Ig 5 resp. 9 typů (IG1-4, IgM, IgA1-2, IgD, IgE).
- Společný původ řady významných povrchových znaků a receptorů dokazují přesvědčivě analogie a podobnosti v jejich struktuře u nízkých živočišných forem a savců (člověka). Platí to pro druhové, diferenciační i histokompatibilitní znaky i pro receptory fagocytů, dendritických buněk a NK buněk i T a B lymfocytů.
- Geny pro receptory T-lymfocytů a geny pro receptory B-lymfocytů (imunoglobuliny) se začaly odštěpovat od původních pragenů asi před miliardou let a osamostatňovat se před zhruba 600 milióny let. Vývojové zmnožování a rozrůžňování probíhalo pomalu, ale trvale. K divergenci histokompatibilitních znaků I. a II. třídy došlo asi před 200 milióny let.
- Základem vzniku nejspíše selekční tlak vnějšího + vnitřního prostředí, hlavní hnací síla: vztah parazit-hostitel.

Savci (zajímavosti)

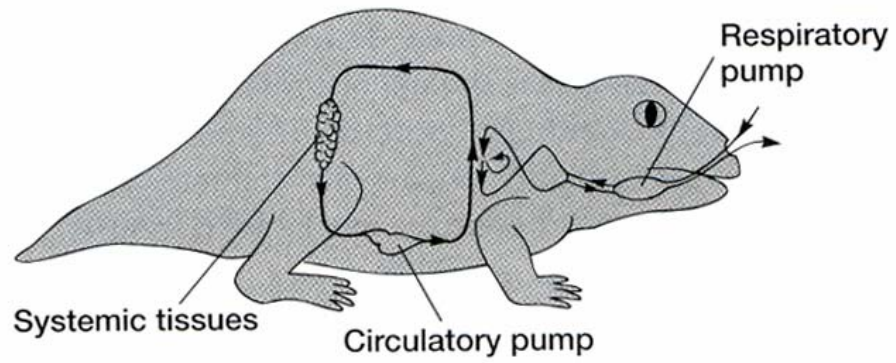


- IgM – 1. Ig ve fylogenezi i ontogenezi
- velbloudi nemají lehké řetězce Ig
- gepard – nízký polymorfismus MHC (bottle neck effect) => genet. homogenizace => citlivost k infekcím, vysoká úspěšnost transplantací (~inbrední kmeny laboratorních zvířat)
- primáti – transplacentární přenos IgG, ostatní skupiny – IgG přes sliznice do mateř. mléka





(a) Fish



(b) Tetrapod