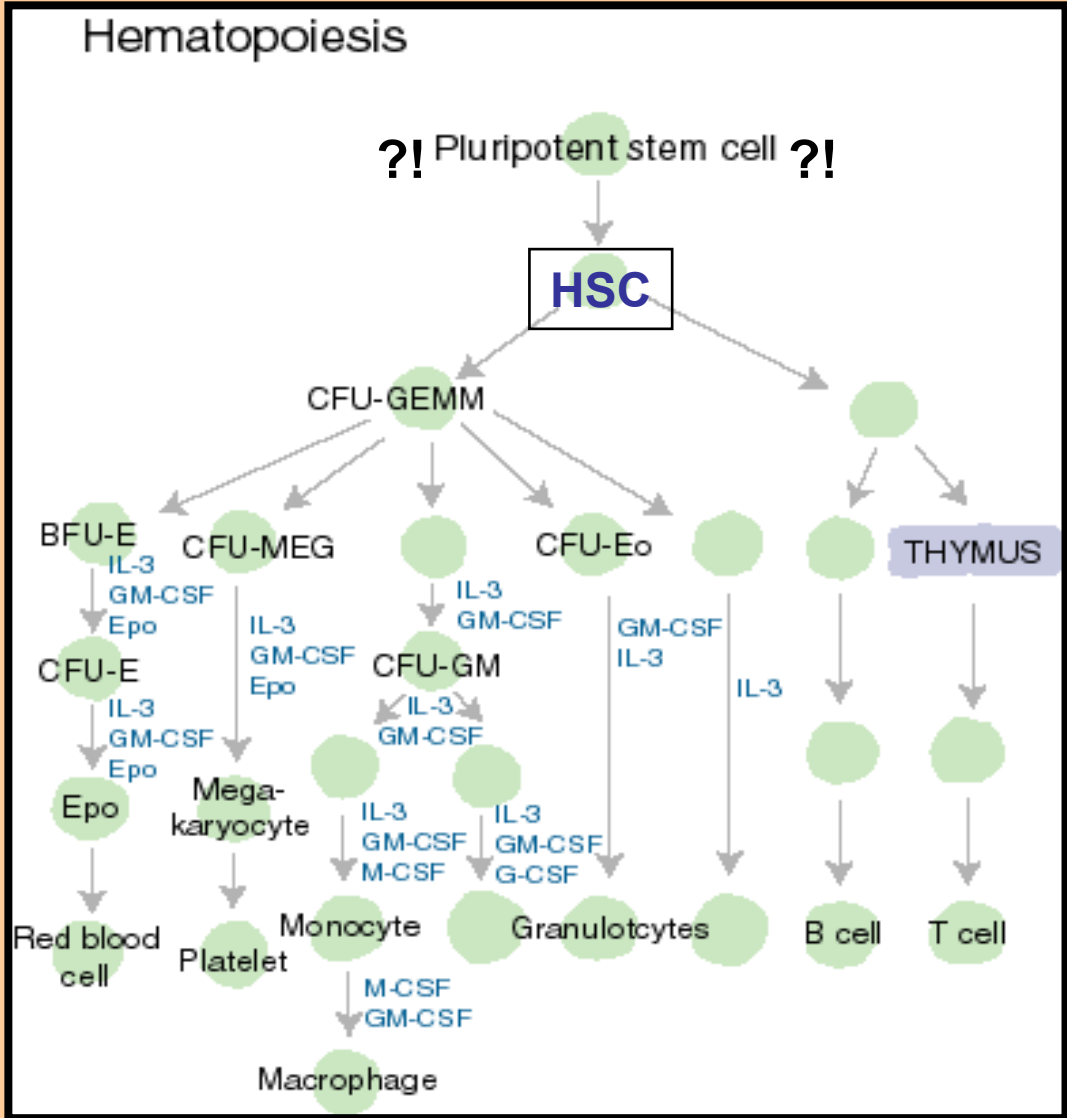


Hematopoetické kmenové buňky – HSCs (hematopoietic stem cells)

Hematopoéza + ?



Kostní dřeň - <0.01% buněk
~ 98 % v G₀ fázi buněčného cyklu
(LT-HSC)

Jsou závislé na osteoblastech !?!

~ 1- 3% proliferujících
(ST-HSC)

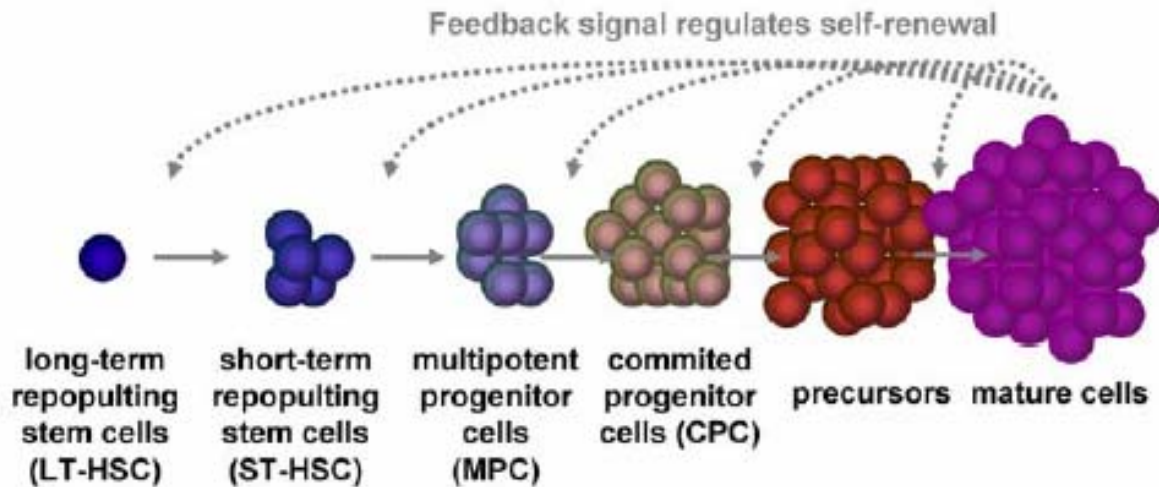
Jsou závislé na endoteliích

HEMATOPOÉZA

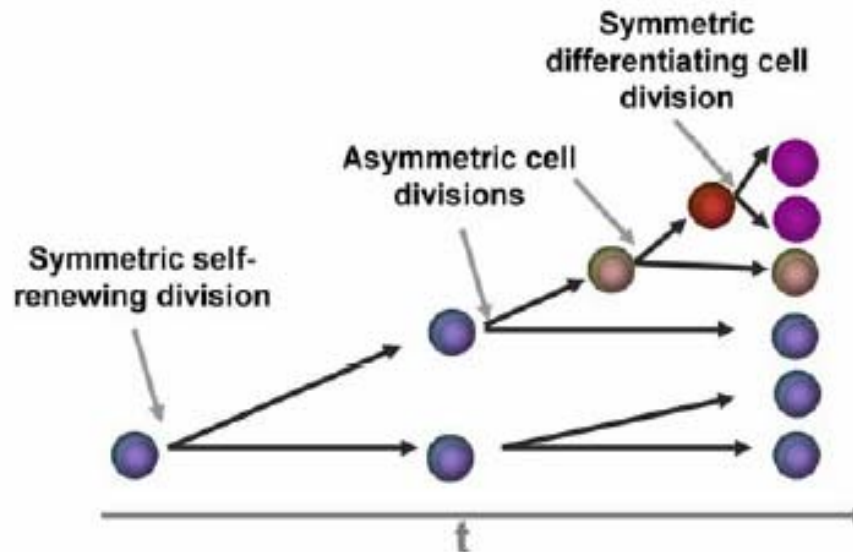
- Hematopoéza je v současné době zřejmě nejlépe prostudovaná diferenciační dráha s nejdokonalejším fenotypovým rozlišením jednotlivých buněčných stádií buněk tzv. CD (cluster determinants) antigeny.
- Jednotlivé diferenciační dráhy jsou často majoritně závislé na jediném cytokinu (kolonie stimulujícím faktoru – CSF; např. G-CSF, faktor stimulující tvorbu zejména granulocytů)
- V průběhu ontogeneze je hematopoéza realizována jedinečným způsobem (časoprostorově, viz. níže), což dobře umožňuje i studium rozdílů mezi embryonálními a adultními somatickými kmenovými buňkami. Každopádně v průběhu embryonálního vývoje vznikají jisté typy populací T-lymfocytů, které zůstávají po celý život jedince, ale v dospělosti již nevznikají. Druhou možností, vedle možnosti odlišnosti embryonálních a adultních HSCs je schopnost těchto buněk osidlovat odlišné „niche“.
- HSC vzniklé ve žloutkovém váčku také migrují do oblasti AGM a do jater, kde dávají vznik adultním HSC (Samokhvalov, 2007)
- rozlišujeme: **LT-HSC** (long-term HSC) – schopné opakovaně kompletní obnovy hematopoézy
(vyžadují osteoblasty)
: **ST-HSC** (short-term HSC) – schopné jen krátkodobé obnovy hematopoézy
(vyžadují endotelie – vaskulární niche)
(**aktuální X potencionální** (proliferující) **kmenová buňka**)
- Harrison et al. (1979): transplantoval myším opakovaně identický štěp HSC déle jak 8 let
- > výrazné překročení délky života myši!!!

Dělení hematopoietických buněk

A

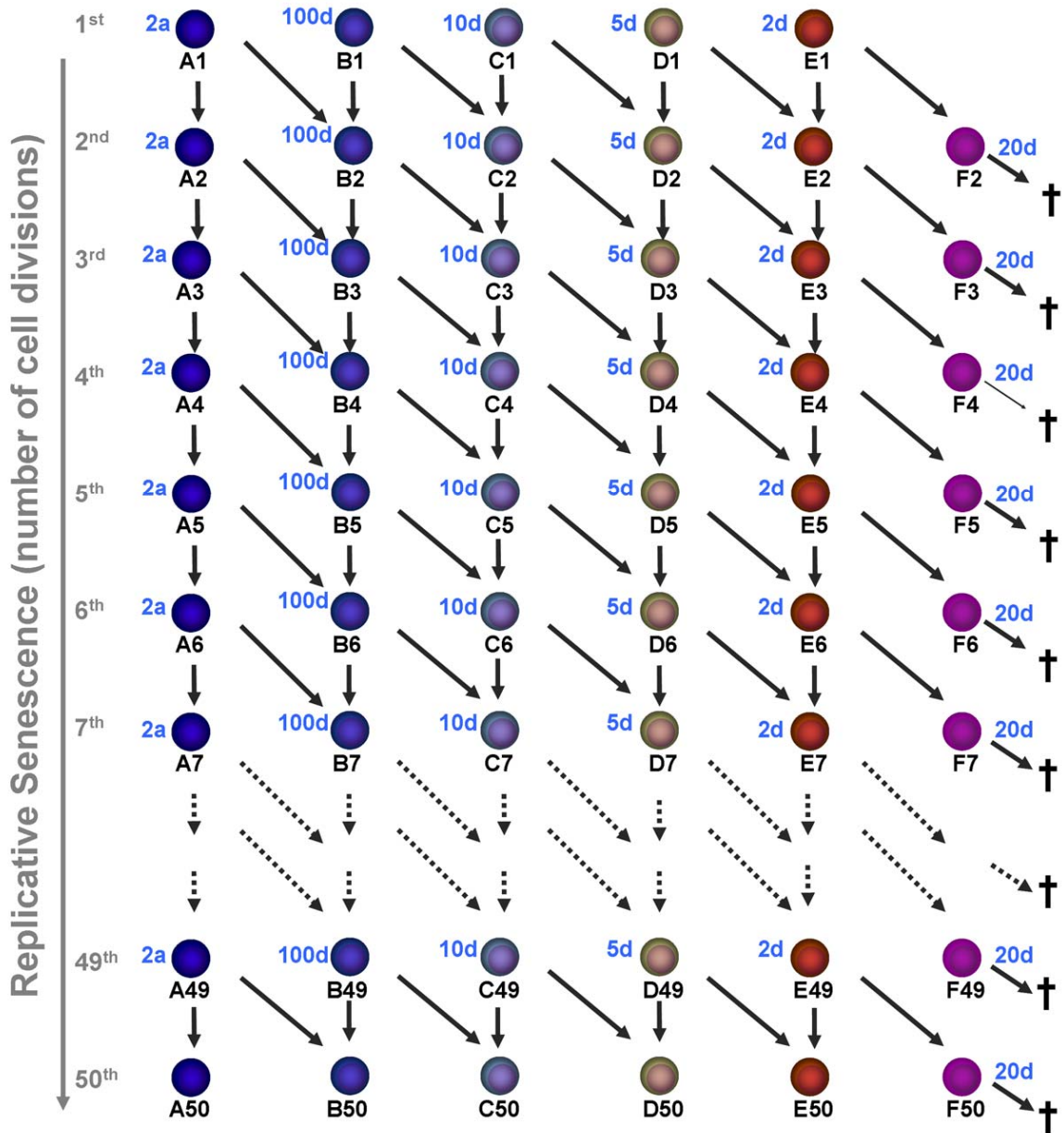


B



Differentiation

LT-HSC ST-HSC MPC CPC precursors mature cells



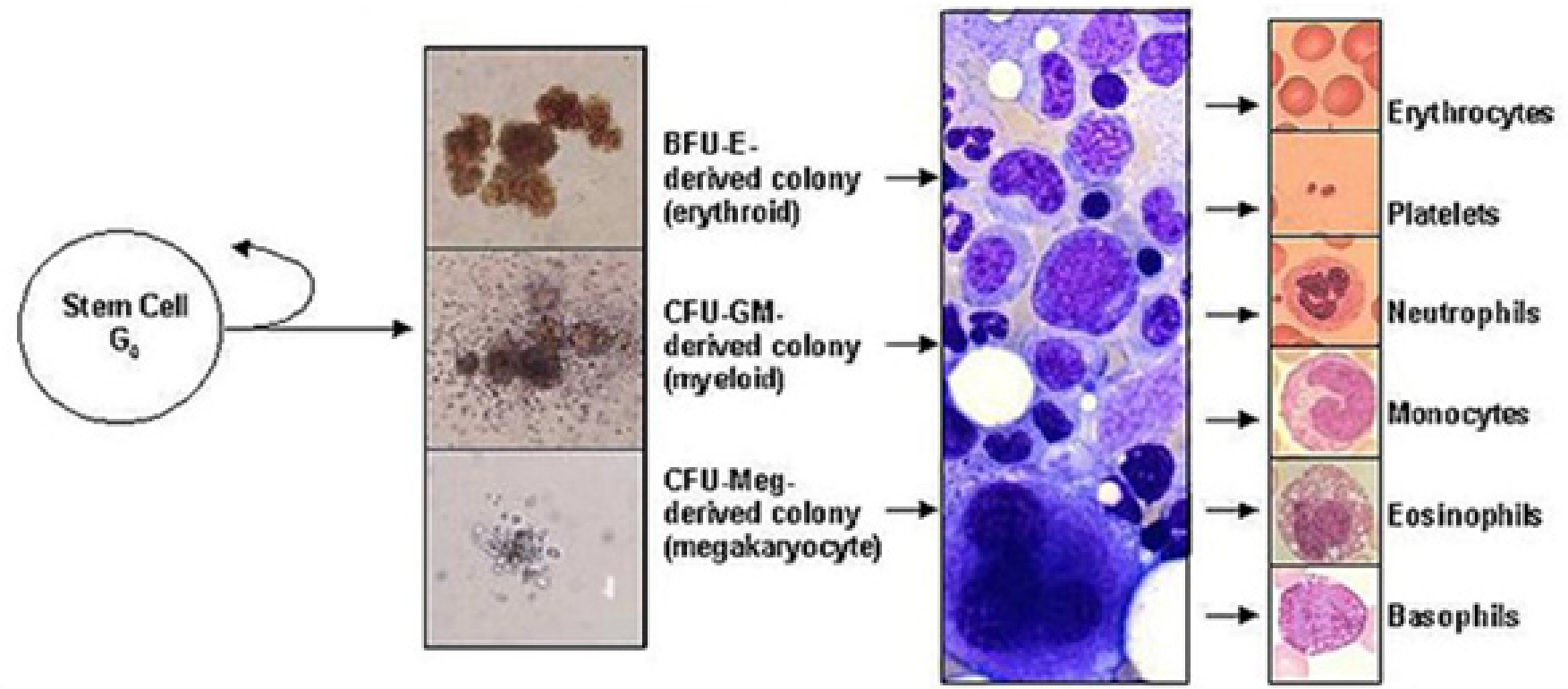
S diferenciací u hematopoésy stoupá frekvence buněčného dělení

*pomalou se dělicí buňky
velký jádro-plasmový poměr*

*rychle se dělicí buňky
velký jádro-plasmový poměr
tvorba specifických kolonií*

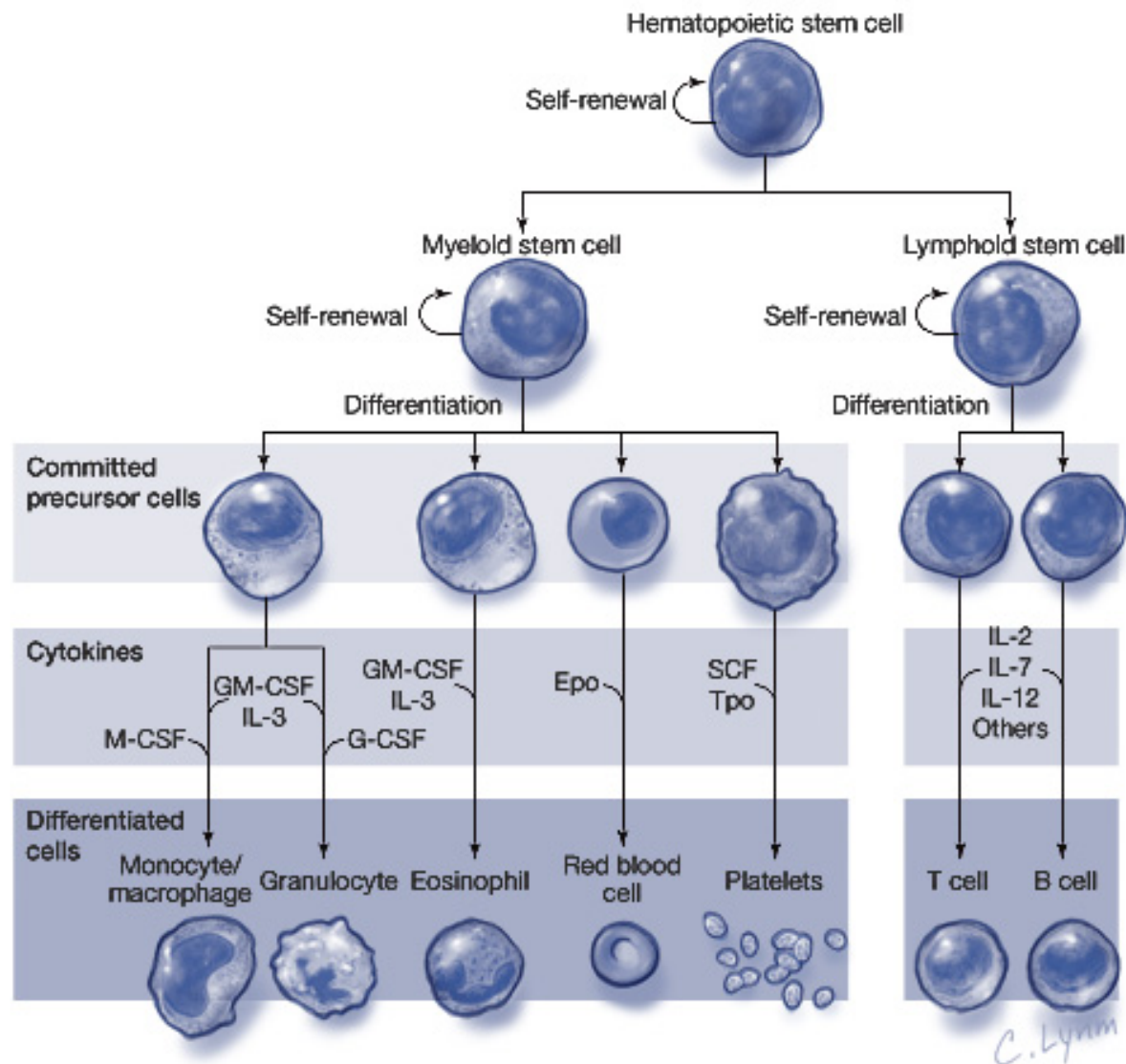
*ukončení proliferace
stále velký jádro plasmový poměr
velké rozdíly ve velikosti*

*nedělicí se
terminálně diferencované buňky
cytoplasma převažuje nad jádrem*



Stem cell	Progenitor cells	Precursor cells	Mature cells
------------------	-------------------------	------------------------	---------------------

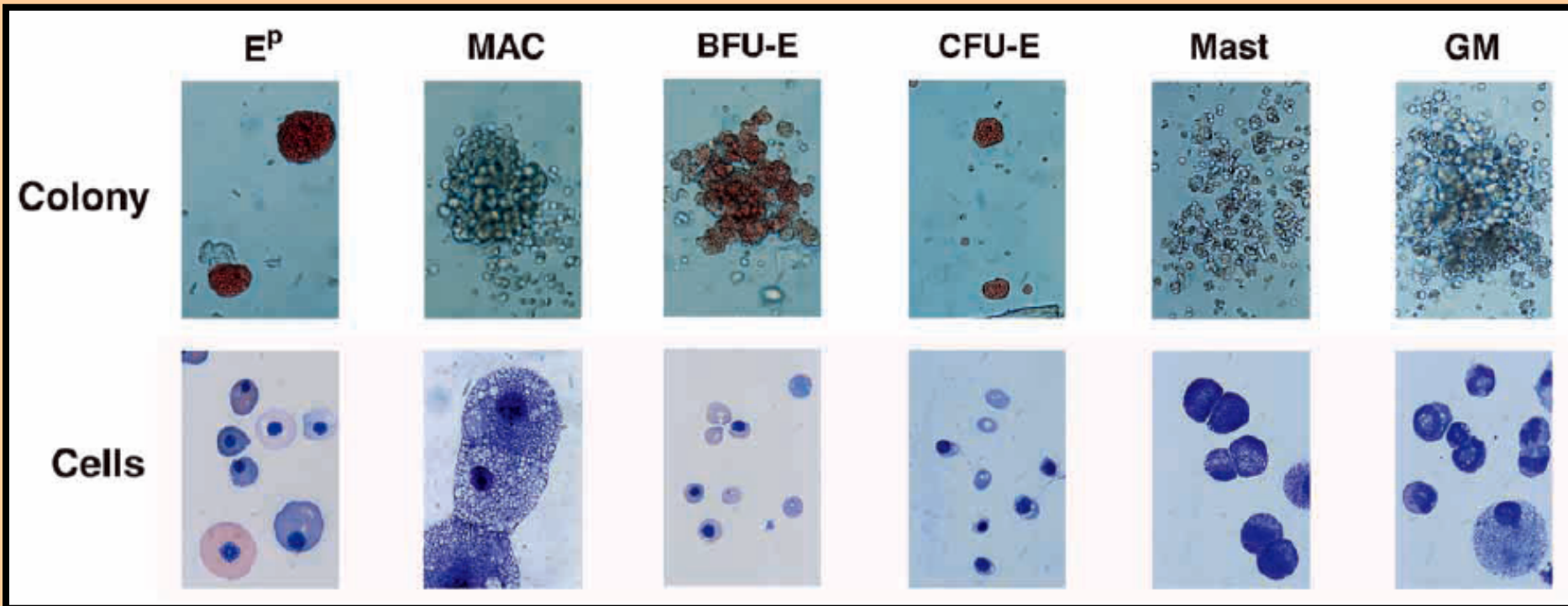
Hematopoietic Stem Cell Differentiation



IL=interleukin
 GM-CSF=granulocyte/macrophage colony-stimulating factor
 G-CSF=granulocyte colony-stimulating factor
 M-CSF=monocyte colony-stimulating factor
 Epo=erythropoietin
 SCF=stem cell factor
 Tpo=thrombopoietin

Příklad kolonií hematopoézy v *in vitro* experimentu

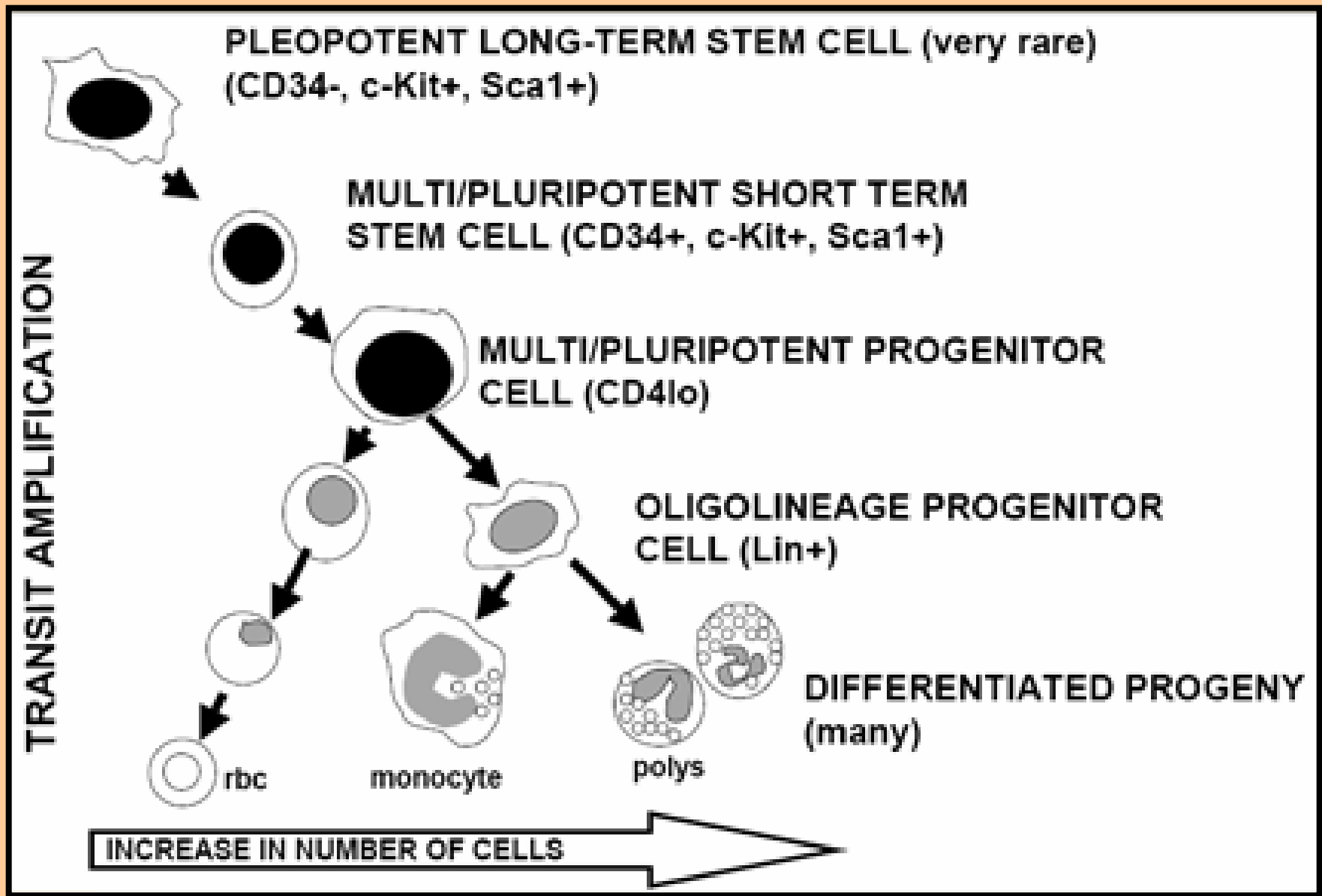
Palis 1999



Ep – primitivní erythropoéza, MAC – primitivní makrofágy,
BFU-E – (Burst-forming unit erytroidní) z fetálních jater,
GM – granulocytární-makrofágová kolonie

Fenotyp HSC

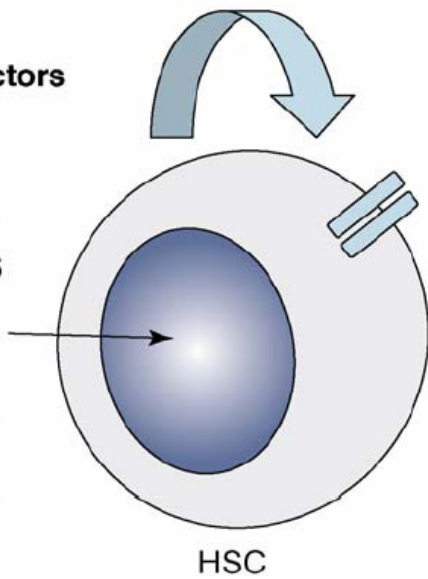
<i>antigen</i>	HSC	Myeloid SC	Lymphoid SC
CD10 (CALLA)	-	-	+
CD33 (Sialoadhesin)	-	+	-
CD34 (L-selectinR)	-	+	+
CD38 (ecto-ADP-ribosyl cyclase)	-	-	+
CD90 (Thy1)	+	-	+
CD110 (Trombopoietin receptor)	+	+	-
CD111 (Nectin1)	-	+	-
CD112 (Nectin2)	-	+	-
CD117 (c-Kit, SCFR)	+	+	+
CD123 (α řetězec IL-3R)	+	+	-
CD124 (IL-4R/IL-13R)	-	-	+
CD127 (α řetězec IL-7R)	-	-	+
CDw131 (β řetězec IL-3R/IL-5/GM-CSF)	-	+	-
CD133 (Ac133)	-	+	-
CD135 (Flt3/Flk2)	+	-	-
CD173 (krevní skupina H typ 2)	-	+	-
CD174 (Lewis Y)	-	+	-
CD176 (Thomson-Friedenreich antigen)	-	+	-
CD227 (MUC-1)	-	+	-
CD228 (Melanotransferrin)	-	+	+
<u>CD243 (MDR-1)</u>	+	-	-



Self-renewal

Intrinsic factors

Bmi1
Gfi-1
PTEN
STAT5
Tel/Etv6
p21
p18
MCL-1
Mel-18
Rae28
HoxB4

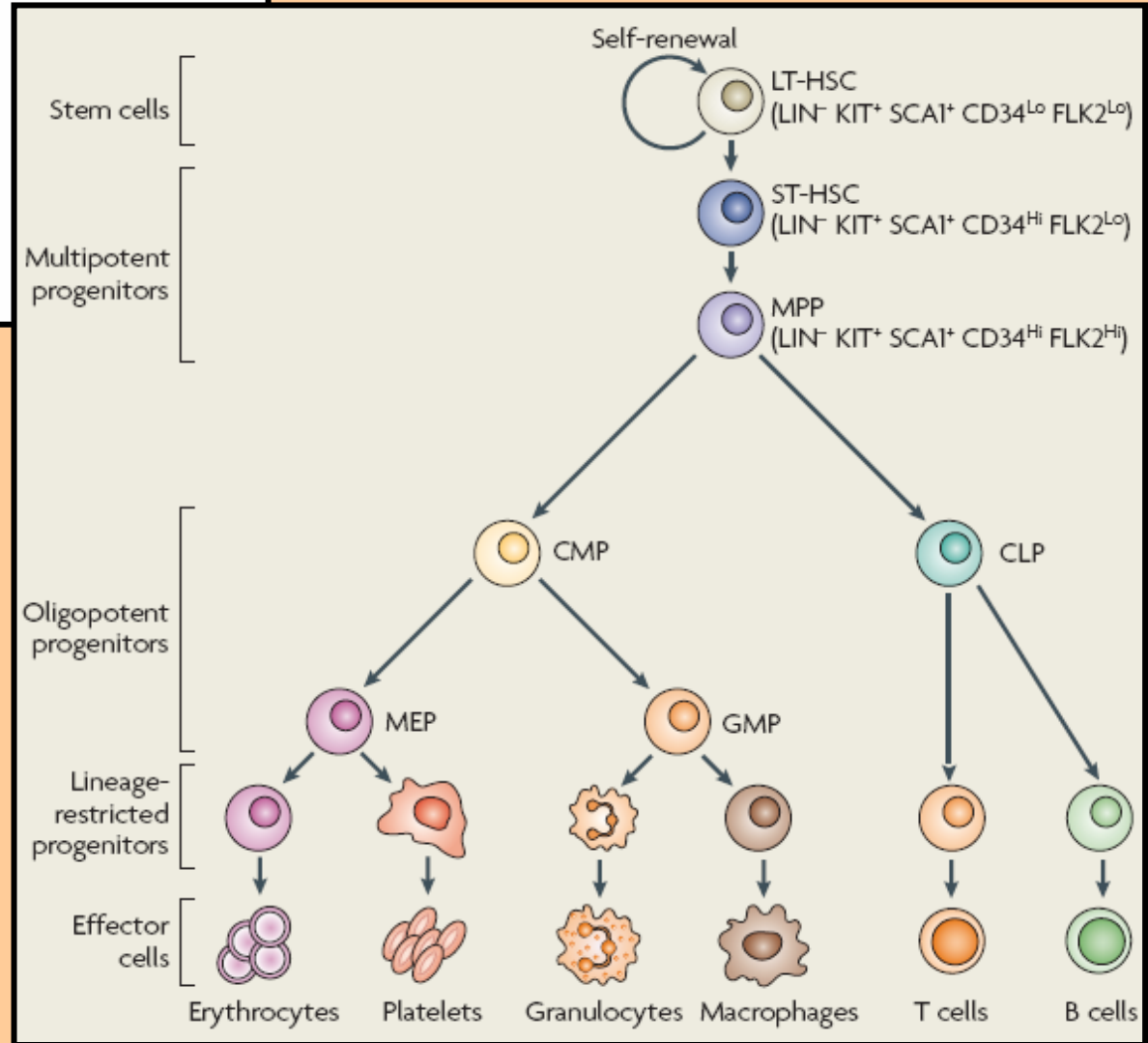


Extrinsic factors

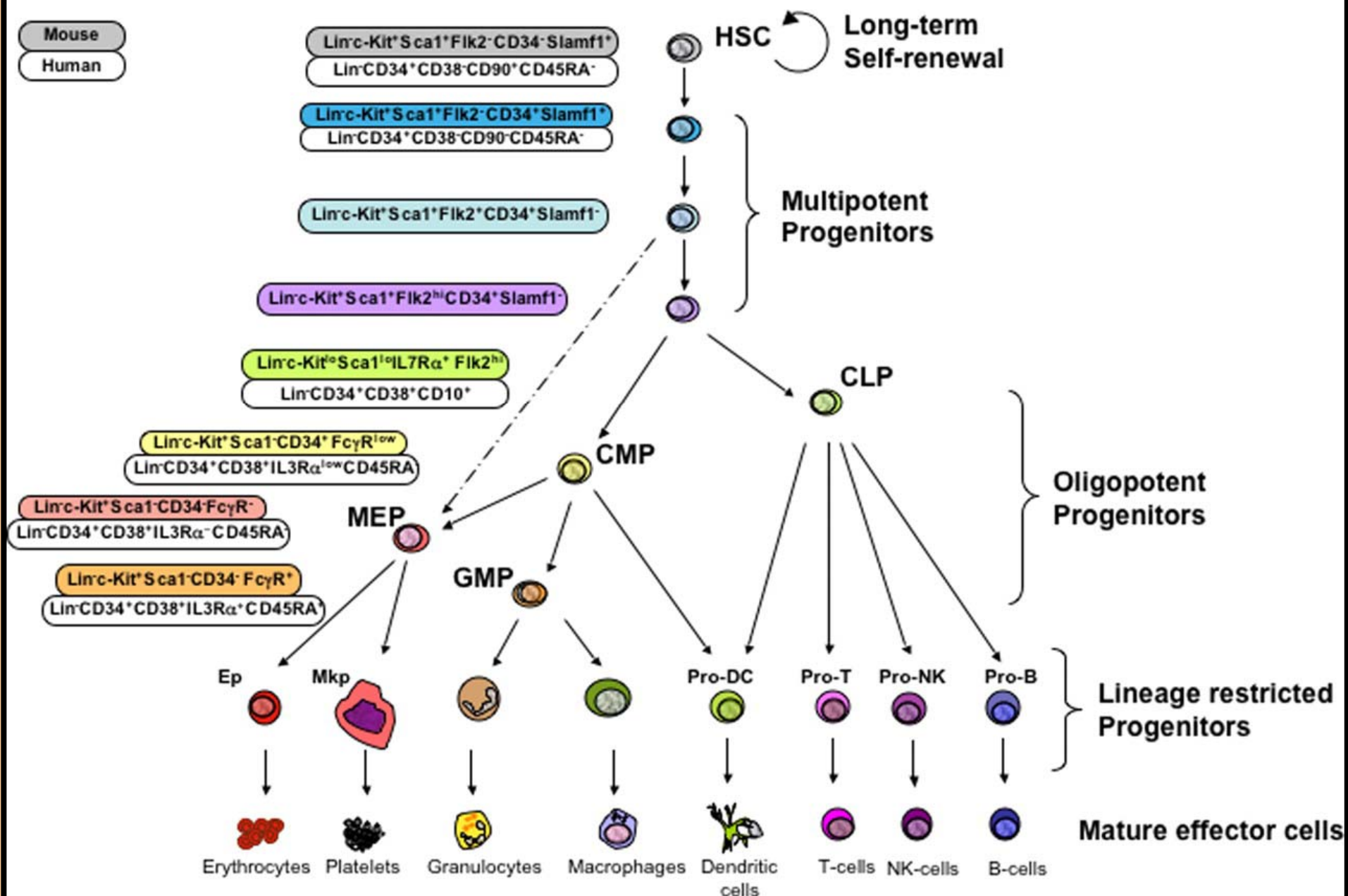
Notch
Wnt
Shh
Tie2/Ang-1

Extrinsic a intrinsic faktory regulující sebeobnovu adultních HSC (Akala & Clarke 2006) významnou úlohu hraje hypoxie a HIF! HSC mají vysokou hladinu HIF nezávisle na hypoxii! - úloha cytokinů SCF, IL-x?

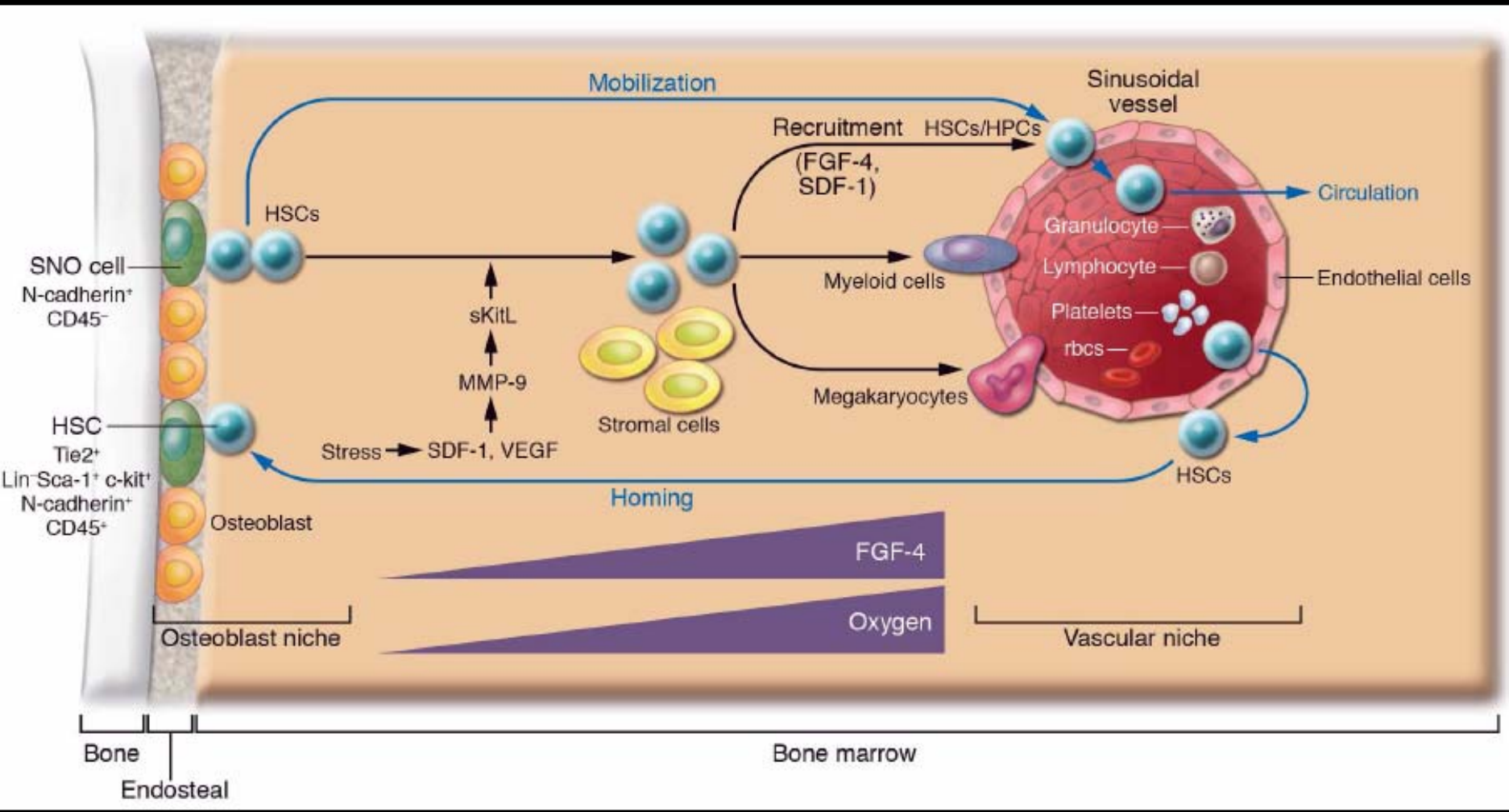
Schema hematopoézy a fenotyp aktuálních a potencionálních HSC



Hematopoietic Hierarchy

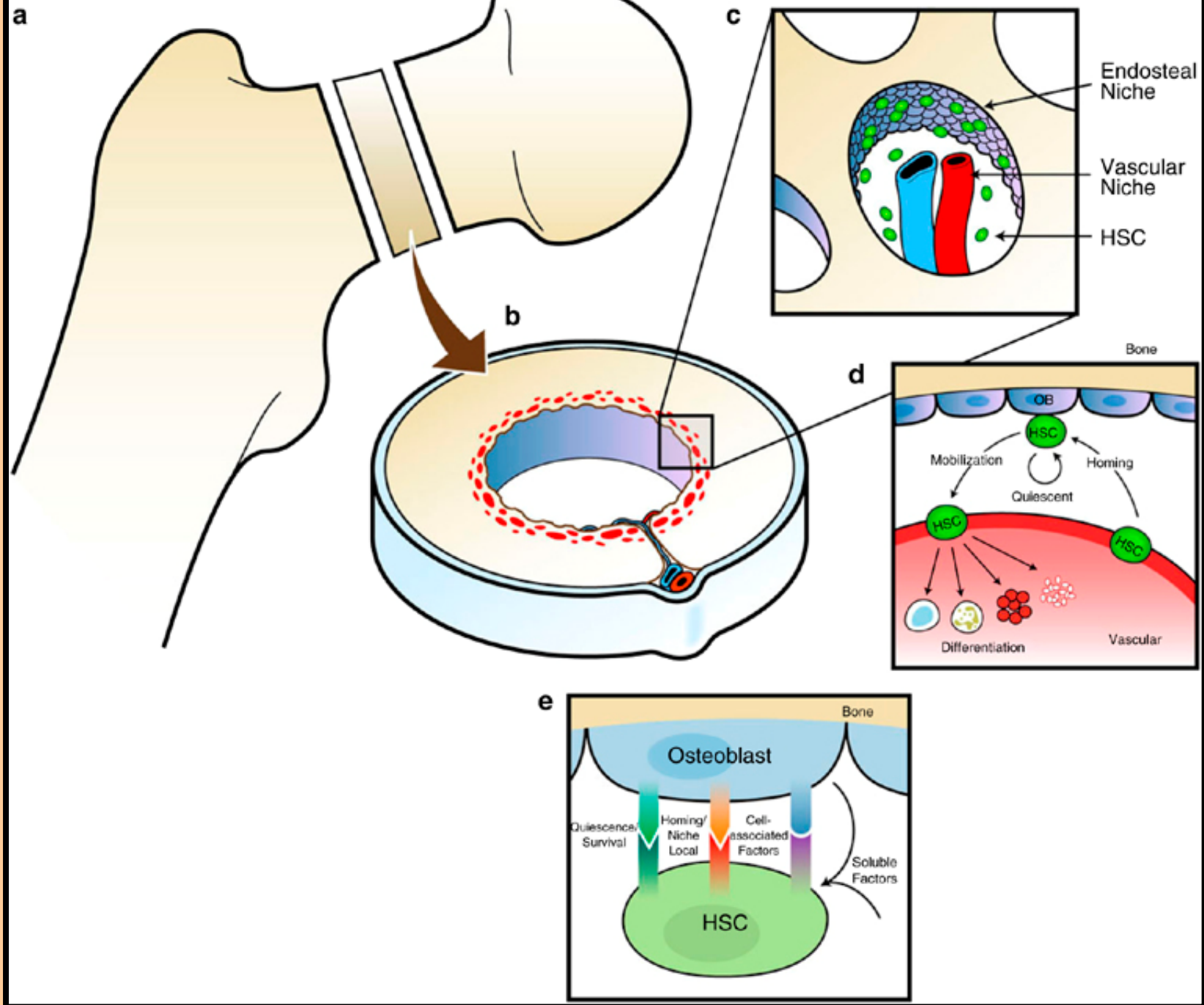


HSC niche



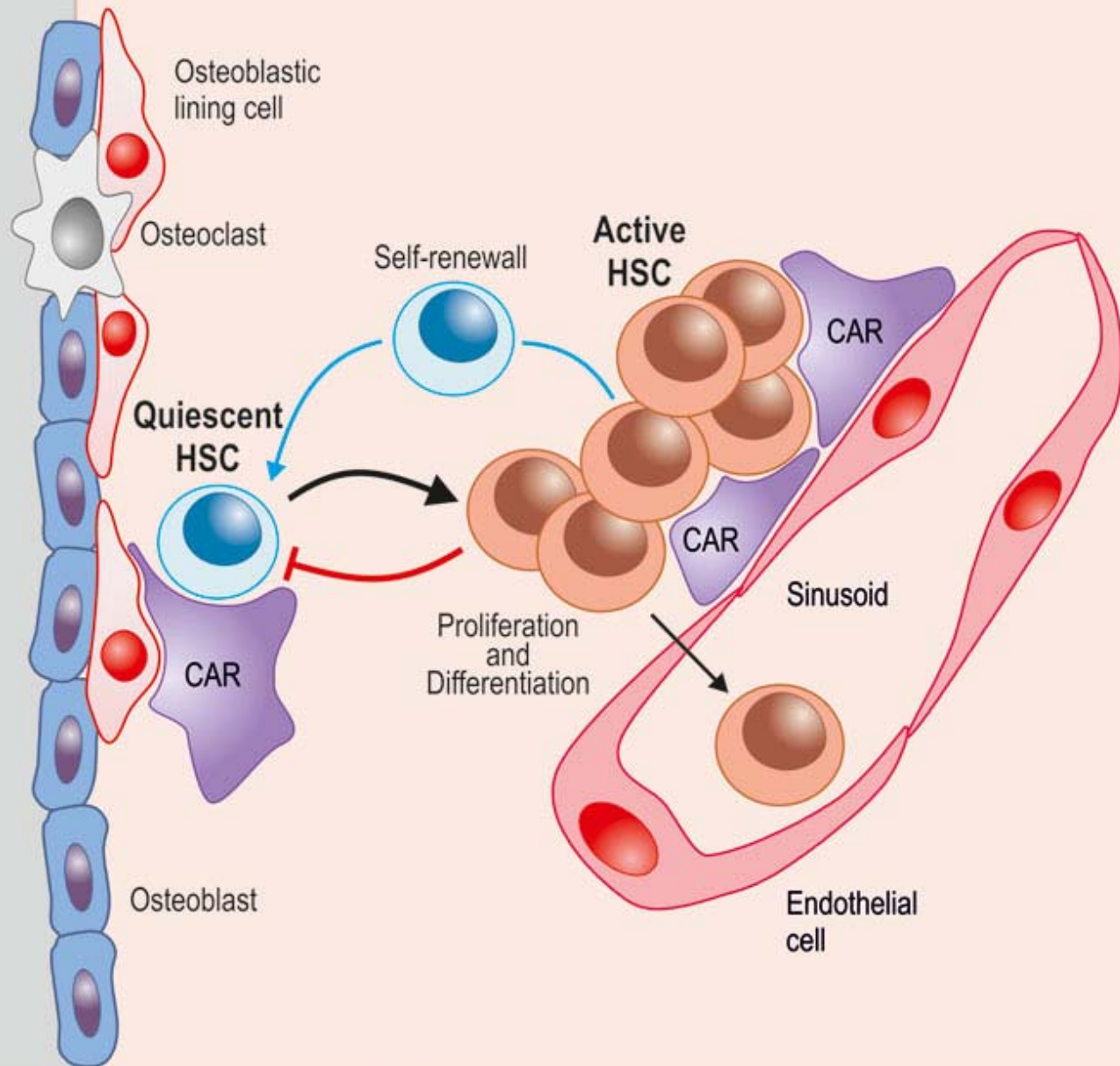
Mobilizace HSC (přechod HSC do periferní krve) – působením G-CSF, SCF, IL-3, TPO

G-CSF – granulocyte colony-stimulating factor, SCF – stem/steel cell factor, IL-3 – interleukin 3, TPO - trombopoetin



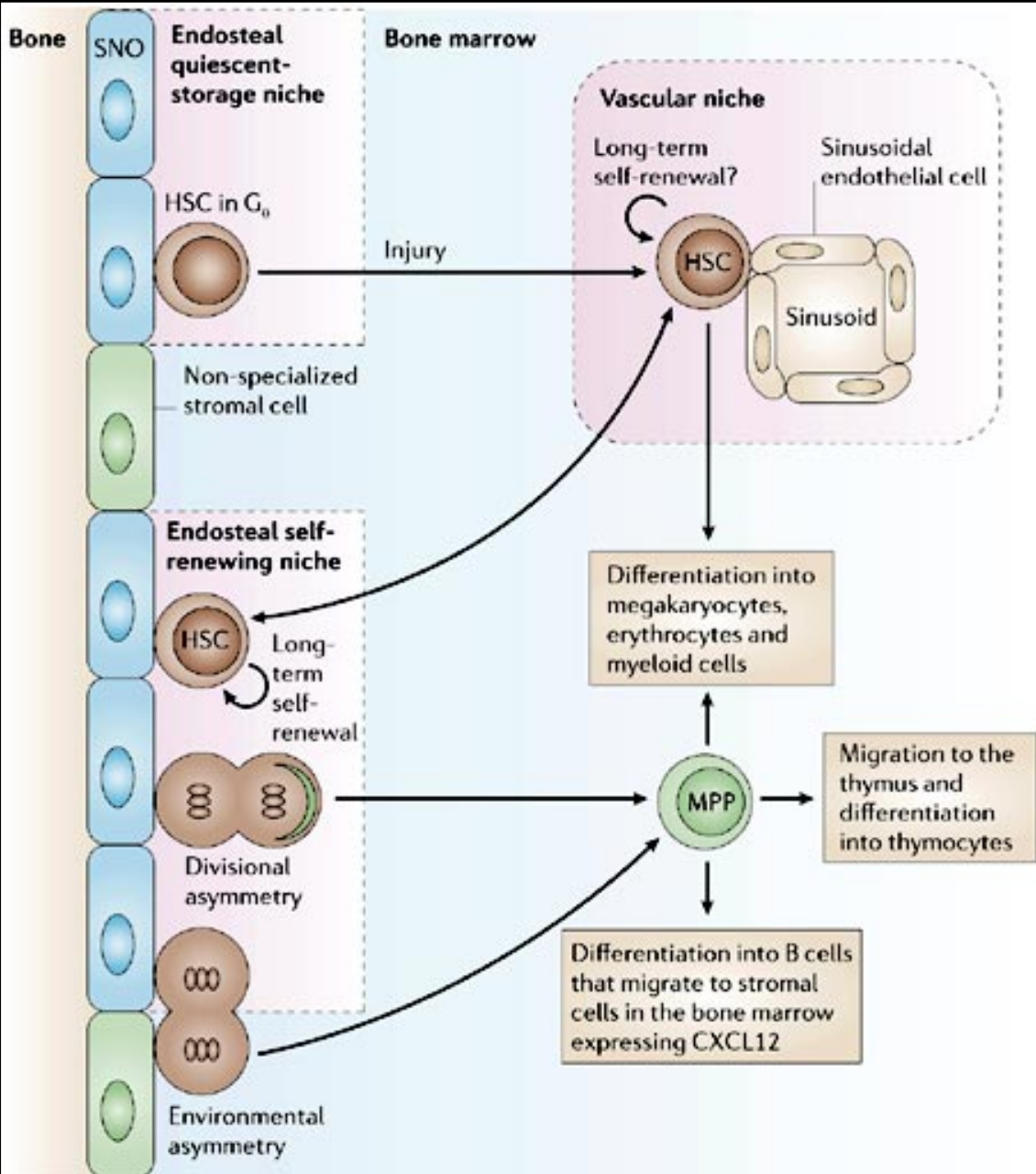
Osteoblastic Niche

Vascular Niche



Endosteum Zone

Central Marrow Zone



Změna niche

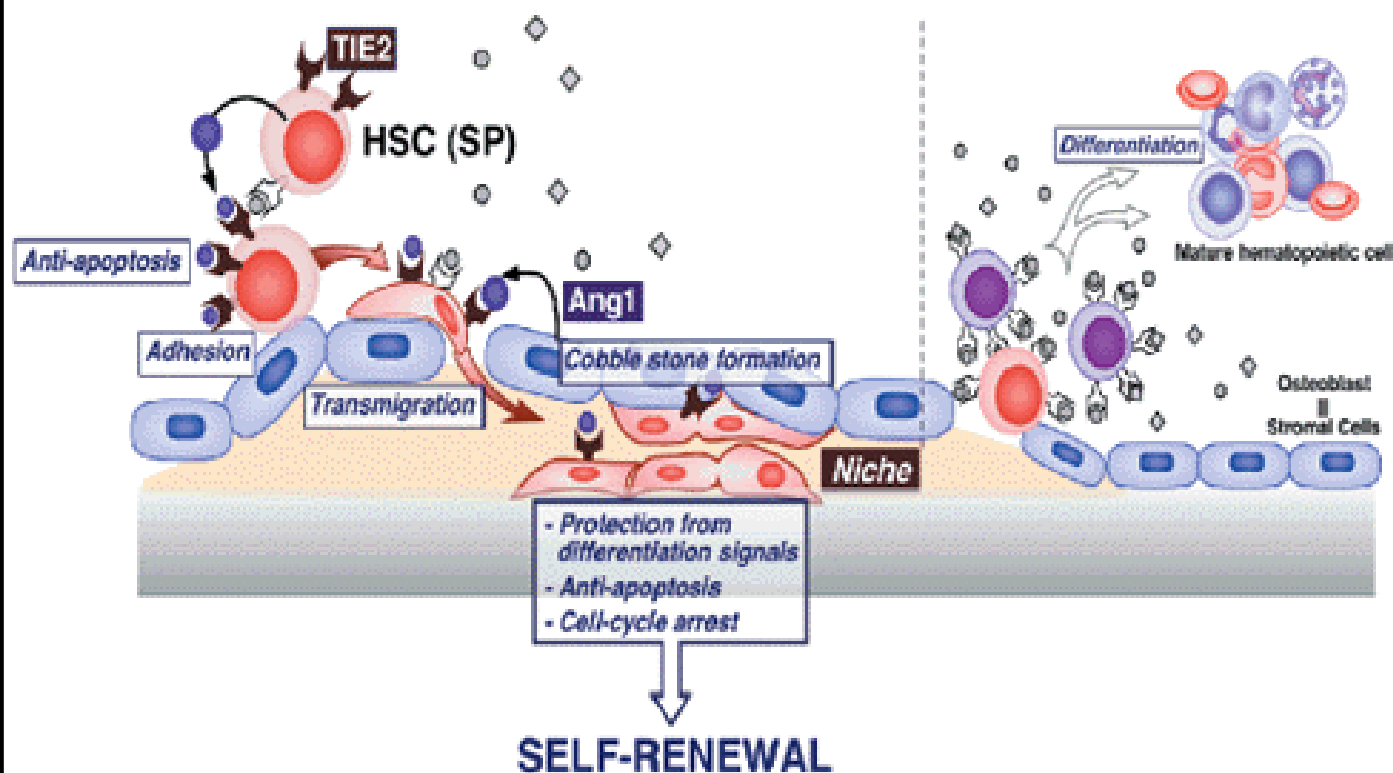
- ztráta kmenovosti = diferenciacce
- změna statusu
 - quiescence x proliferace

Model významu angiopoetinu v regulaci sebeobnovy HSC

Ang - angiopoetin

Tie2 – receptor angiopoetinu

Ang1/Tie2 Maintains the "Stemness" (Model)

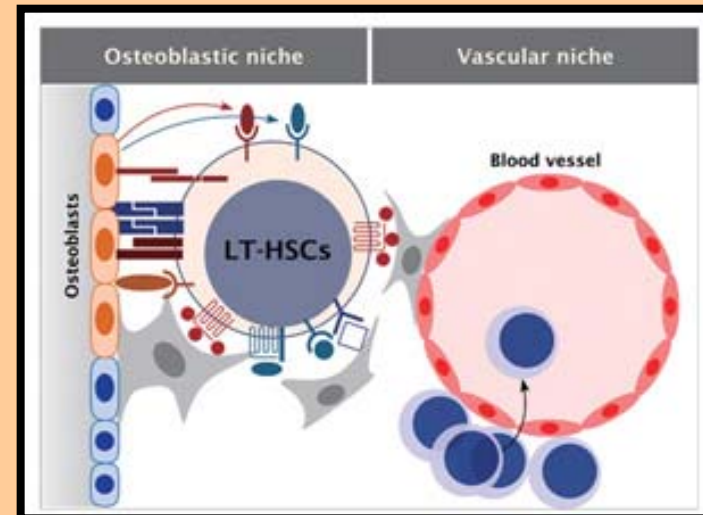
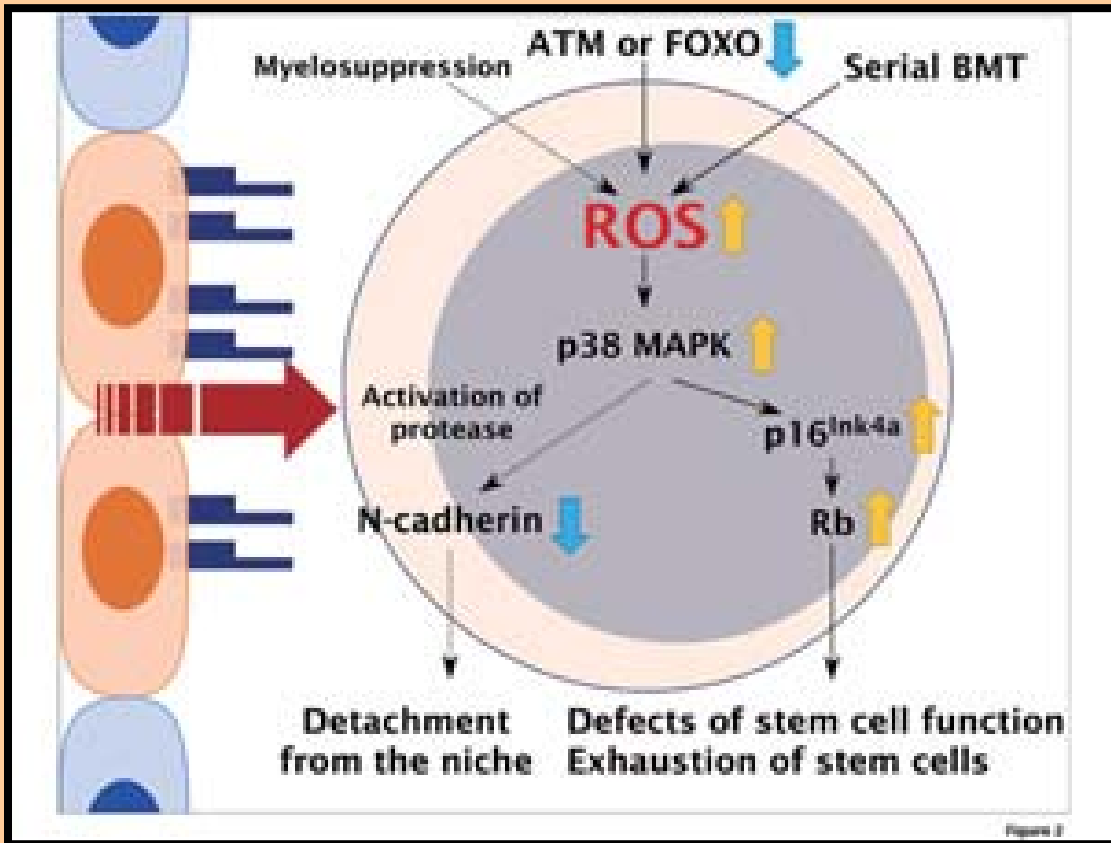


Reaktivní kyslíkové metabolity (ROS – reactive oxygen species) regulují aktivitu HS

- zvýšení produkce ROS vede k indukci proliferace a opuštění niche

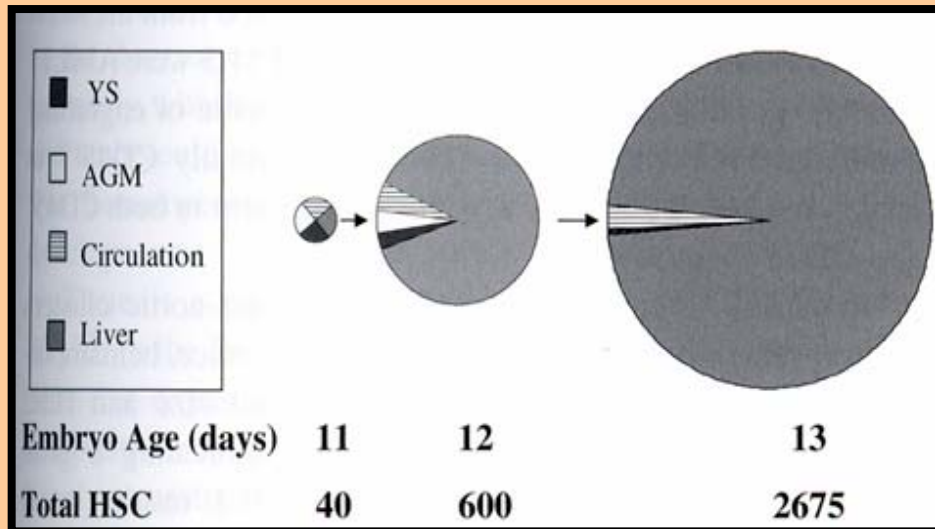
=> úbytek HSC

=> zvýšení intenzity hematopoiezy



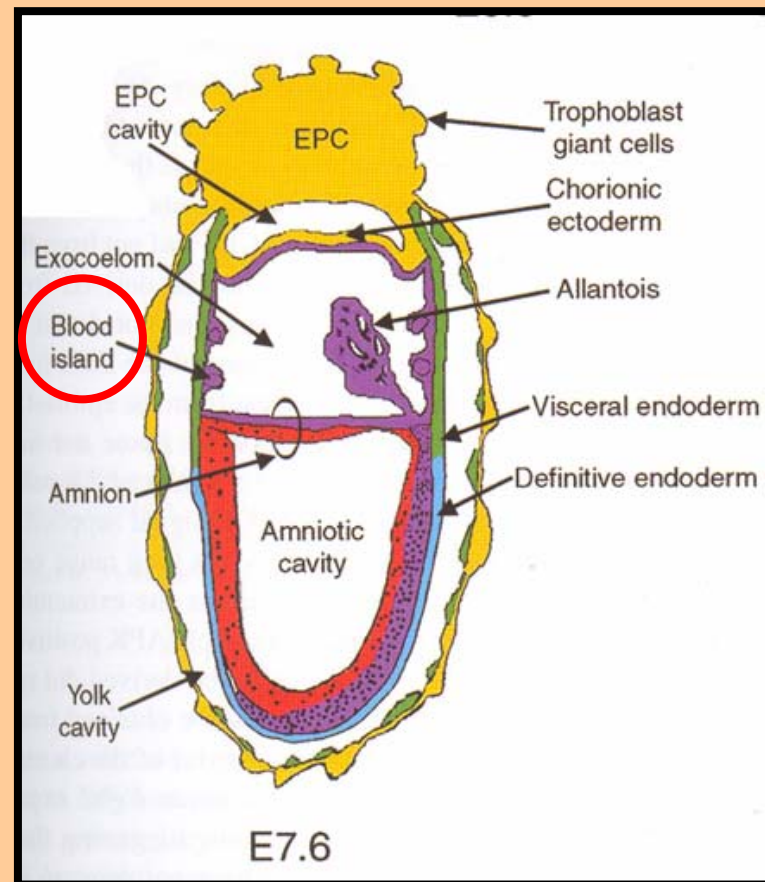
Původ HSC

Podíl jednotlivých tkání na celkovém objemu hematopoézy mezi 11 – 13 dpc u myši

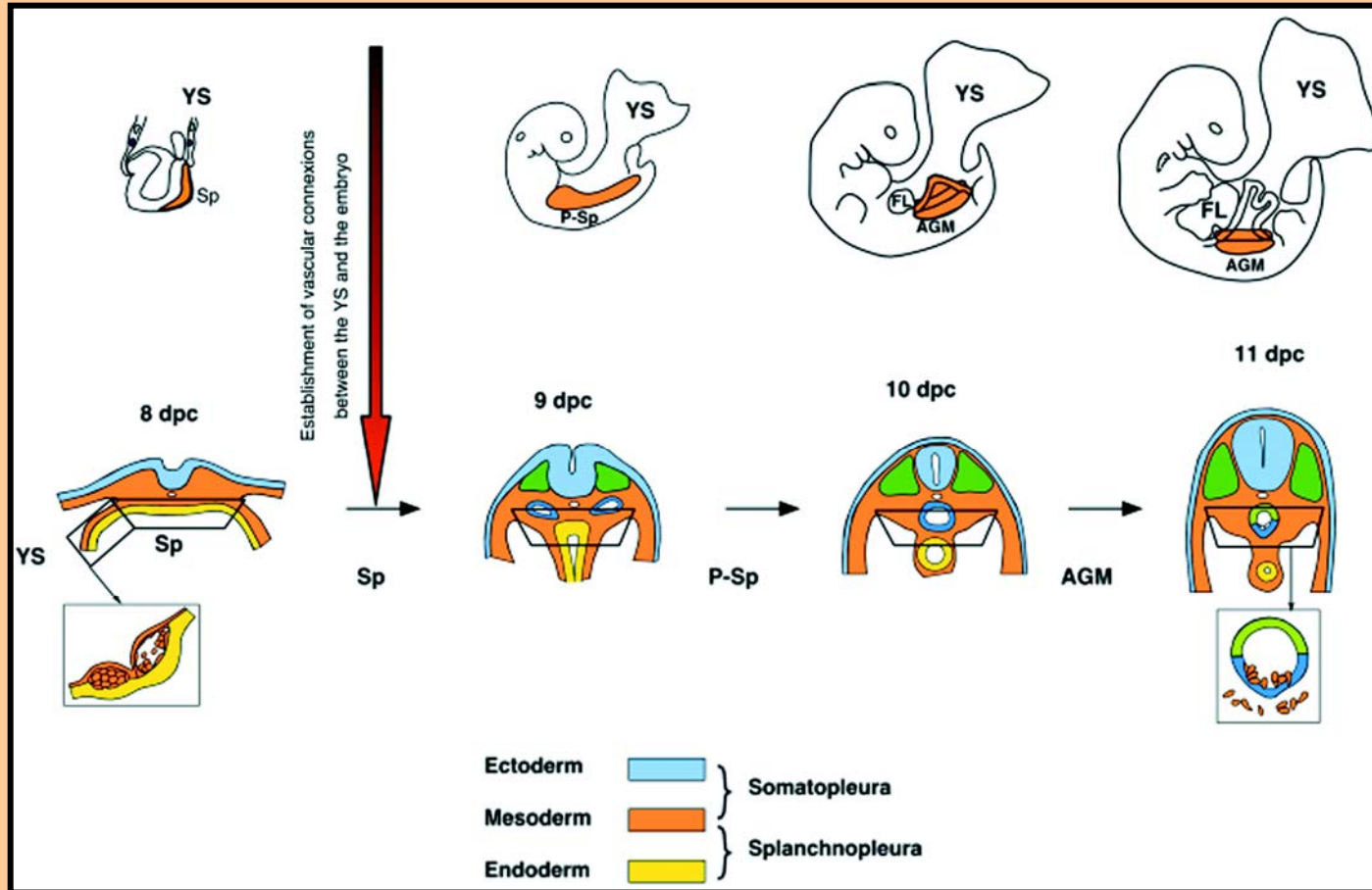


Pozn. Slezina je osídlena HSCs a hematopoetickými progenitory pravděpodobně z jater, protože v době objevení se hematopoézy ve slezině, v žloutkovém vaku a v aortě už hematopoéza neprobíhá a kostní dřeň dosud není vyvinuta.

Místo vzniku krevních ostrůvků (blood island) v průběhu embryogeneze u myši



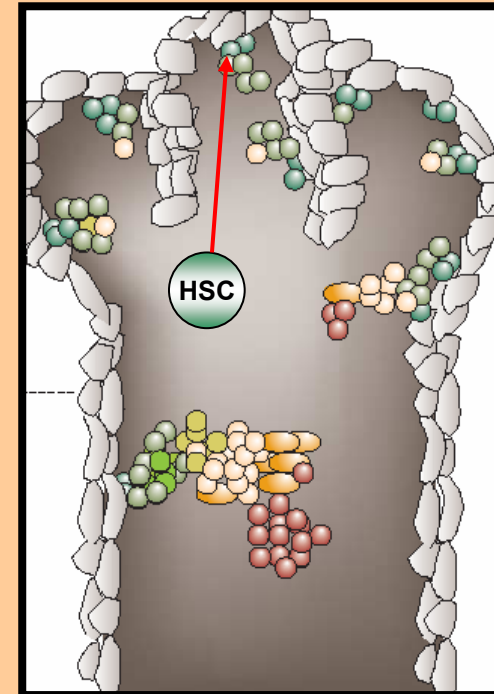
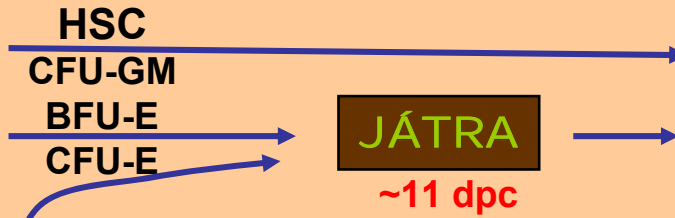
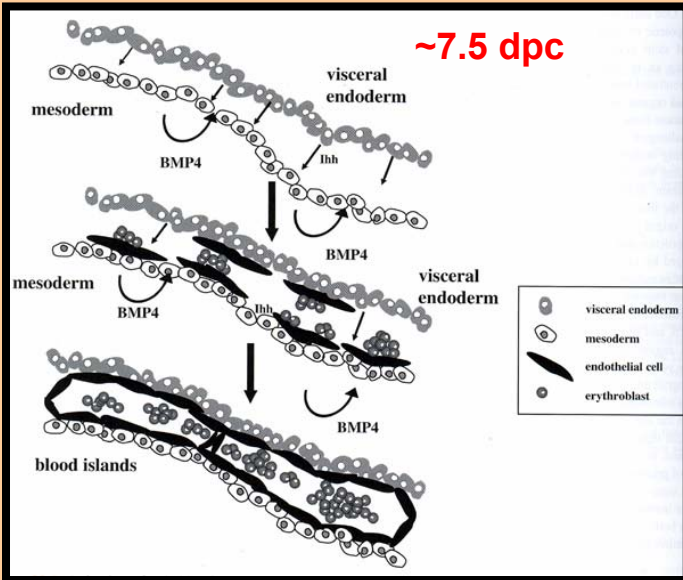
Schema vývoje AGM (aorta-gonads-mesonephros) - začátek fetální hematopoézy



MOUSE

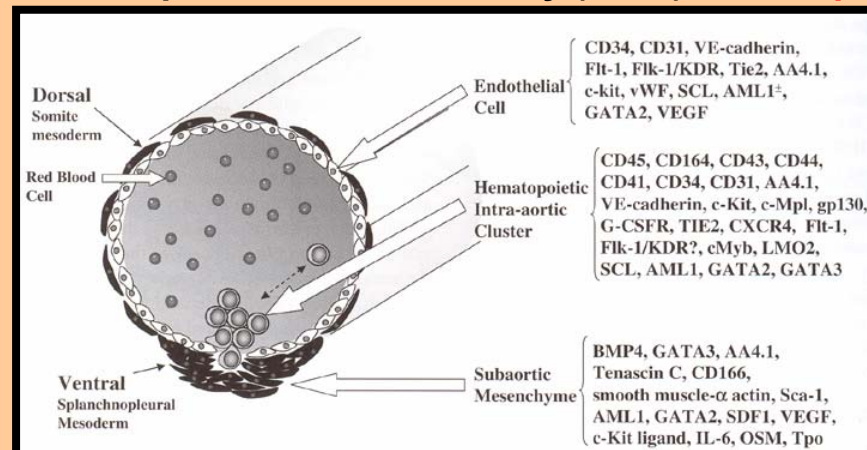
Lokalizace, změna „niche“ u hematopoézy v průběhu ontogeneze

Vznik krevních ostrůvků ve vznikajícím žloutkovém vaku mezi mezodermem a buňkami viscerálního endodermu



Kostní dřeň, ~15 dpc
S vývojem kostní dřeně se HSCs usazují v jejím stroma.

Hematopoéza v endotelu aorty (AGM), ~10.5 dpc



pB pT

pB
pT

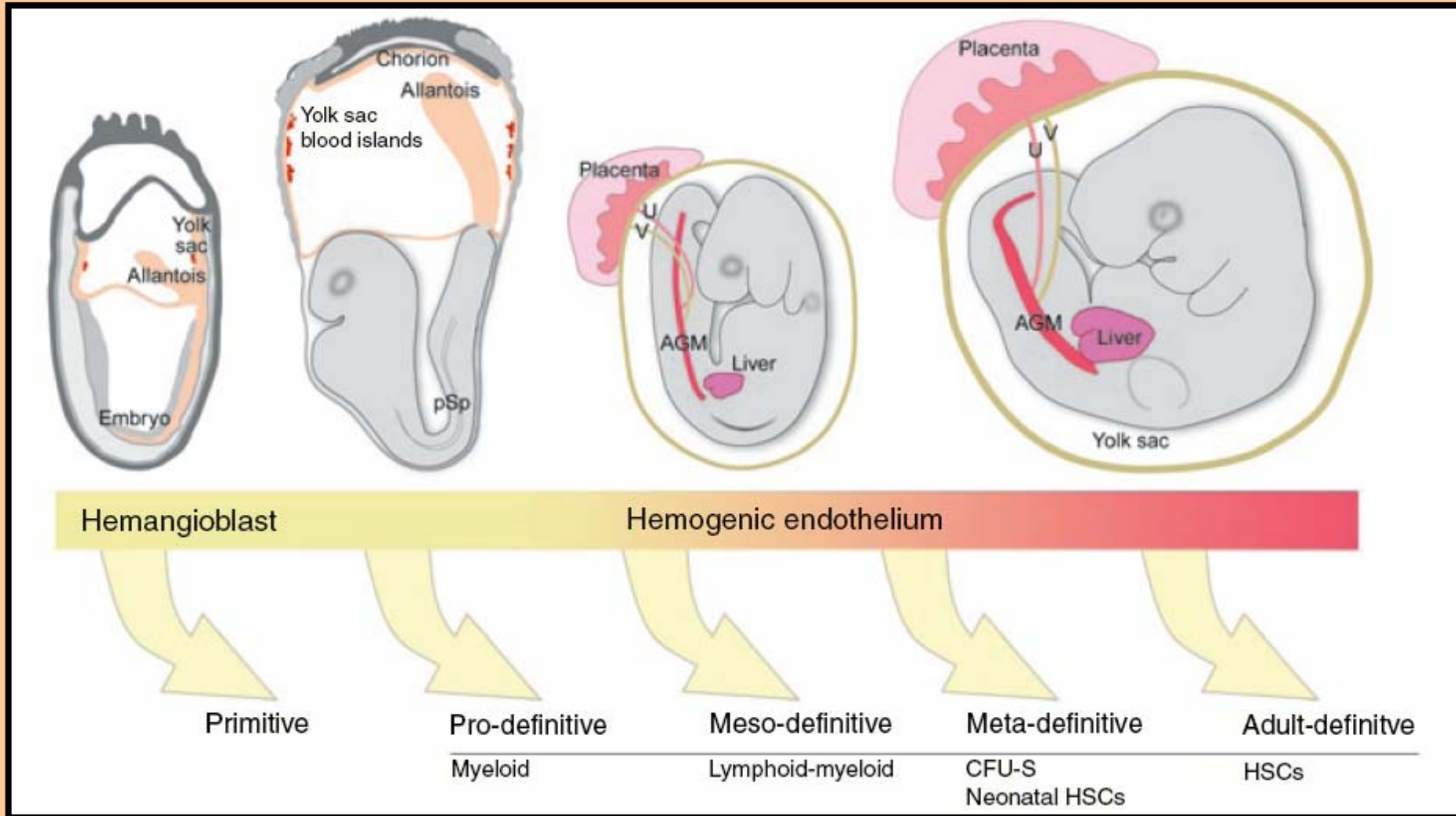
pT

pT

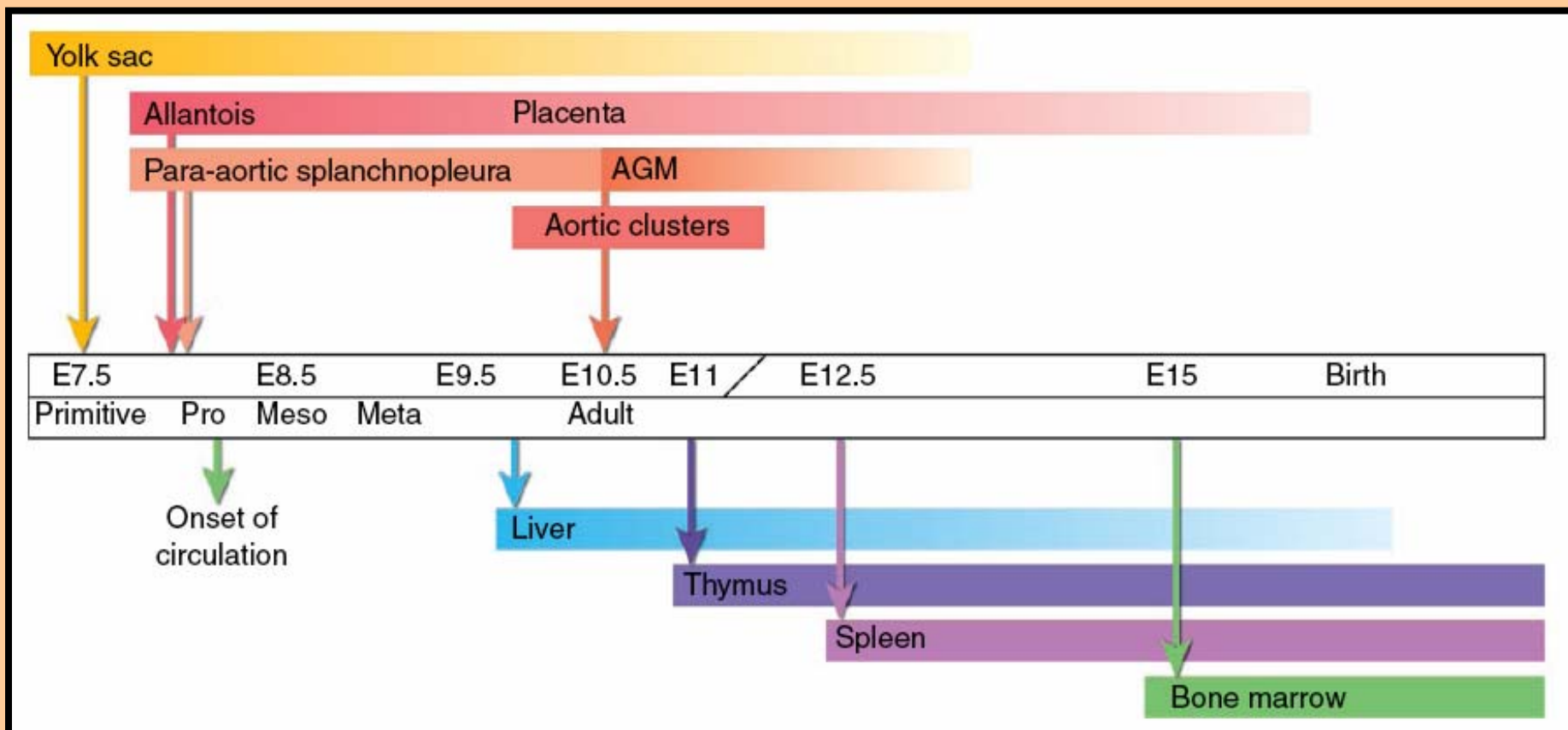
THYMUS

pT, pB – lymfocytární progenitory
CFU-GM – myeloidní progenitory
BFU-E, CFU-E – erythroidní progenitory

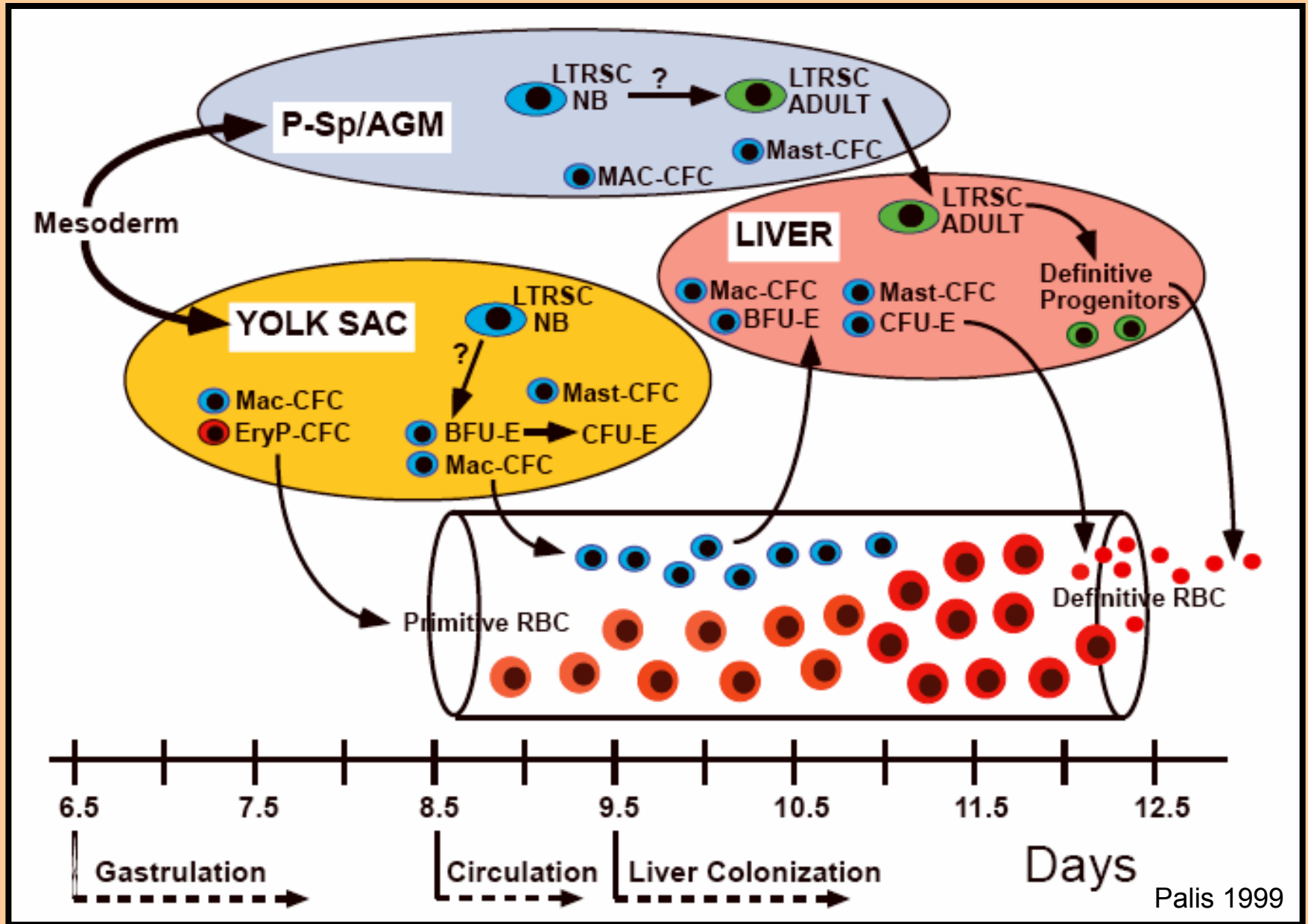
Embryonální hematopoéza (mouse)



Embryonální hematopoéza (mouse)



Embryonální x adultní HSC (mouse)



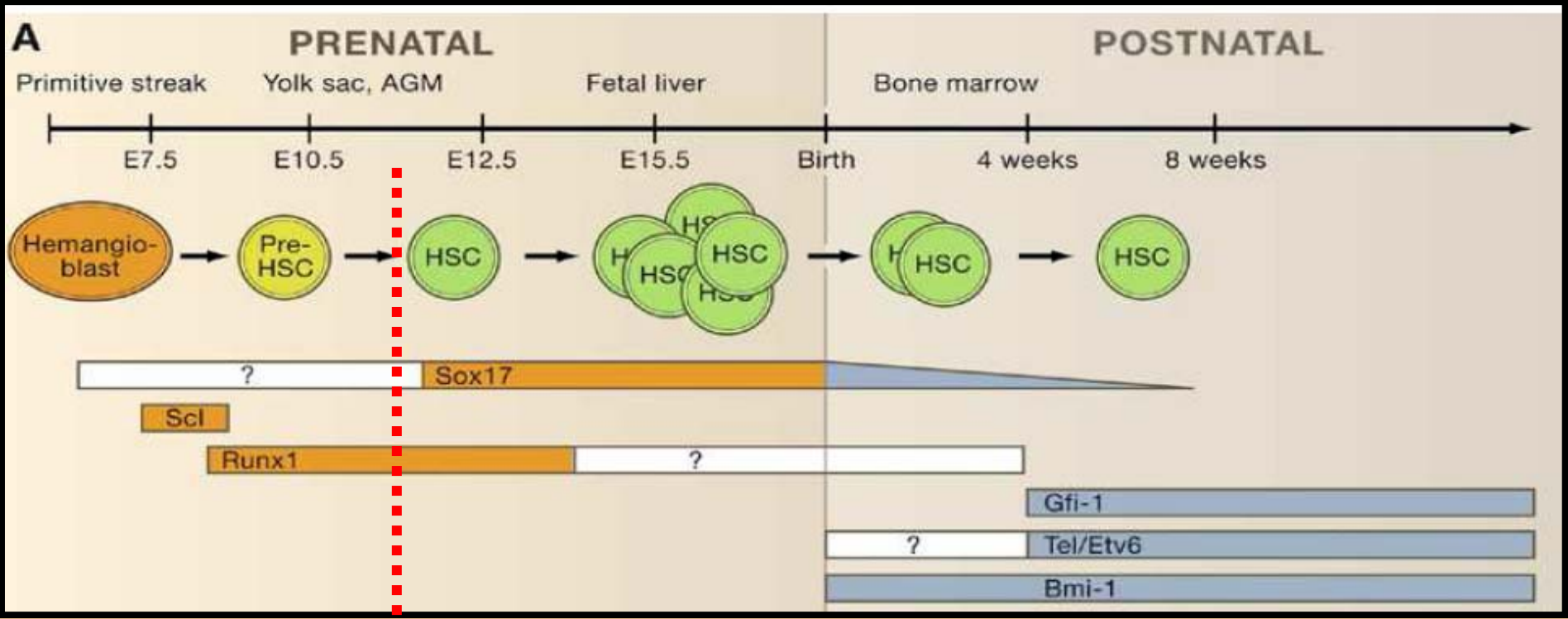
CFC – colony-forming cell (progenitor), CFU – colony-forming unit

	Developmental time	Site	Functional activity
Primitive	E7.5	Yolk sac ^a	Primitive erythroid
	E7.5–E8 (0–4sp)	Yolk sac ^b	Primitive erythroid
Pro-definitive	E7.5–E8 (EHF–2sp)	Allantois ^a	Erythroid-myeloid progenitor
	E7.5–E8 (0–7sp)	Allantois ^a	Erythroid-myeloid progenitor
	E8.25	Yolk sac ^a	Erythroid-myeloid progenitor
	E8.25	Yolk sac ^b	Erythroid-myeloid progenitor
	E9.5	Yolk sac ^b	Erythroid-myeloid progenitor
	E9.0	Placenta	Erythroid-myeloid progenitor
Meso-definitive	E7.5–E8 (0–8sp)	pSp ^a	Erythroid-myeloid-lymphoid progenitor
	E7.5–E 8 (0–5sp)	pSp ^a	Multipotent low-level repopulating progenitor
Meta-definitive	E9.0	Yolk sac ^c	Neonatal repopulating HSC
	E9.0	AGM ^c	Neonatal repopulating HSC
	E9.0	Yolk sac ^c	CFU-S
	E9.0	AGM ^{c,d}	CFU-S
Adult-definitive	E10.5	AGM ^{d,e}	Adult repopulating HSC
	E10.5	Umbilical and vitelline vessels ^d	Adult repopulating HSC
	E10.5–E11	Placenta	Adult repopulating HSC

Rozdíly mezi embryonálními a adultními HSC

Intenzivně proliferující HSC

pomalou proliferující / quiescentní HSC



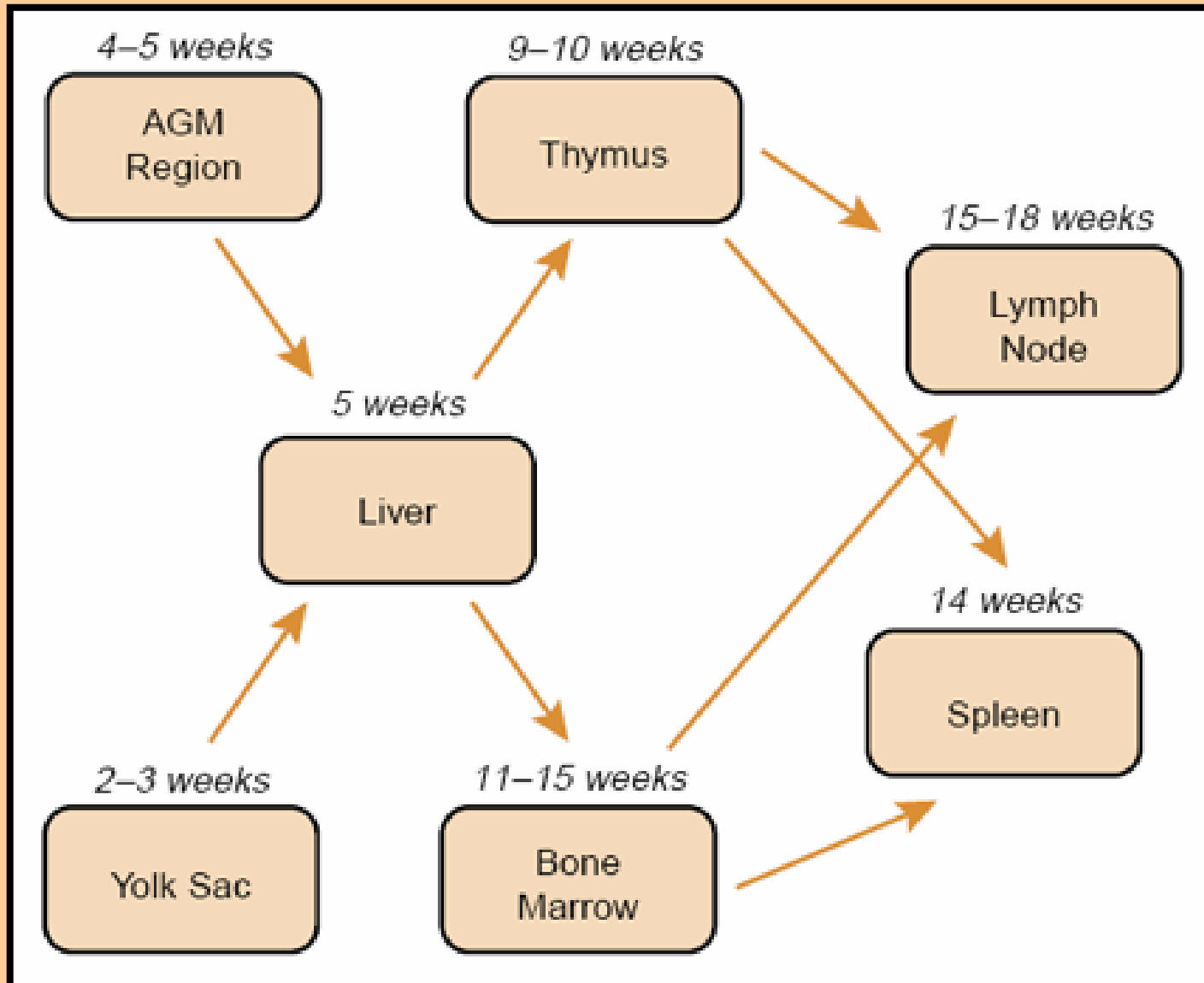
Obnova embryonální hematopoézy

Obnova adultní hematopoézy

Chronologie hematopoézy u člověka a myši

hematopoéza/lymfopoéza (dny)	člověk	myš
embryonální vývoj (dny)	~270	~21
žloutkový vak	18	7.5
dorsální aorta	27	9.5
<i>thymus</i>	40	11
játra	42	11
slezina	48	13
kostní dřeň	77	15
cirkulace krevních buněk	24	8.5

Časování cest lidských HSC



Intenzita hematopoézy v průběhu embryogeneze u člověka

