

1 Histologie buněk imunitního systému

Buňky v krevním řečišti, které vykonávají imunitní funkce, se obecně označují jako leukocyty – bílé krvinky. Jejich název je odvozen od bílé vrstvy, kterou formují během centrifugace plné krve. Tyto buňky jsou schopné vycestovat z krevního řečiště a pronikat do okolních tkání, kde provádí imunitní dozor. Jejich zastoupení v pojivech, zejména řídkém vláknitém pojivu, je natolik významné, že jsou považovány za součást této tkáně a nazývají se zde volné buňky pojiva (např. histiocyty, žírné buňky, makrofágy apod.).

Základní dělení leukocytů je podle obsahu barvitelných granul:

1. **Granulocyty** (neutrofily, eozinofily, bazofily)
 - obsahují specifická granula, která se barví podle typu kyselými nebo bazickými komponentami barvicí směsí podle Pappenheima
 - obsahují azurofilní granula, jež jsou považována za lyzozomy a barví se purpurově
2. **Agranulocyty** (monocyty, lymfocyty, makrofágy)
 - neobsahují specifická barvitelná granula, ale obsahují azurofilní granula

	Člověk	Myš	Ptáci	Plazi	Kapr
Absolutní počty [počet v litru]					
Erytrocyty	5×10^{12}	8×10^{12}	3×10^{12}	1×10^{12}	2×10^{12}
Leukocyty	$5-8 \times 10^9$	$6-15 \times 10^9$	20×10^9	7×10^9	70×10^9

Relativní počty [v %]					
Granulocyty					
Neutrofily	50 – 70	5 – 34	–	–	4
Neutrofilní tyčky	3 – 5	–	–	–	1
Heterofily	–	–	30 – 75	30 – 70	–
Eozinofily	2 – 4	0 – 4	0 – 4	0 – 5	1
Bazofily	0 – 1	0 – 1	0 – 5	0 – 30	0
Agranulocyty					
Monocyty	3 – 8	0 – 3	0 – 5	0 – 15	3
Lymfocyty	18 – 40	60 – 95	20 – 65	20 – 48	92

Tab 3.1: Zastoupení krevních buněk v periferní krvi různých živočichů. Absolutní počty udávají počet krevních buněk v 1 litru, zatímco relativní vyjadřují krevní diferenciaci a udávají procentuální zastoupení daného typu leukocytů z celkového počtu leukocytů. Některé hodnoty nelze zobecnit, a proto jsou popsány v následujícím odstavci.

Počet bílých krvinek kolísá i v průběhu dne. Ráno jich je nejméně, odpoledne nejvíce. Za fyziologických podmínek nastává pouze mírná diference v počtu leukocytů, větší úbytek nebo zvýšení počtu nastává jen za chorobných stavů.

U poikilothermních živočichů má největší vliv na hodnoty leukocytů roční období, neboť je spojené s kolísáním teploty. V letních obdobích mají více lymfocytů a heterofilů než v zimních obdobích. U hibernujících plazů je během hibernace nejvyšší hladina eozinofilů. Množství bazofilů u nižších obratlovců je velmi nízké a liší se druh od druhu. U některých plazů lze však najít až 40 % bazofilů (např. některé želvy). Nízké hodnoty lymfocytů pozitivně korelují s hladověním a stresem u živočichů pocházejících z přírody. Obecně lze říci, že hodnoty imunitních buněk jsou velmi závislé na prostředí, ve kterém se daný živočich pohybuje. Proto lze spolehlivé a reprodukovatelné hodnoty zajistit jen u domestikovaných druhů, které jsou chovány za určitých standardních podmínek. Ze všech výše uvedených důvodů je jasné, že hodnoty v tabulce jsou velmi zobecněny. U ryb se vyskytuje v periferní krvi vysoké množství leukocytů, neboť jsou v krvi běžně přítomna i vývojová stadia těchto buněk.

ÚLOHA 2: Mikroskopování krevních nátěrů člověka a myši

Metoda, kterou se určuje procentuální zastoupení jednotlivých typů leukocytů v periferní krvi, se nazývá krevní diferenciál. Je to metoda velmi jednoduchá a rychlá spočívající v přípravě krevního nátěru z periferní krve (cca 5 μ l) a následného obarvení kyselým a bazickým barvivem. Podrobný popis najdete v sekci Obecné laboratorní postupy. Výsledný nátěr se pozoruje pod světelným mikroskopem. Jednotlivé pozorovatelné typy leukocytů jsou popsány v následujícím textu.

Výstup

Zakreslete všechny nalezené typy leukocytů člověka. Poté pozorujte myší nátěry a porovnejte rozdíly mezi krevními buňkami myši a člověka.

3.1 KREVNÍ OBRAZ ČLOVĚKA

3.1.1 Neutrofily

Množství:	60 – 70 % cirkulujících leukocytů
Velikost:	10 – 12 μ m
Tvar jádra:	2 – 5 segmentů spojených tenkou spojkou z jaderné hmoty

U nezralých neutrofilů má jádro segmentaci pouze naznačenou a tento typ buňky je nazýván tyčka nebo tyč (obrázek dole vpravo). Jaderná hmoty obsahuje hrudky chromatinu, jádérka nejsou patrná. U samic savců je někdy na neutrofilech pozorovatelné tzv. Barrovo tělísko – kondenzovaný X chromozóm, který se jeví jako

paličkovitý přívěšek na jednom segmentu. Ve zralých neutrofilech je cca jedna třetina granul azurofilních (primární lyzozomy) a dvě třetiny tvoří granula specifická. Specifická granula se barví velmi slabě kyselými a bazickými barvivy a na preparátu pak působí jako slabě granulózní cytoplazma. Mitochondrie a proteosyntetický aparát je málo vyvinutý, drsné endoplasmatické retikulum chybí. Absence drsného endoplasmatického retikula stejně jako absence jadérek naznačuje nízkou úroveň proteosyntézy. V cytoplasmě neutrofilů je dále obsažen glykogen, což souvisí se schopností neutrofilů přežívat i v anaerobním prostředí (např. v částečně nekrotických tkáních) a dokonce v těchto podmínkách vykonávat své imunologické funkce.

Neutrofily jsou terminální stadia buněk. V oběhu žijí jen 6 – 7 hodin, v tkáních je jejich poločas života 1 – 4 dny bez ohledu na to, zda fagocytují či nikoli.



Zralý neutrofil (segment)

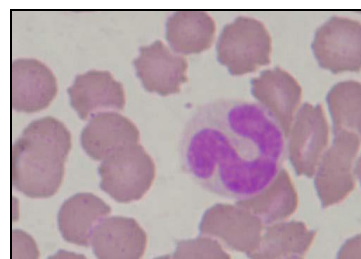


schéma

Mezi nejvýznamnější receptory patří receptor pro Fc fragment IgG (Fc γ R) a receptor pro C3b složku komplementu. Mezi další důležité receptory patří TLR, receptory pro hematopoetické stimulační faktory jako např. faktor GM-CSF nebo G-CSF, receptory pro složky komplementu C5a a C3a, které působí jako anafylatoxiny, a celá řada dalších receptorů.

Hlavní funkcí neutrofilů je **fagocytóza** částic za účelem jejich destrukce bez následné prezentace antigenu. Tuto funkci neutrofilů realizují v několika dílčích krocích:

1. **adherence a chemotaxe:** část neutrofilů cirkuluje jakoby uprostřed krevního proudu v cévách, část se pohybuje relativně pomalu podél endotelu. Při zánětu, kdy dochází ke zvýšené produkci adhezivních molekul se dramaticky zvyšuje adherence neutrofilů na cévní stěny v místě zánětu a jejich průnik do tkání. Za fyziologického stavu je výskyt neutrofilů v tkáních spíše vzácný. V průběhu zánětu je



Nezralý neutrofil (tyčka)

cílená migrace neutrofilů do tkání ovlivňována tzv. *chemotaktickými faktory*, které jsou účinné již v nanomolárních koncentracích a během zánětu se jejich koncentrace mnohonásobně zvyšuje. Obecně jsou zdrojem těchto chemotaktických faktorů antigen prezentující buňky (APC), lymfocyty, trombocyty, endoteliální buňky, ale také samotné bakterie. Jako příklad chemotaktických faktorů lze uvést: anafylatoxiny C5a, C3a, C4a, IL-8, platelet activatig factor, složky bakteriálních povrchů aj.

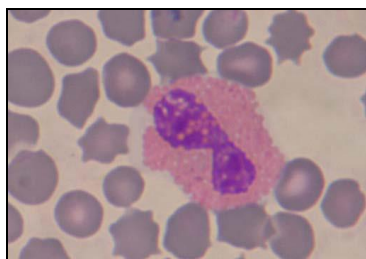
2. **fagocytóza**: představuje pohlcování (ingesci) korpuskulárních částic, pinocytóza pak pohlcování kapalin nebo koloidních roztoků. Pro zdárný průběh fagocytózy je nutná energie a funkční cytoskelet. Výsledkem je tvorba *fagosomu*, který splyne s cytoplasmatickými granuly. Celý proces vede k likvidaci pohlceného materiálu v takto vzniklém *fagolizozomu*.
3. **degranulace**: je vlastní proces vylití obsahu granul do fagolizozomu. Toto je přirozený způsob, který vede k bezprostřední likvidaci pohlcené částice. Za určitých podmínek může být obsah granul uvolněn do extracelulárního prostoru, pokud je tento proces masivní, může vést k významnému poškození tkání v průběhu zánětu. Pokud dojde u neutrofilu k degranulaci, nová granula se v důsledku nízké proteosyntézy už nemohou tvořit.

3.1.2 Eozinofily

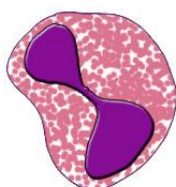
Množství:	2 – 4 % cirkulujících leukocytů
Velikost:	12 – 14 μm
Tvar jádra:	2 segmenty spojené tenkou spojkou z jaderné hmoty (brýlovité jádro)

Stejně jako u neutrofilů se i zde jedná o terminální stadia buněk a mitochondrie, ER a Golgiho komplex jsou málo vyvinuty. Eozinofily jsou trochu větší než neutrofilů, mají typicky dvousegmentové (brýlovité) jádro. Obsahují hodně specifických granul (až 200), která se barví eozinem cihlově červeně. I po obarvení těchto granul je však jádro dobře patrné. Granula jsou výrazně větší než

granula neutrofilů. Vzhledem k tomu, že výsledné zbarvení granul se může mírně lišit podle způsobu, resp. techniky barvení, bývá právě velikost granul hlavním rozpoznávacím kritériem. Granula obsahují bílkovinu s výrazným zastoupením argininu, která se označuje hlavní bazický protein. Primární granula jsou rovněž přítomna.



Eozinofil



schéma

Eozinofily jsou buňky typicky se vyskytující v tkáních, v periferním krevním oběhu je jich řádově méně. Stejně jako neutrofilů patří mezi krátce žijící buňky s poločasem života v krvi 6-12 hodin a v pojivové tkáni několik dní. Jsou schopny fagocytózy avšak ve výrazně menší míře než neutrofilů.

Hlavními receptory eozinofilů jsou receptory pro imunoglobuliny IgE a IgG. Z funkčního hlediska je důležitější receptor pro IgE

označovaný Fc ϵ R, který existuje ve dvou formách s různou afinitou k molekule IgE. Dále se na eozinofilech vyskytují také receptory pro komplement, nebývají však přítomny na všech buňkách.

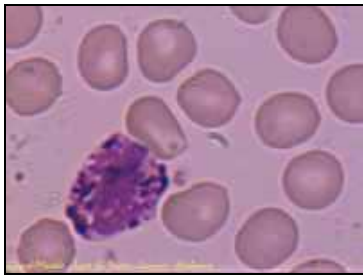
Eozinofily hrají významnou úlohu v boji s endoparazity, zejména mnohobuněčnými helminty, kteří parazitují ve tkáních. Předpokládá se, že v průběhu imunitní reakce dochází v tkáni k přímému kontaktu většího počtu eozinofilů s parazitem a látky uvolňované z granul do extracelulárního prostředí přímo narušují tkáň parazita. Zvýšený výskyt a zvýšená aktivace eozinofilů je součástí patologického procesu u řady imunopatologických chorob, např. astmatu, atopické reaktivity a dalších.

3.1.3 Bazofily

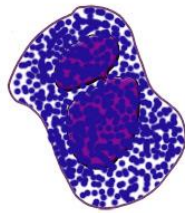
Množství:	Méně než 1 % cirkulujících leukocytů
Velikost:	9 – 10 μm
Tvar jádra:	Esovitě, někdy laločnaté, překryté granulami

V periferní krvi jich je velmi málo, což znamená, že v krevním nátěru při klasickém hodnocení jednoho sta buněk stěží najdeme jeden bazofil. Jádro je méně kondenzované než u ostatních granulocytů, bývá esovitěho tvaru a často je překryto specifickými granulemi, protože tato se podobně jako jádro

barví zásaditými složkami barviva. Hlavní komponentou specifických granúl je histamin a heparin, takže se mohou uplatnit při vazodilataci a koagulaci. Žijí také jen asi 1 den, maximálně týden.



Bazofil



schéma

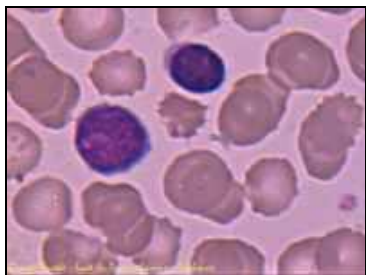
Nejdůležitějším receptorem bazofilů je vysokoafinní $Fc\epsilon R$. Bazofily vykazují řadu podobností s žírnými buňkami, které se v minulosti označovaly jako tkáňové bazofily. Jedná se však o odlišné typy buněk, vzniklé z jiných prekurzorů kostní dřeně. Bazofily se vyskytující pouze v krevním oběhu.

3.1.4 Lymfocyty

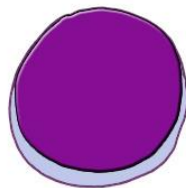
Množství:	24 – 40 % cirkulujících leukocytů
Velikost:	6 – 8 μm
Tvar jádra:	Kulaté, prakticky vyplňuje celou buňku

Podle stupně diferenciaci rozeznáváme lymfocyty malé, střední a velké. V periferním oběhu převládají malé lymfocyty, které mají průměr 6 – 8 μm . Kulovité jádro, které vyplňuje téměř celou buňku, se intenzivně barví. Chromatin je

kondenzován ve formě hrubých zrněk. Cytoplazma se v krevních nátěrech jeví jako světle modrý úzký lem okolo jádra a je bazofilní. V lymfocytech jsou obsaženy mitochondrie a proteosyntetický aparát.



Malý lymfocyt



schéma

Většina lymfocytů žije několik měsíců. Výjimku tvoří pouze tzv. paměťové buňky, ať už diferencované z T lymfocytů nebo B lymfocytů. Paměťové buňky jsou schopny přežít po celý život jedince.

Ve světelném mikroskopu nelze rozeznat, zda se jedná o T nebo B lymfocyty a potíže může činit i určení velkých lymfocytů pro jejich podobnost s monocyty a NK buňkami. Imunocytochemickými metodami bylo zjištěno, že většina lymfocytů kolujících v krvi jsou

dlouho žijící paměťové T lymfocyty. Pouze asi 15 % cirkulujících lymfocytů jsou B lymfocyty, které se po antigenním podnětu mohou několikrát dělit (proliferační) a vyvrát (diferenciace) v plazmatické buňky produkující ve tkáních protilátky. T i B lymfocyty mohou vyvrát buď v tzv. efektorová stadia, nebo v paměťové buňky, které mohou přežít v organismu mnoho let, patrně i po celý život jedince. U člověka a některých dalších savců dochází po pubertě k postupné involuci thymu a jeho přeměně na tukovou tkáň. Přesto však zůstává buněčná imunita funkční až do konce života. Není zcela jasné, zda a pokud ano tak kde, se uskutečňuje maturace a „školení“ T lymfocytů.

Vývoj lymfocytů je poměrně komplikovaný a některé jeho detaily stále nejsou zcela objasněny. Lymfocyty vznikají z lymfoidní pluripotentní buňky v kostní dřeni. Diferenciace v imunokompetentní buňky se uskutečňuje v primárních imunitních orgánech: thymu (T lymfocyty) a kostní dřeni (B lymfocyty). U ptáků je za místo dozrávání B lymfocytů považována Fabriciova burza; objevena v 60. letech minulého století. Diferenciace v imunokompetentní buňky mimo jiné znamená, že z celkové populace lymfocytů vytvořených v organismu se zachovají pouze ty, které mají optimální afinitu k vlastním MHC molekulám, resp. endogenním peptidům prezentovaným těmito molekulami. Ostatní lymfocyty, jejichž receptory vykazují k těmto molekulám příliš nízkou nebo naopak příliš vysokou afinitu zanikají procesem apoptózy. Rozsah tohoto děje je obrovský: předpokládá se, že až 80 % vytvořených lymfocytů zaniká v thymu z důvodu této „nevhodné“ receptorové výbavy. Vysvětlení je pravděpodobně takové, že lymfocyty v této své vývojové etapě



Střední lymfocyt

exprimují celé spektrum receptorů příslušného živočišného druhu. To je z evolučního hlediska výhodné, protože se tím zvyšuje pravděpodobnost, že se vždy najde jedinec v rámci populace, který bude svými receptory na imunitních buňkách schopen reagovat na určitý (třeba atypický) antigen.

3.1.5 Monocyty

Množství: 3 – 8 % cirkulujících leukocytů

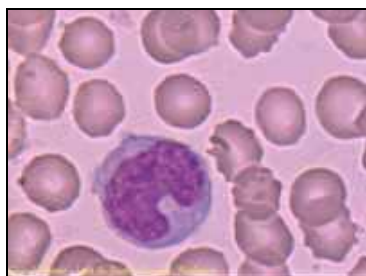
Velikost: 12 – 20 μm

Tvar jádra: Oválný až ledvinovitý tvar

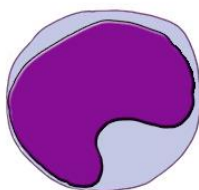
Největší buňky periferní krve, často jádro s ledvinovitým výkrojem, který však nemusí být v mikroskopu vždy patrný (záleží na tom „z které strany“ buňku pozorujeme). Chromatin je na rozdíl od lymfocytů méně kondenzovaný, jádra se tudíž jeví světlejší než u lymfocytů.

Cytoplazma obsahuje jemná azurofilní granula (lyzozomy), která jsou na hranici rozlišitelnosti světelného mikroskopu. Je třeba si uvědomit, že cytoplazma monocytů i lymfocytů obsahuje určité malé množství granul, jako např. lyzozomy nebo glykogenová granula, ale na rozdíl od granulocytů není obsah granul hlavní funkční a morfolofickou charakteristikou těchto buněk. Na monocytech mohou být patrné i výběžky cytoplazmy svědčící o probíhající fagocytóze. V jádře se mohou vyskytovat jadérka a dobře je vyvinutý i proteosyntetický aparát.

Poločas setrvání monocytů v krvi je 12 – 100 hodin, poté zpravidla pronikají do tkání, kde se ve vazivu diferencují na tkáňové makrofágy. Mezi nejvýznamnější makrofágy patří např. Kupfferovy buňky v játrech, alveolární makrofágy v plicích sklípcích, osteoklasty v kostní tkáni či mikroglie v tkáni nervové. V tkáních pak mohou žít i několik měsíců.



Monocyt



schéma

Mezi nejvýznamnější receptory buněk monocyto-makrofágové řady patří receptory Fc γ R a receptory pro C3b složku komplementu. Tento výčet je pouze orientační, v obou případech mají monocyty k dispozici několik podtypů těchto receptorů s různou afinitou a různou mírou výskytu. Buňky monocyto-makrofágové řady exprimují na povrchu také komplexy MHCII třídy, díky kterým se řadí mezi významné antigen prezentující buňky.

3.1.6 Trombocyty

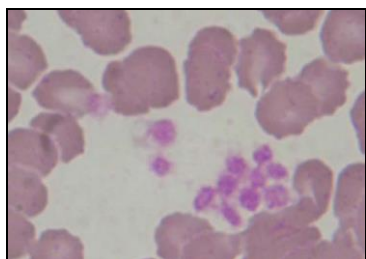
Množství: 250 000 – 400 000 na μl

Velikost: 2 – 4 μm

Tvar jádra: bezjaderné

Nejedná se o pravé buňky, ale o bezjaderné okrsky cytoplazmy odškrcené z mateřské buňky – megakaryocytu, který je polyploidní a nachází se v kostní dřeni. Chybí jim tedy jádro a nejsou schopny aktivní transkripce. Patří mezi krátce žijící buňky, v periferní krvi

přetrvávají zhruba 10 dní. Membrána destiček je bohatá na glykosoaminoglykany a glykoproteiny a má zřejmě význam pro adhezi destiček na poškozená místa v cévách a vzájemné agregace destiček. Destičky obsahují velké množství granul, která jsou ohraničena membránou a obsahují také glykogenové inkluze. V tzv. α -granulích je obsažen fibrinogen. V krevních nátěrech je vidíme často ve větších shlucích nepravidelného tvaru.



Shluk trombocytů (světlé)



schéma

Všechny funkce trombocytů nejsou ještě dokonale prostudovány, ale nejdůležitější z nich je bezesporu esenciální úloha v ochraně organismu před ztrátou krve.

Pozn.: Trombocyty, podobně jako erytrocyty, jsou bezjaderné pouze u savců. U ostatních obratlovců se jedná už o pravé buňky s jádrem, většinou oválného tvaru, přičemž tvar buňky kopíruje tvar jádra.

3.1.7 Další buňky imunitního systému

V imunitní odpovědi se uplatňují i další málo početné typy buněk, které významně ovlivňují průběh imunitní odpovědi např. dendritické buňky nebo NK buňky. Existence těchto a dalších minoritních buněčných populací, stejně jako fakt, že v krevních nátěrech vidíme buňky různého stáří (některé těsně po vyplavení z kostní dřeně, jiné těsně před zánikem), bývá příčinou toho, že je někdy obtížné buňku jednoznačně zařadit do konkrétního typu. Někdy je proto vhodné při vizuálním hodnocení krevních nátěrů přidat také kategorii "neznámý typ", čímž se tento problém vyřeší.

Dendritické buňky

Dendritické buňky se v periferním oběhu vyskytují v množství odpovídajícím cca 1 % všech mononukleárních buněk, tedy ještě méně než např. bazofily. Pro tyto buňky jsou typické dlouhé membránové výběžky, které se podobají dendritům nervových buněk a umožňují kontakt s ostatními buňkami. Jejich jádro je nepravidelné a obsahuje malá jadérka. Nesou mnoho mitochondrií, ale málo lyzozomů, ribosomů a endoplasmatické retikulum také není příliš vyvinuté.

Nezralé DC jsou vybaveny odpovídajícími receptory, které usnadňují jejich kontakt s mikrobiálními agens. Velmi účinná je fagocytóza zprostředkovaná membránovými receptory, dále například makropinocytóza. Kromě významných receptorů pro obecné patogenní vzory (jako jsou například TLR, MMR - *macrophage mannose receptor*), mají tyto buňky na svém povrchu např. receptory FcγR, FcεR a receptor pro C3b složku komplementu, prostřednictvím kterých jsou například účinně endocytovány imunitní komplexy.

Dendritické buňky jsou nejdůležitější antigen prezentující buňky, které mají schopnost stimulovat naivní T a B buňky a regulovat tak imunitní odpověď organismu. Jsou rozmístěny téměř ve všech tkáních organismu (nejvíce v kůži). Pohlcují antigeny a následně migrují do sekundárních lymfatických orgánů, kde zpracovaný antigen prezentují T buňkám, čímž je umožněn rozvoj účinné imunitní odpovědi.

Žírné buňky (mastocyty)

Vyskytují se ve tkáních v oblasti tzv. imunologických bariér, tedy v místech, kde dochází ke kontaktu vnitřního prostředí organismu s vnějším prostředím: v kůži, sliznicích na vstupu dýchacího a trávicího traktu a v plicní tkáni. Podle místa výskytu se mohou mírně odlišovat ve své receptorové a enzymatické výbavě, není to tedy zcela jednotná populace buněk. Hlavním receptorem žírných buněk je vysokoafinitní FcεR a charakteristická jsou granula s obsahem histaminu, který je vyšší než u bazofilů. Lidské mastocyty mívají různý tvar - kulovitý, vřetenovitý apod.

NK buňky

NK buňky se vyskytují převážně v periferní krvi. Jejich jádra jsou kulatá nebo se zářezem a cytoplazma obsahuje azurofilní granula (lyzozomy). Morfologicky představují NK buňky přechodný typ mezi lymfocyty a makrofágy.

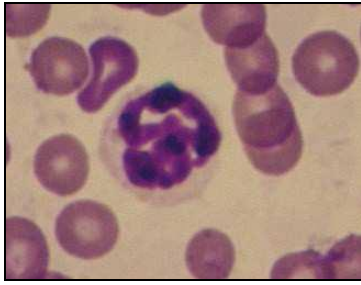
Endoteliální buňky

Patří k významným regulátorům imunitní odpovědi. Po aktivaci prozánětlivými cytokiny a regulátory zánětu jako jsou tromboxany a leukotrieny výrazně zvyšují expresi adhezivních molekul. Tímto způsobem může být zvýšen a topograficky cíleně směřován vstup imunitních buněk (neutrofilů, monocytů a lymfocytů) do tkání. Samotné endoteliální buňky jsou zdrojem řady cytokinů, např. IL-1, GM-CSF aj.

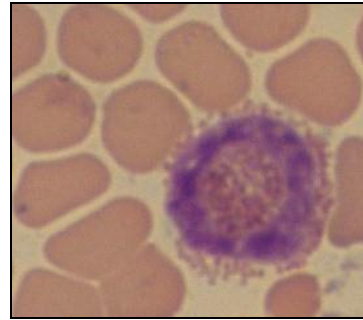
3.2 KREVNÍ OBRAZ MYŠI

U myši lze kromě normálních neutrofilů pozorovat také neutrofile s prstencovitým tvarem. Jejich počet se zvyšuje při zvýšené granulopoeze (zvýšená tvorba granulocytů). Podobně i myši eozinofily mají prstencová jádra. Nezralé formy neutrofilů – neutrofilní tyčky nejsou za fyziologického stavu pozorovatelné v periferní krvi.

Krevní obraz: lymfocyty, monocyty, neutrofily, eozinofily, bazofily



Myší prstencovitý neutrofil



Degranulující myší eozinofil

3.3 KREVŇÍ OBRAZ PTÁKŮ, PLAZŮ, OBOJŽIVELNÍKŮ A RYB

U ptáků, plazů, obojživelníků a ryb jsou erytrocyty a trombocyty oválné a s vyvinutým jádrem. U plazů a ryb jsou obvykle širší než u ptáků. Počet erytrocytů je u jednotlivých druhů živočichů poměrně stálý. U všech obratlovců nacházíme u samčího pohlaví zpravidla o 5 - 10 % více červených krvinek než u pohlaví samičího. Ovšem procentuální zastoupení erytrocytů v krvi se velmi liší u různých tříd: u savců je asi 45 %, u ptáků asi 35 %, a u některých ryb nebo obojživelníků jen kolem 20 %. Podobně je to i s obsahem rozpuštěných látek v plazmě. Na vodu připadá v plazmě člověka 91 - 92 %, na rozpuštěné látky 8 - 9 %. Na nižším fylogenetickém stupni je procento rozpuštěných látek nižší, např. u plazů a ptáků kolem 4,5 %, obojživelníků asi 2,5 %.

U ryb, obojživelníků a plazů nebyly prokázány jednotlivé subpopulace T lymfocytů (Th, Tc).