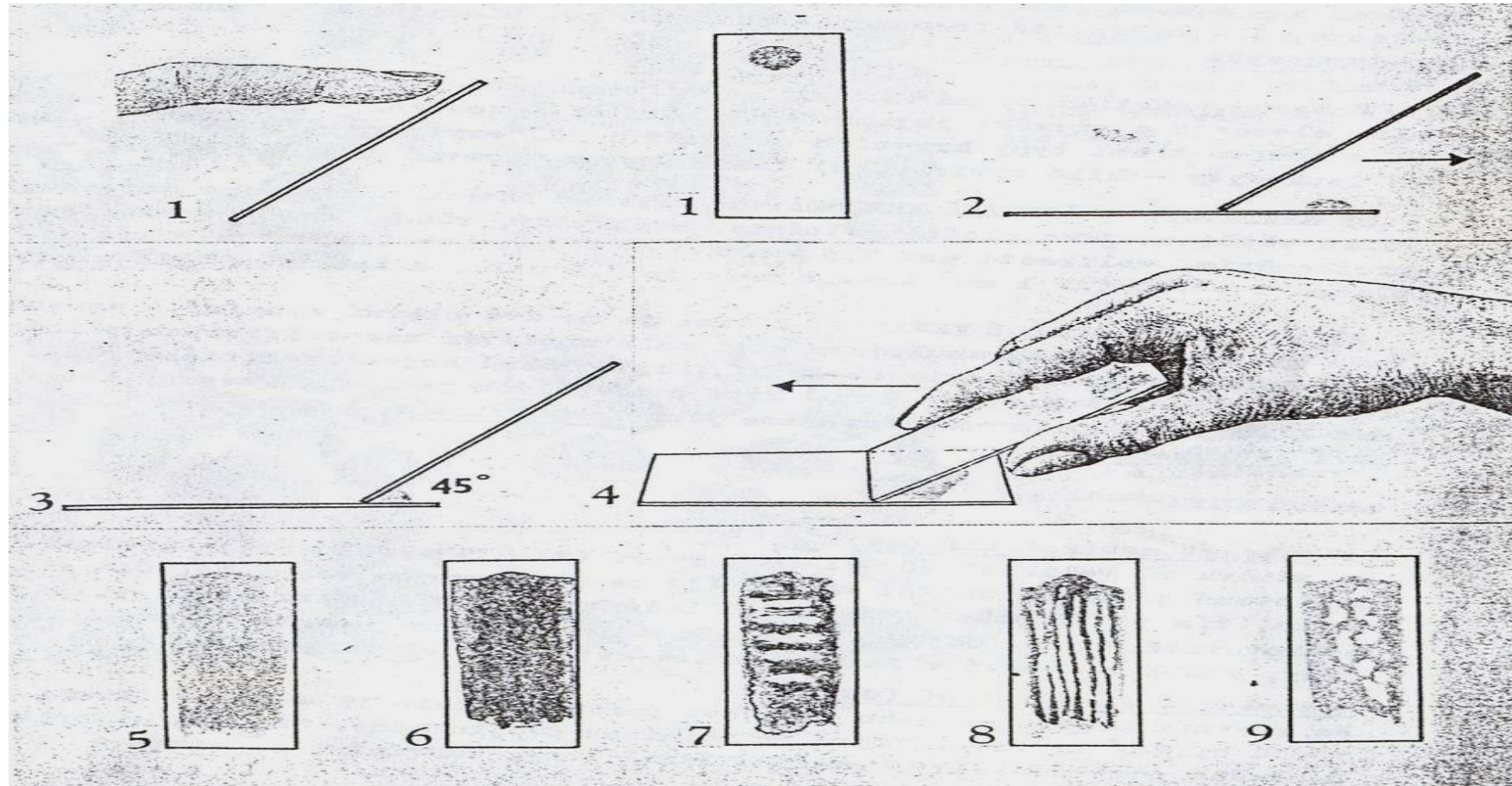


# **Imunologie cvičení**

## **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 :

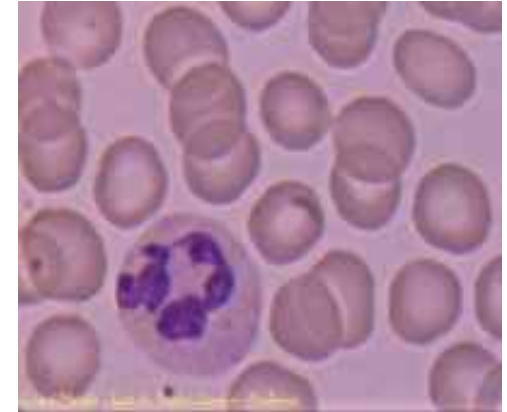
### Nátěr musí být suchý

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	$5 \times 10^{12}$	$8 \times 10^{12}$	$3 \times 10^{12}$	$1 \times 10^{12}$	$2 \times 10^{12}$
Leukocyty	$5-8 \times 10^9$	$6-15 \times 10^9$	$20 \times 10^9$	$7 \times 10^9$	$70 \times 10^9$

Relativní počty [v %]					
<b>Granulocyty</b>					
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
<b>Agranulocyty</b>					
Monocyty	3 – 8	0 – 3	0 – 5	0 – 15	3
Lymfocyty	18 – 40	60 – 95	20 – 65	20 – 48	92

# Granulocyty

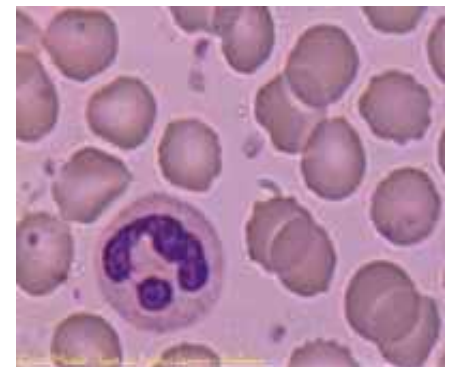
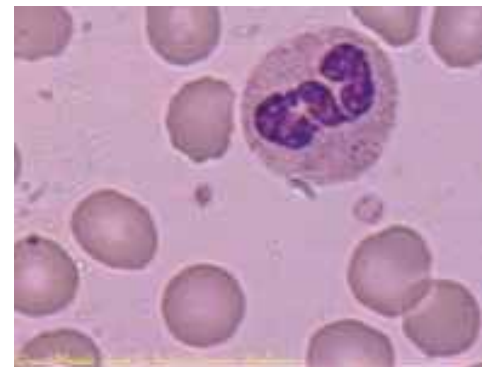
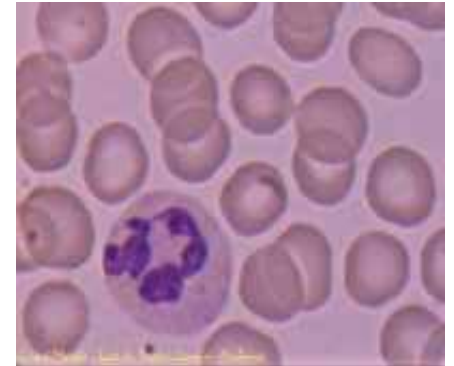
- **Jádro segmentované**
- **V cytoplasmě mají granula:**
  - specifická granula, barví se podle typu kyselými nebo bazickými komponentami barviv dle Pappenheima
  - azurofilní granula jsou považována za lyzozomy a barví se purpurově

## Neutrofil

- velikost 10 – 12  $\mu\text{m}$ , 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 $\gamma$ R)
- C3b složku komplementu, složky komplementu C5a a C3a
- TLR
- hematopoetické stimulační faktory GM-CSF nebo G-CSF

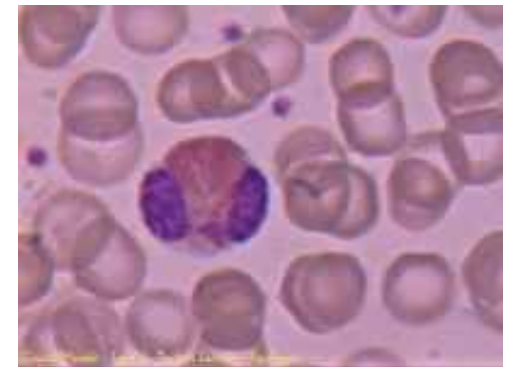
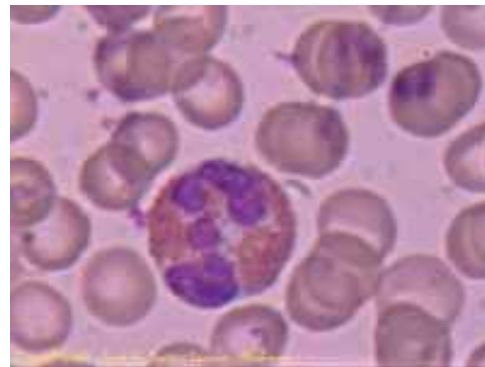
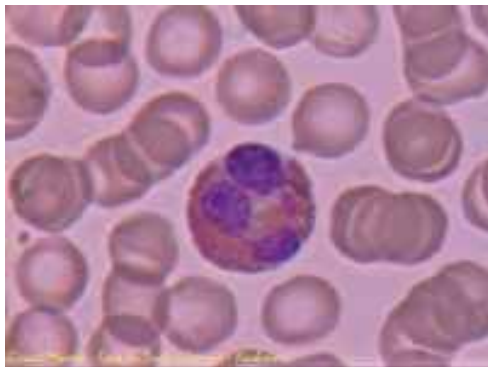


## • Eozinofil

- velikost 12 – 14  $\mu\text{m}$ , 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





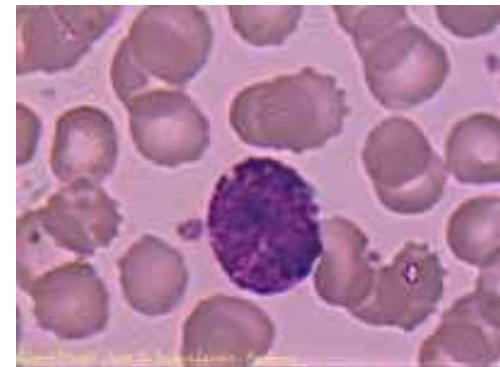
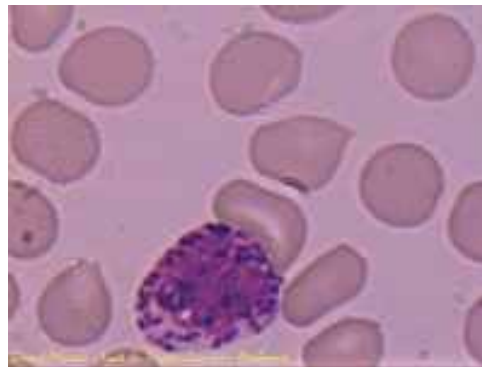
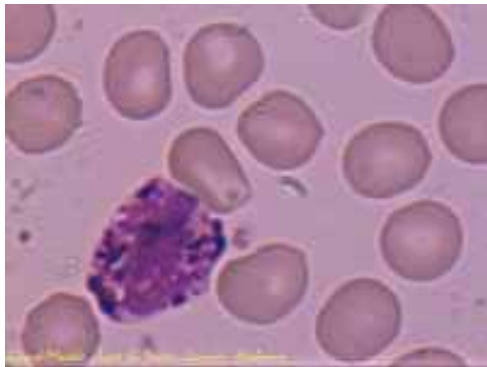
## Bazofil

- velikost 9 - 11  $\mu\text{m}$ , 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

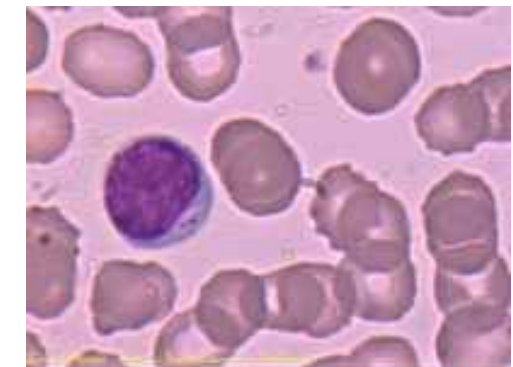
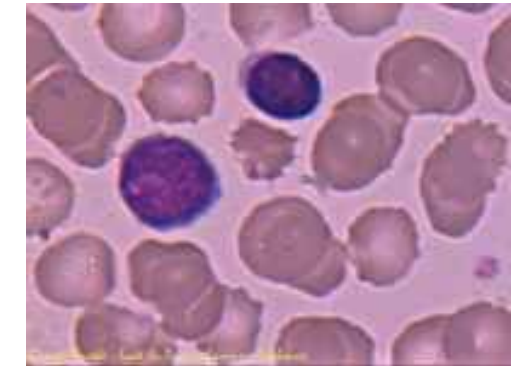
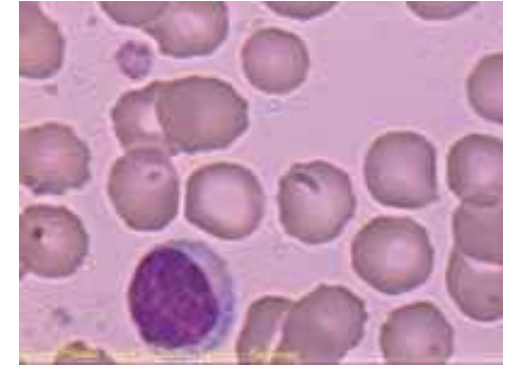
V cytoplasmě nemají granula

## Lymfocyt

- velikost 6 – 12  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$
- většina lymfocytů žije několik měsíců. Paměťové buňky jsou schopny přežít po celý život jedince

## Receptory:

Specifické receptory pro antigen TcR a BcR

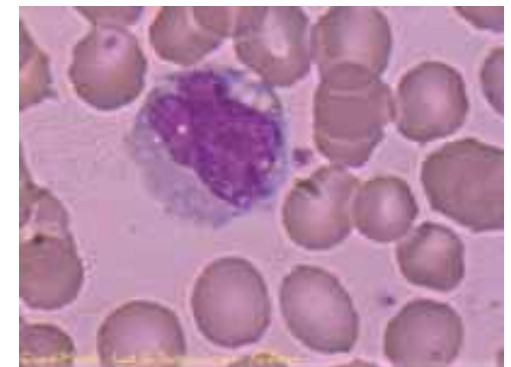
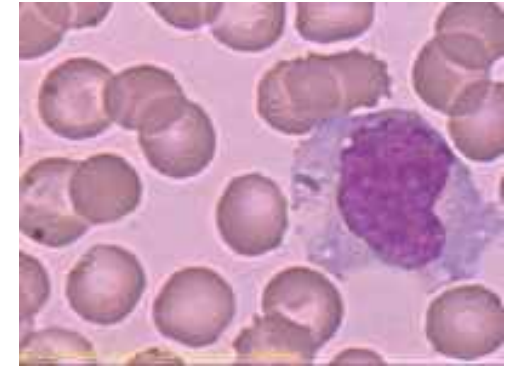
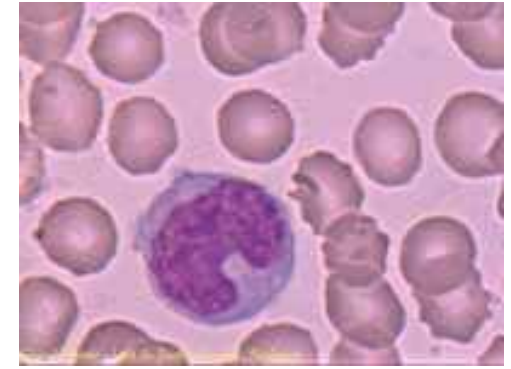


## Monocyt

- velikost 14 – 20  $\mu\text{m}$  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 $\gamma$ R
- pro C3b složku komplementu
- komplexy MHC II třídy, nutné pro prezentaci antigenních fragmentů



## NK buňky

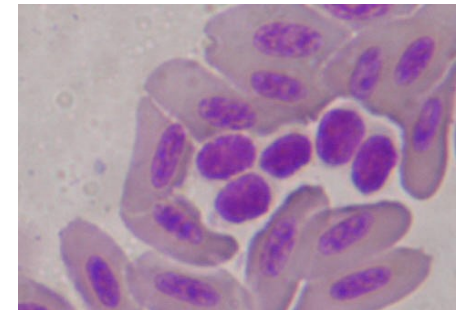
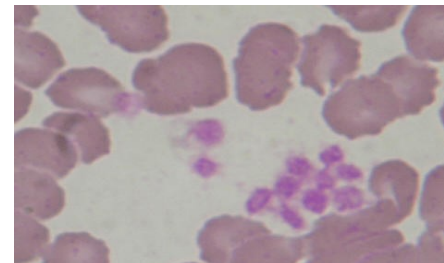
- velké granulární lymfocyty, charakteristické povrchové znaky CD56, CD16
- schopny rychle zabíjet některé nádorové buňky a buňky infikované virem
- aktivity NK komplementární k aktivitám cytotoxických T-lymfocytů

### 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  $\mu\text{m}$  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](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