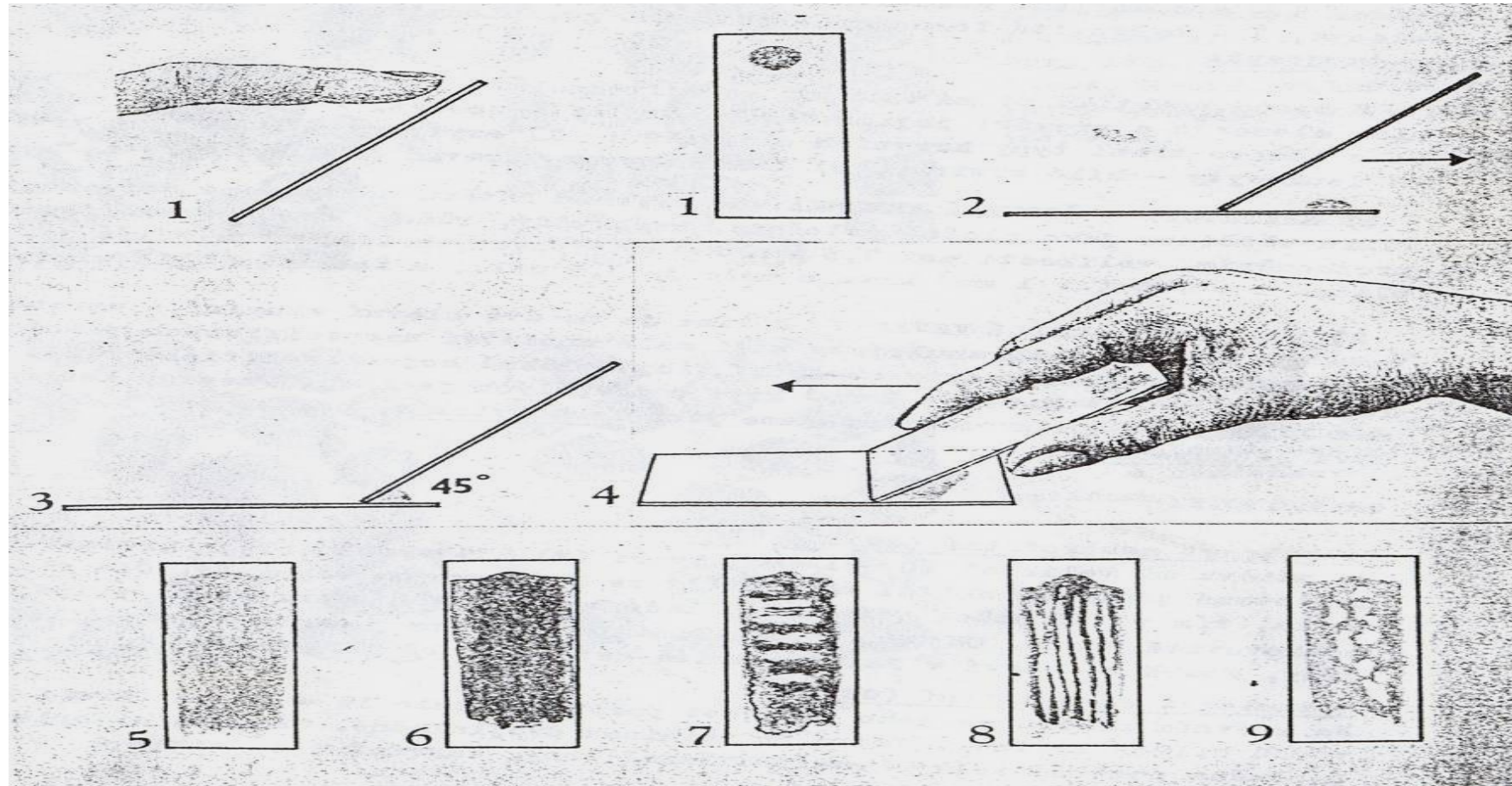


Imunologie cvičení 3

Buňky imunitního systému

MVDr. Mgr. Monika Dušková, Ph.D.

Příprava krevního roztěru (nátěru)



5 Správně

6 Příliš tlustý
Moc krve

7 Nerovnoměrný
tah
Třásla se ruka

8 Krev se
srážela

9 Mastné
sklíčko

Barvení nátěrů

Standardním barvením pro krevní nátěry je tzv. **panoptické barvení dle Pappenheima**:

1. Celý nátěr na 3 minuty pokryjeme **May-Grünwaldovým barvivem**.
2. Opatrně přikapáváme destilovanou vodu tak, aby se původní barvivo nesmylo. Cílem je nechat působit takto naředěné barvivo (1:1) další 1 minutu.
3. Barvivo slijeme, můžeme opláchnout vodou.
4. Na nátěr naneseeme **Giemsa-Romanowského barvivo**. Toto barvivo musí být před barvením vždy čerstvě naředěné přibližně 1:9 (na 10 ml destilované vody 10 - 15 kapek barviva). Necháme působit přibližně 15 minut (10 - 20 minut).
5. Barvivo slijeme a důkladně opláchneme pod tekoucí vodou.
6. Spodní stranu sklíčka očistíme utěrkou.
7. Je vhodné ihned zkontrolovat probarvenost krevních buněk a případně preparát ještě dobarvit.

Barvení pomocí hotových barvicích sad

Výhody:

- rychlé (cca 1 – 2 min)
- roztoky již připraveny
- vydrží dlouho (měsíce)
- ze skladovat při pokojové teplotě
- používají se opakovaně

Příklady barvicích sad:

Leukodif

Diff-Quik

Nevýhody:

- Neposkytují tak dobré výsledky jako klasické barvicí techniky
- Ve výzkumu nebo při hodnocení sporných patologických nálezů je lepší použít klasické techniky, přestože jsou časově náročnější

Postup barvení :

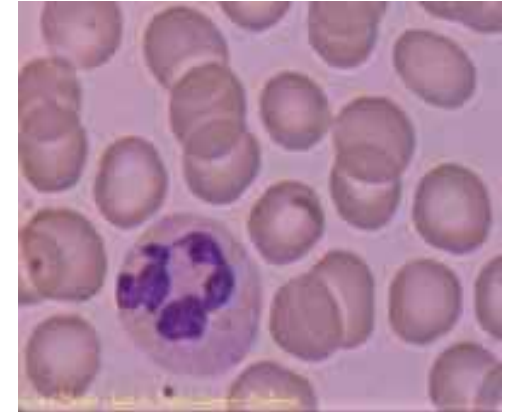
Nátěr musí být suchý

1. Fixační činidlo (metanol) 5 x 1 s
2. Eozin 5 x 1 s
3. Azur 5 x 1 s
4. Oplach (fosfátový pufr pH 7,4 nebo dest. voda)

**Mezi jednotlivými kroky neoplachujeme ani nesusíme,
Na konci nechat zaschnout a pozorovat pod imerzí**

Vyhodnocování krevního nátěru

- Pozorujeme zásadně pod imerzí
- Správná oblast pro hodnocení: **kde se krvinky příliš nedotýkají**, v této oblasti prohlížet preparát při tzv. **meandrovitém pohybu (C)**
- **Krevní diferenciál (dif)**: procentické zastoupení jednotlivých typů leukocytů
- Krevní obraz: kompletní hodnocení počtu a morfologie formovaných krevních elementů
- Orientační pomůcka:
na jeden leukocyt připadá asi 700 erytrocytů



B

| | | % |
|-------------|-----------|----|
| NEUTR. GR. | ### II | 65 |
| NEUTR. TYČE | I | 2 |
| EOS. GR. | /// | 3 |
| BASOF. GR. | I | 1 |
| MONOCYTY | /// | 4 |
| LYMFOCYTY | ### ## II | 25 |

C

Srovnání počtů leukocytů u různých tříd

| | Člověk | Myš | Ptáci | Plazi | Kapr |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Absolutní počty [<i>počet v litru</i>] | | | | | |
| 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 |

Granulocyty

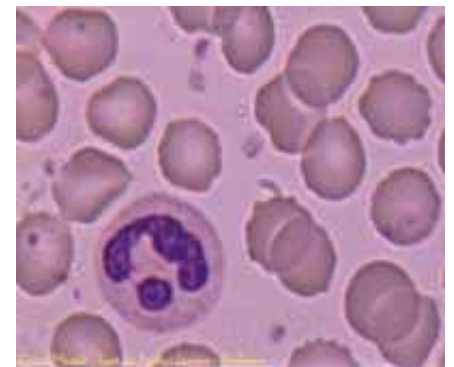
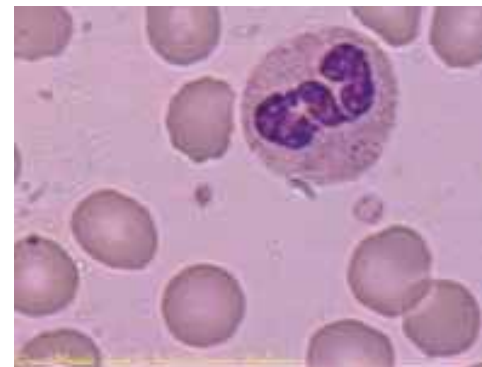
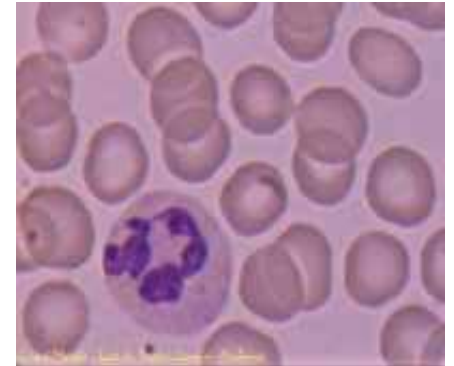
- **Jádro segmentované**
- **V cytoplasmě mají granula:**
 - specifická granula, barví se podle typu kyselými nebo bazickými komponentami barviv dle Pappenheima
 - azurofilní granula jsou považována za lyzozomy a barví se purpurově

Neutrofil

- velikost 10 – 12 μm , segmentů 2 – 7, Hynkovo číslo, posun doleva
- hlavní funkcí neutrofilů je **fagocytóza**
- **1/3** granul azurofilních (primární lyzozomy), zbytek granula specifická
- nízká úroveň proteosyntézy, glykogen v cytoplasmě - přežívá i v anaerobním prostředí
- v oběhu žijí jen 6 – 7 hodin

Receptory:

- Fc fragment IgG (Fc γ R)
- C3b složku komplementu, složky komplementu C5a a C3a
- TLR
- hematopoetické stimulační faktory GM-CSF nebo G-CSF

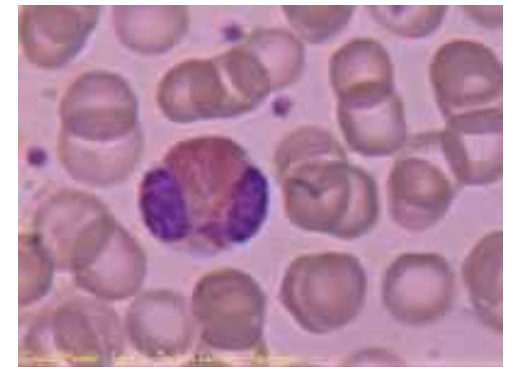
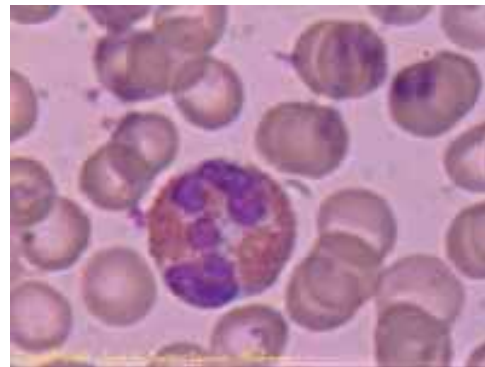
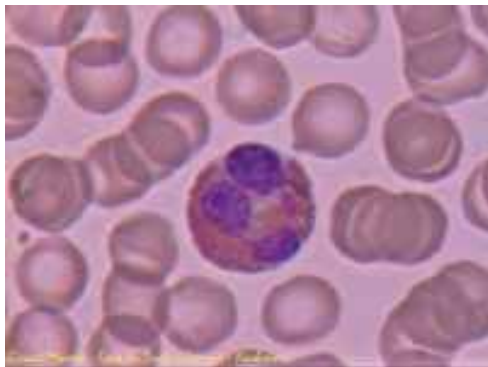


• Eozinofil

- velikost 12 – 14 μm , jádro ze dvou segmentů (brýlovité)
- granula větší než u neutrofilů, barví se cihlově červeně.
- hodně specifických granul (až 200), obsahují hlavní bazický protein (hodně argininu)
- typicky se vyskytující v tkáních, v oběhu málo
- schopny fagocytózy, význam v boji s endoparazity zejména mnohobuněčnými helminty

Receptory:

Pro IgG a IgE označovaný $\text{Fc}\epsilon\text{R}$, který existuje ve dvou formách podle afinity k IgE



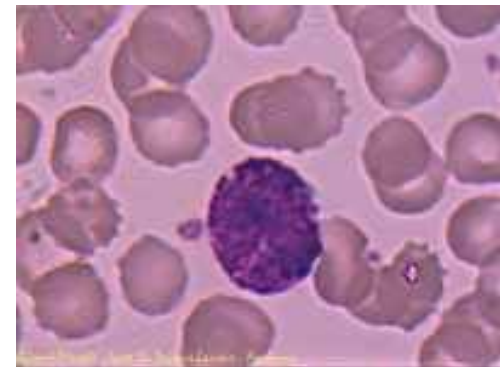
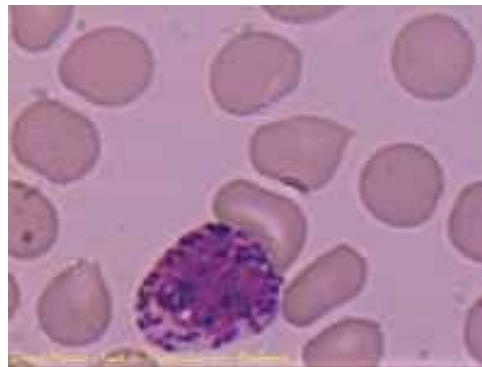
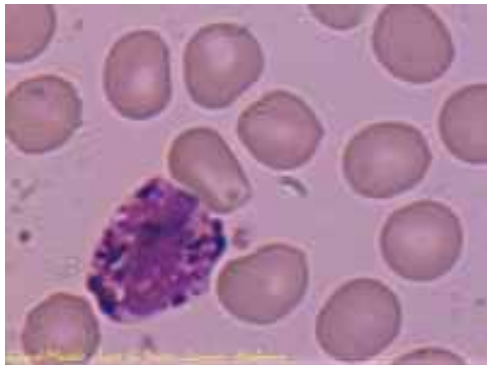
Bazofil

- velikost 9 - 11 μm , jádro protáhlé, často esovité, méně kondenzované
- specifická granula tmavě modrá, překrývají jádro, obsahují heparin a histamin
- v oběhu žijí většinou 1 den
- účastní se alergických reakcí

Receptory:

vysokoafinní $\text{Fc}\epsilon\text{R}$

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.



Agranulocyty

Jádro není segmentované

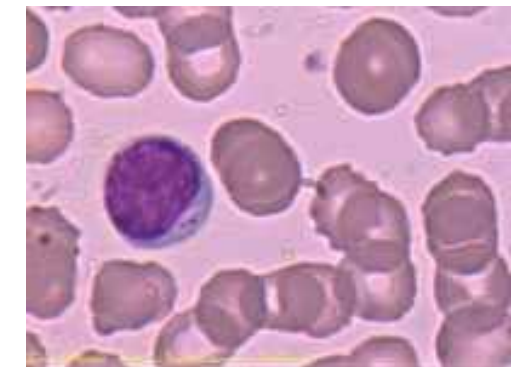
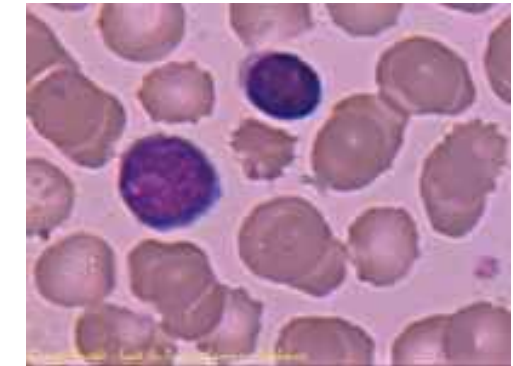
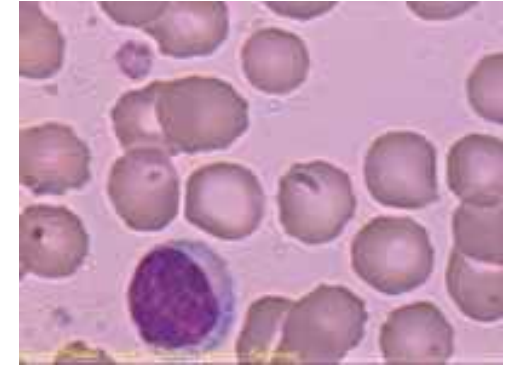
V cytoplasmě nemají granula

Lymfocyt

- velikost 6 – 12 μm podle stupně zralost (malé střední a velké lymfocyty)
- jádro kulaté a hodně tmavé
- granula v cytoplasmě nejsou pouze drobná zrnitost
- v nátěru se T a B lymfocyty jeví stejně, většina 75% v periferní krvi jsou T lymfocyty
- v periferním oběhu převládají malé lymfocyty, které mají průměr 6 – 8 μm
- většina lymfocytů žije několik měsíců. Paměťové buňky jsou schopny přežít po celý život jedince

Receptory:

Specifické receptory pro antigen TcR a BcR

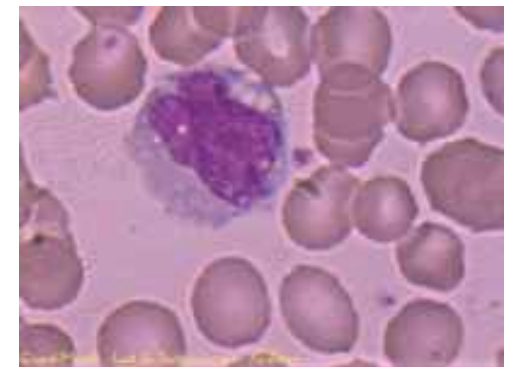
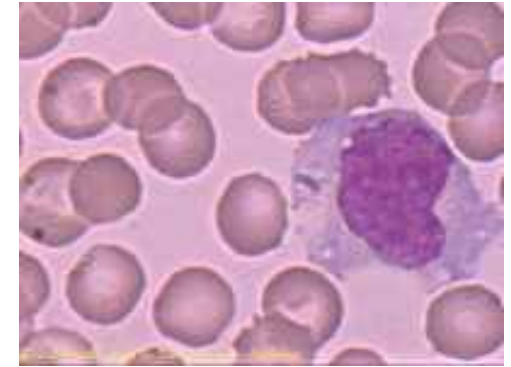
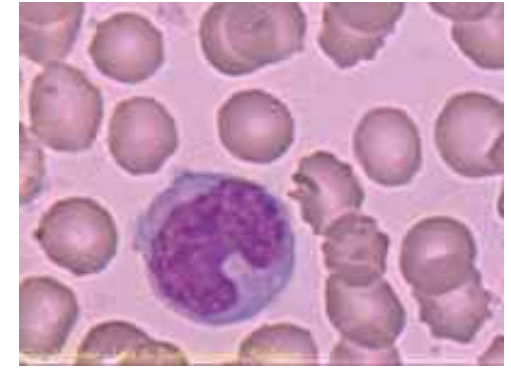


Monocyt

- velikost 14 – 20 μm jádro často ledvinovitého tvaru
- cytoplazma obsahuje jemná azurofilní granula (lyzozomy), specifická granula zde nejsou
- poločas setrvání monocytů v krvi je 12 – 100 hodin, poté zpravidla pronikají do tkání a diferencují se na makrofágy

Receptory:

- pro IgG - Fc γ R
- pro C3b složku komplementu
- komplexy MHC II třídy, nutné pro prezentaci antigenních fragmentů



NK buňky

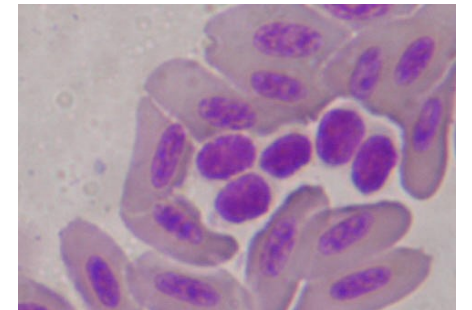
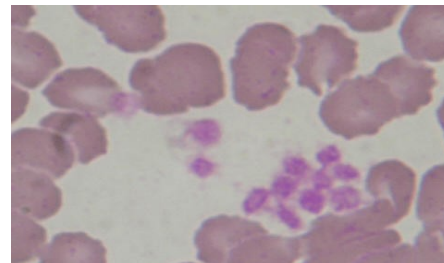
- velké granulární lymfocyty, charakteristické povrchové znaky CD56, CD16
- schopny rychle zabíjet některé nádorové buňky a buňky infikované virem
- aktivity NK komplementární k aktivitám cytotoxických T-lymfocytů

Receptory:

- nemají antigenně specifické receptory,
- inhibiční (rozeznávají MHC I) a aktivační receptory (např. FcR - CD 16, rozeznává opsonizované částice)
- aktivačně působí nízká exprese MHC I)

Trombocyty

- u savců jsou bezjaderné, jsou to vlastně odškrcené okrsky cytoplasmu megakaryocytů
- velikost asi 3 μm a často v roztěrech vytvářejí shluky
- trombocyty ostatních tříd obratlovců jsou jaderné



Použité zdroje:

- Atlas Hematologie zvířat:
http://projekty.sosvet.cz/2006_hematologie/index.htm
- Tichý F. a kol.: Histologie, VFU, 2004
- Toman a kol.: Veterinární imunologie, Grada, 2000
- Krejsek J., Kopecký O.: Klinická imunologie, Nukleus HK, 2004