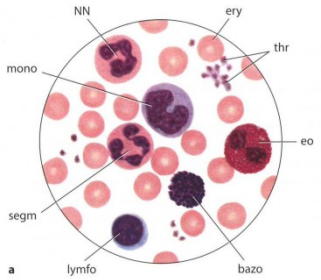
Krvetvorba, systém krevních buněk a krvetvorné orgány; principy diferenciace

Karel Souček

Krev – složení a funkce

- Suspenze buněk v roztoku obsahujícím proteiny a elektrolyty (krevní plazma)
- Slouží pro transport plynů, výživných a odpadních látek, hormonů a dalších regulátorů
- Množství krve u dospělého člověka je ~ 4,5 - 5 litrů (6-8% celkové hmotnosti)
- ~ 40% objemu krve jsou buňky
  - Erytrocyty – transport plynů
  - Trombocyty – srážení krve
  - Leukocyty (granulocyty, monocyty, lymfocyty) – obranná funkce



- Omezené životnost krevních elementů (3-120 dní)
- Krvetvorba zajišťuje jejich obnovu, hlavní krvetvorný orgán (s výjimkou lymfocytů) je kostní dřeň

Rychlost obnovy buněk

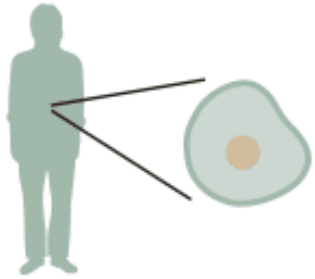
cell type	turnover time	BNID
small intestine epithelium	2-4 days	107812, 109231
stomach	2-9 days	101940
		101940
		109901, 109902
gastrointestinal colon crypt cells	3-4 days	107812
cervix	6 days	110321
lungs alveoli	8 days	101940
tongue taste buds (rat)	10 days	111427
		111407,111408
bone osteoclasts	2 weeks	109906
intestine Paneth cells	20 days	107812
skin epidermis cells	10-30 days	109214, 109215
pancreas beta cells (rat)	20-50 days	109228
		107910
trachea	1-2 months	101940
		109232
sperm (male gametes)	2 months	110319, 110320
bone osteoblasts	3 months	109907
		101706, 107875
liver hepatocyte cells	0.5-1 year	109233
fat cells	8 years	103455
cardiomyocytes	0.5-10% per year	107076, 107077, 107078
central nervous system	life time	101940
skeleton	10% per year	109908
lens cells	life time	109840
oocytes (female gametes)	life time	111451

http://book.bionumbers.org/

Jaký podíl našeho těla tvoří krevní buňky?

number of cells in the human body

$M \approx 100\ kg$



$V \approx 1000 - 10{,}000\ \mu m^3$

$\Downarrow$

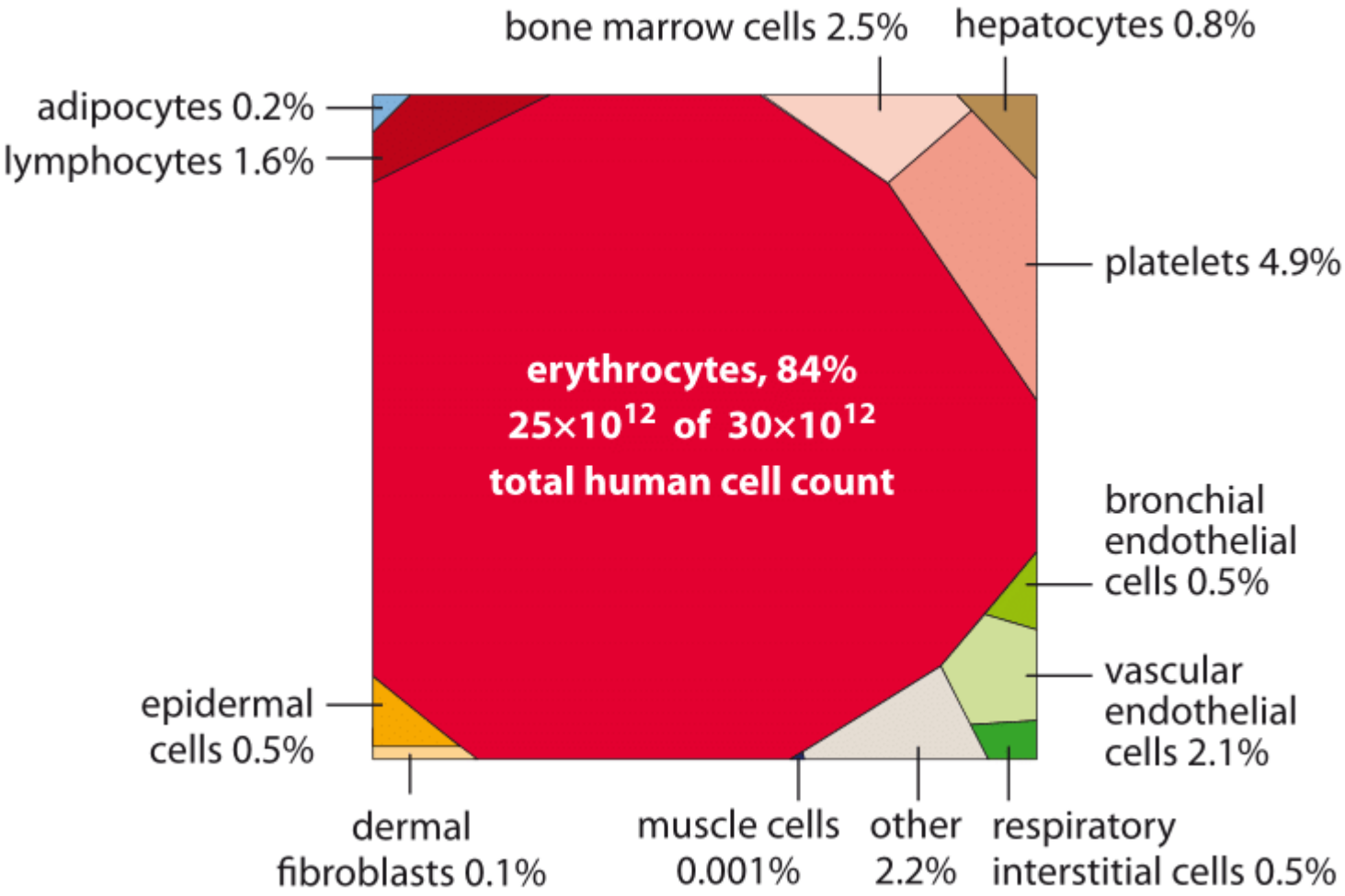
$m \approx 10^{-12} - 10^{-11}\ kg$

$\Downarrow$

$$N \approx \frac{M}{m} = \frac{100\ kg}{10^{-12} - 10^{-11}\ kg} = 10^{13} - 10^{14}$$

http://book.bionumbers.org/

Jaký podíl našeho těla tvoří krevní buňky?



http://book.bionumbers.org/

Jaký podíl našeho těla tvoří krevní buňky?

Typ buňky	Počet/µl krve*	Fyziologické rozmezí**
erythrocyty	5 milionů (muži) 4,5 milionů (ženy)	$4{,}3–5{,}3 \cdot 10^{12}$/l (0,5–2 % retikulocytů)
leukocyty	5 tisíc	$4–9 \cdot 10^{9}$/l
thrombocyty	250 tisíc	$150–300 \cdot 10^{9}$/l
	Rozdělení leukocytů v %	**Fyziologické rozmezí v %****
neutrofilní granulocyty	60 (z toho 5 % tyček)	55–70
eosinofilní granulocyty	3	2–5
bazofilní granulocyty	< 1	0–1
monocyty	6	3–8
lymfocyty	30	18–40

- hemoglobin 120–160 g/l krve
- celková bílkovina 60–80 g/l plasmy (z toho 65 % albuminu)
- bilirubin < 25 mmol/l plasmy

* průměrná hodnota (µl = mm^3)

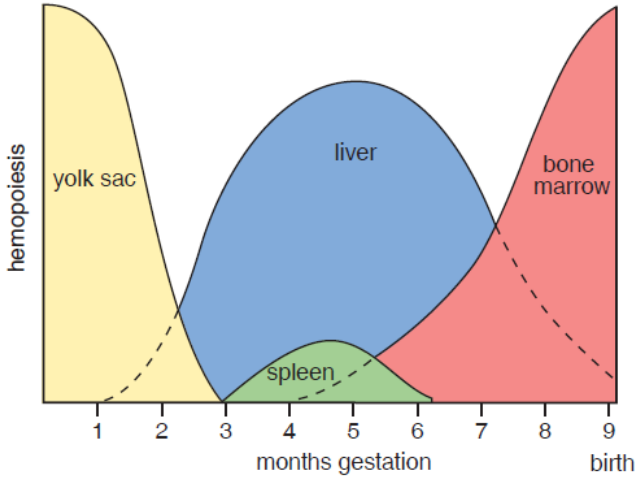
** doplněno podle hodnot uváděných v ČR

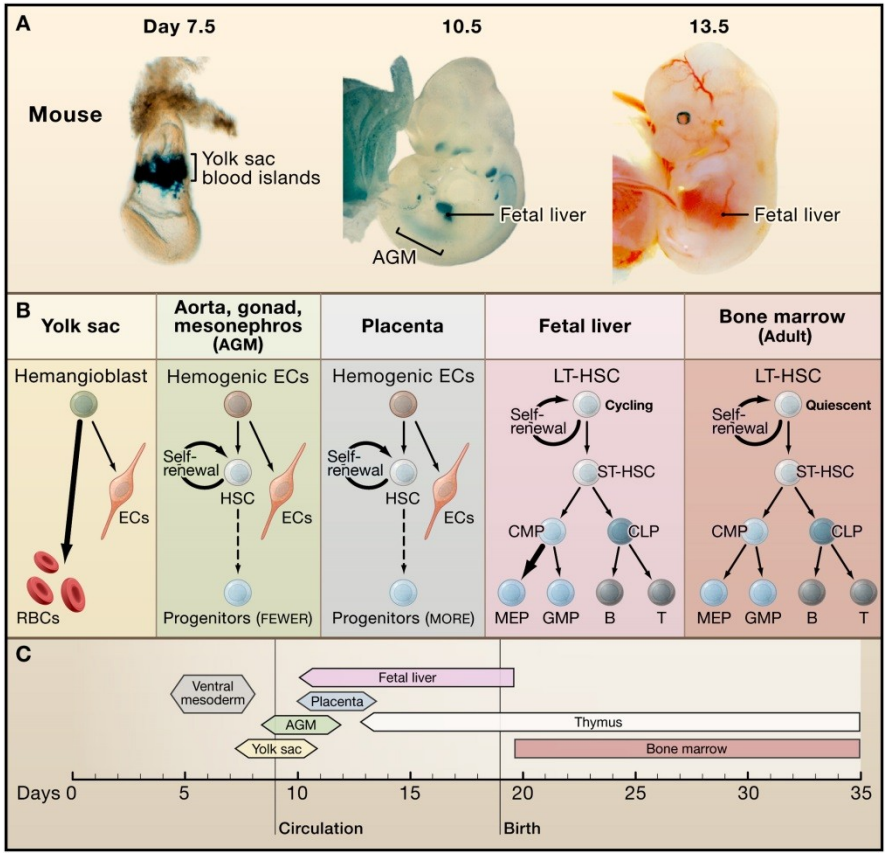
Hematopoéza

- **proces tvorby krevních buněk proliferací a diferenciací jejich prekurzorů**
- Produkce dostatečného množství krevních buněk vyžaduje
  - proliferaci buněk mitotickým dělením
  - diferenciaci buněk během jejich specializace
- Plně diferencované buňky již většinou nemohou proliferovat.

Hematopoetické orgány

- **Embryo**: žloutkový vak, játra, slezina
- **Fetus**: játra, slezina, kostní dřeň
- **Po narození:**
  - kostní dřeň
    - většina krevních buněk (erytrocytů, granulocytů, monocytů)
    - Trombocyty
  - lymfatické uzliny, thymus, slezina a další orgány s výskytem lymfatických folikulů
    - lymfocyty





Cell 2008 132, 631-644DOI: (10.1016/j.cell.2008.01.025)

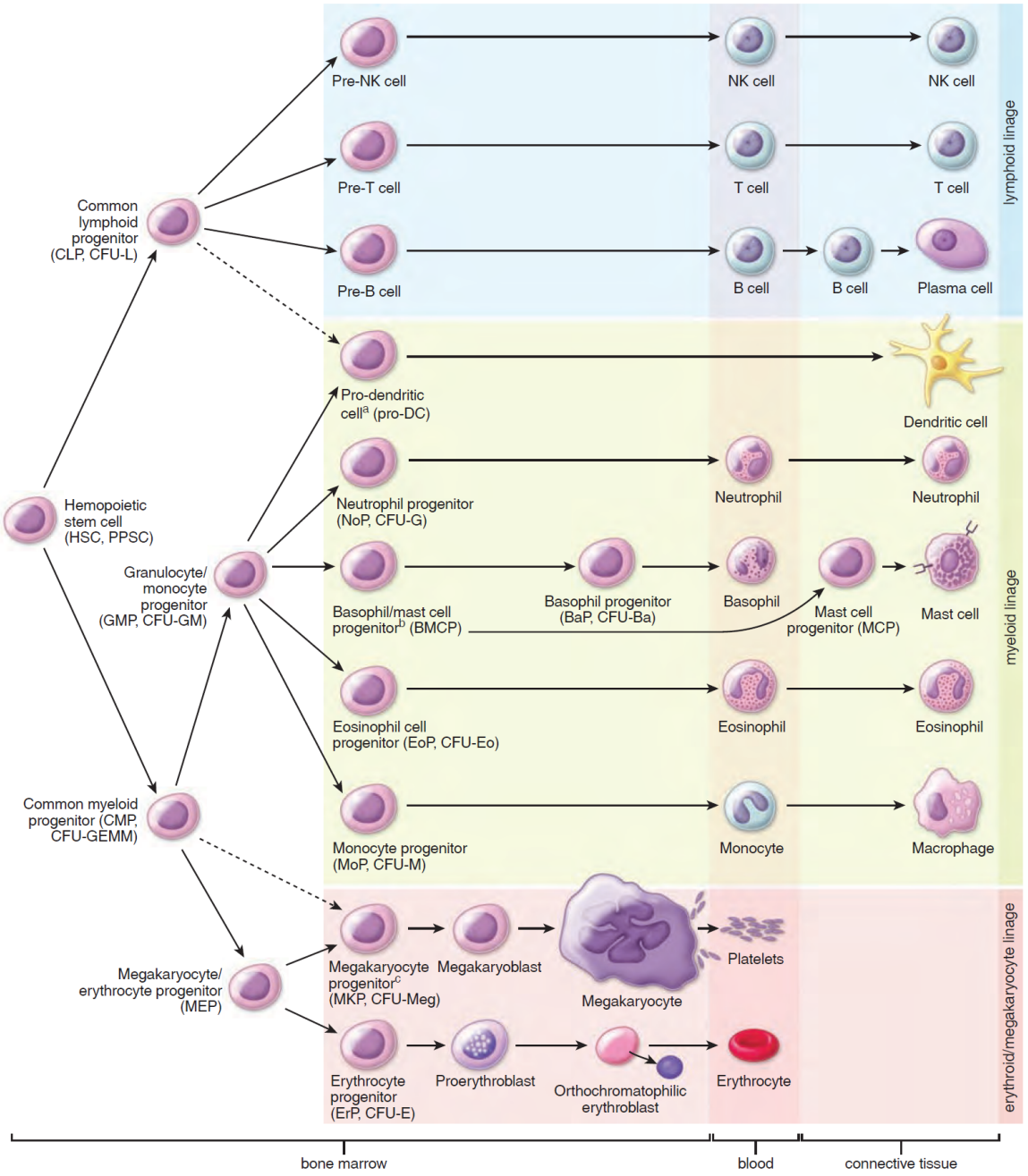
Větve hematopoézy

Lymphoidní:

produkce T lymfocytů
produkce B lymfocytů

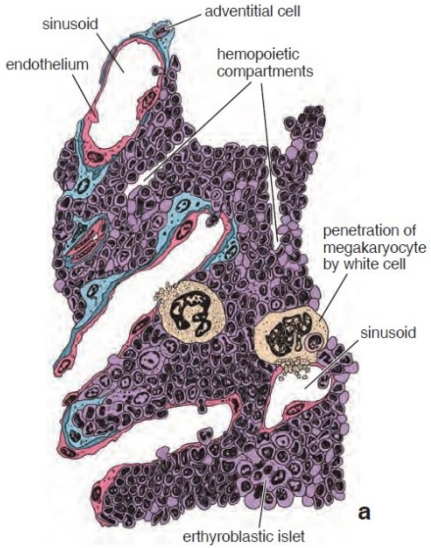
Myeloidní:

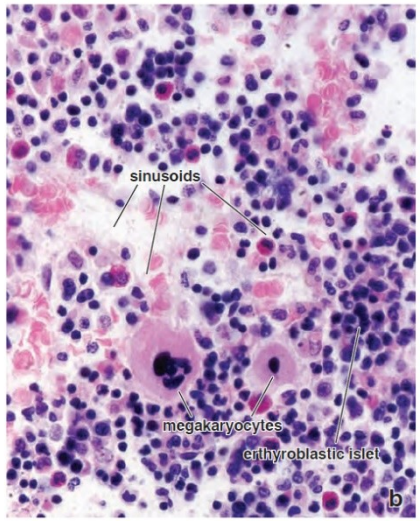
erytropoéza
monocytopoéza
granulopoéza
(eosinopoéza, basopoéza)
trombocytopoéza



Kostní dřeň

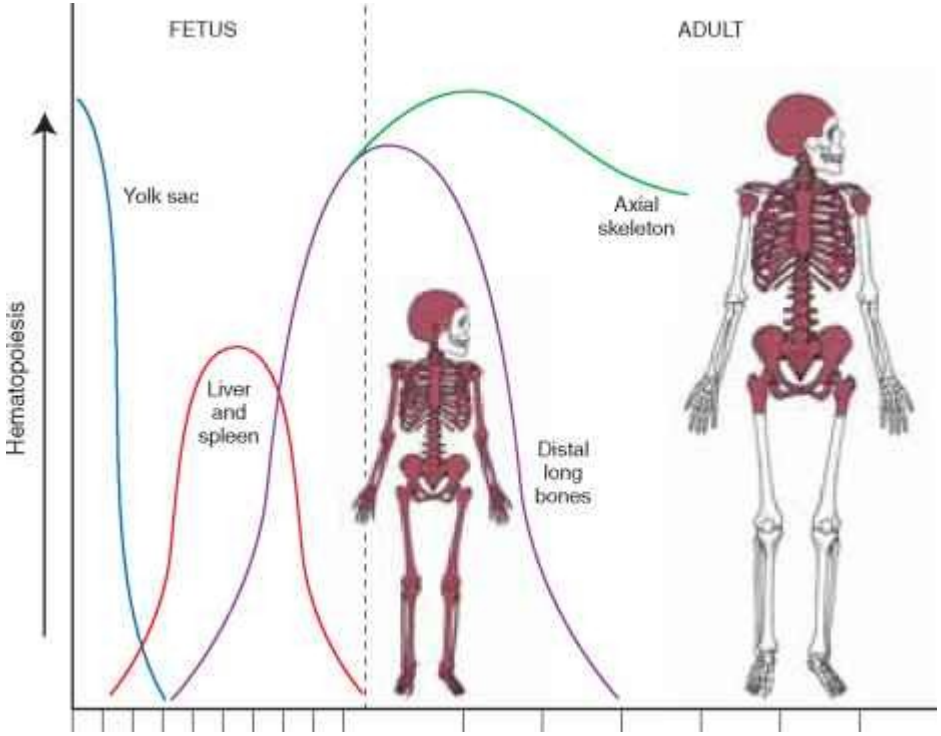
- Kostní dřeň poskytuje strukturální podporu a udržuje odpovídající prostředí pro průběh hematopoézy.
- Stroma kostní dřeně je pórovitá fibrózní tkáň tvořená fibroblasty, retikulárními buňkami a kostními buňkami, na kterou adherují vyvíjející se buňky, makrofágy a adipocity.
- Stromální buňky, makrofágy a endoteliální buňky spolu s hematopoetickými buňkami produkují růstové faktory regulující proliferaci a diferenciaci buněk.
- Strukturní molekuly vážou tyto růstové faktory, a tak udržují jejich vysokou koncentraci v kostní dřeni.
- **Rozlišujeme:**
  - červenou kostní dřeň – vlastní hematopoéza
  - bílou kostní dřeň – tuková tkáň

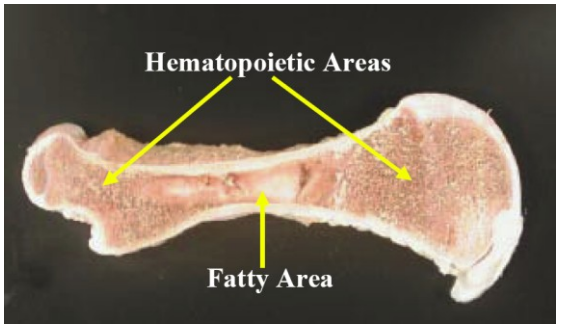




Kostní dřeň a věk

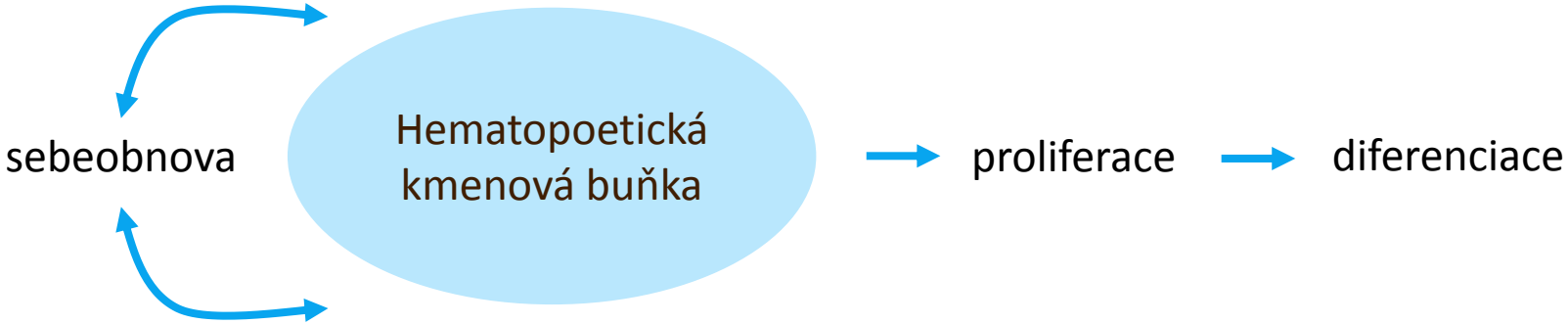
- **Převažující aktivita:**
  - mládí – ploché a dlouhé kosti
  - stáří – ploché kosti a konce dlouhých kostí
- **Mladí jedinci:** kostní dřeň celá červená, hematopoéza probíhá ve všech částech
- **Dospělí jedinci:** středová část kostí se postupně zaplňuje tukem a vytlačuje hematopoetické buňky; hematopoéza v těchto částech probíhá pouze v případě zvýšené potřeby krevních buněk





Hematopoetická kmenová buňka (HSC)

- Má nejen schopnost sebeobnovy, ale dává vznik všem krevním specializovaným buňkám
  - Dlouhodobé (LT-HSC): velké množství telomeráz
  - Krátkodobé (ST-HSC): nižší hladina telomeráz => životnost 2 týdny



Vývojová stádia buněk v kostní dřeni

Hematopoetická kmenová buňka

je základní sebeobnovující se buňkou se schopností diferencovat do různých typů krevních buněk (multipotentní).

↓

Progenitorová buňka

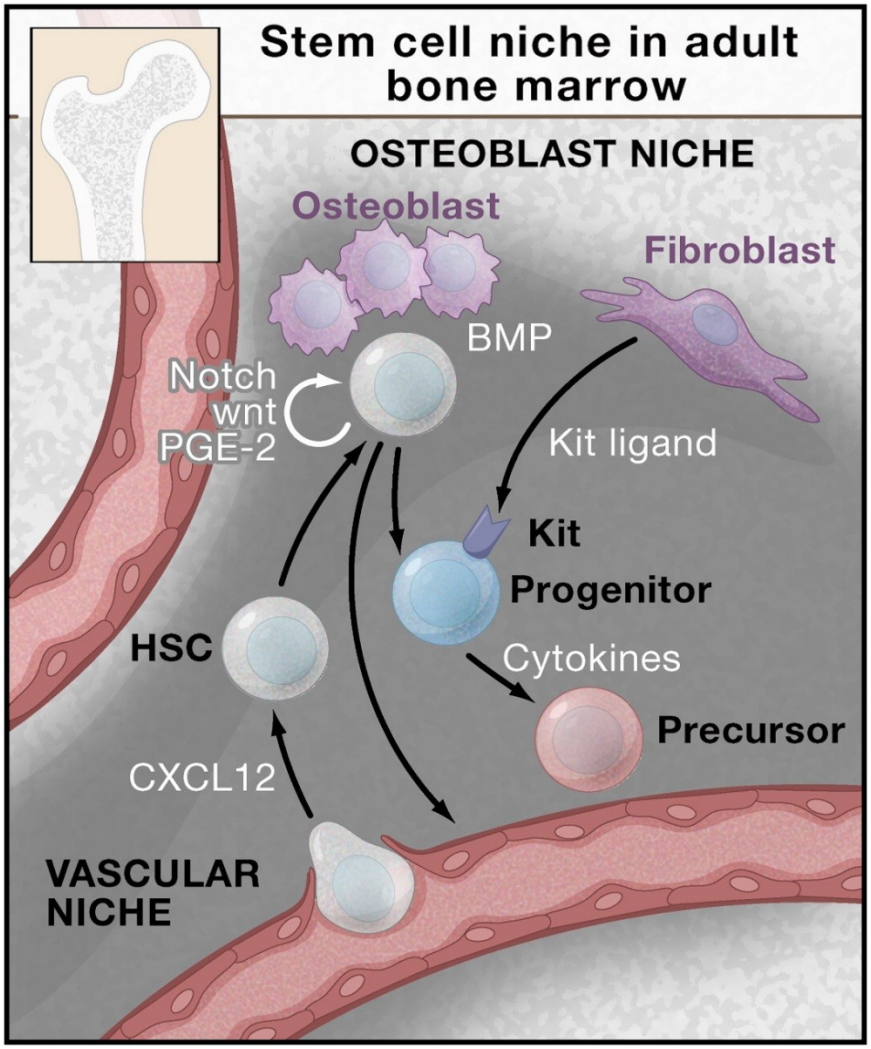
je již částečně diferencována a může dávat vznik jen dané buněčné linii (CFU).

↓

Téměř a zcela **zralé krevní buňky.**

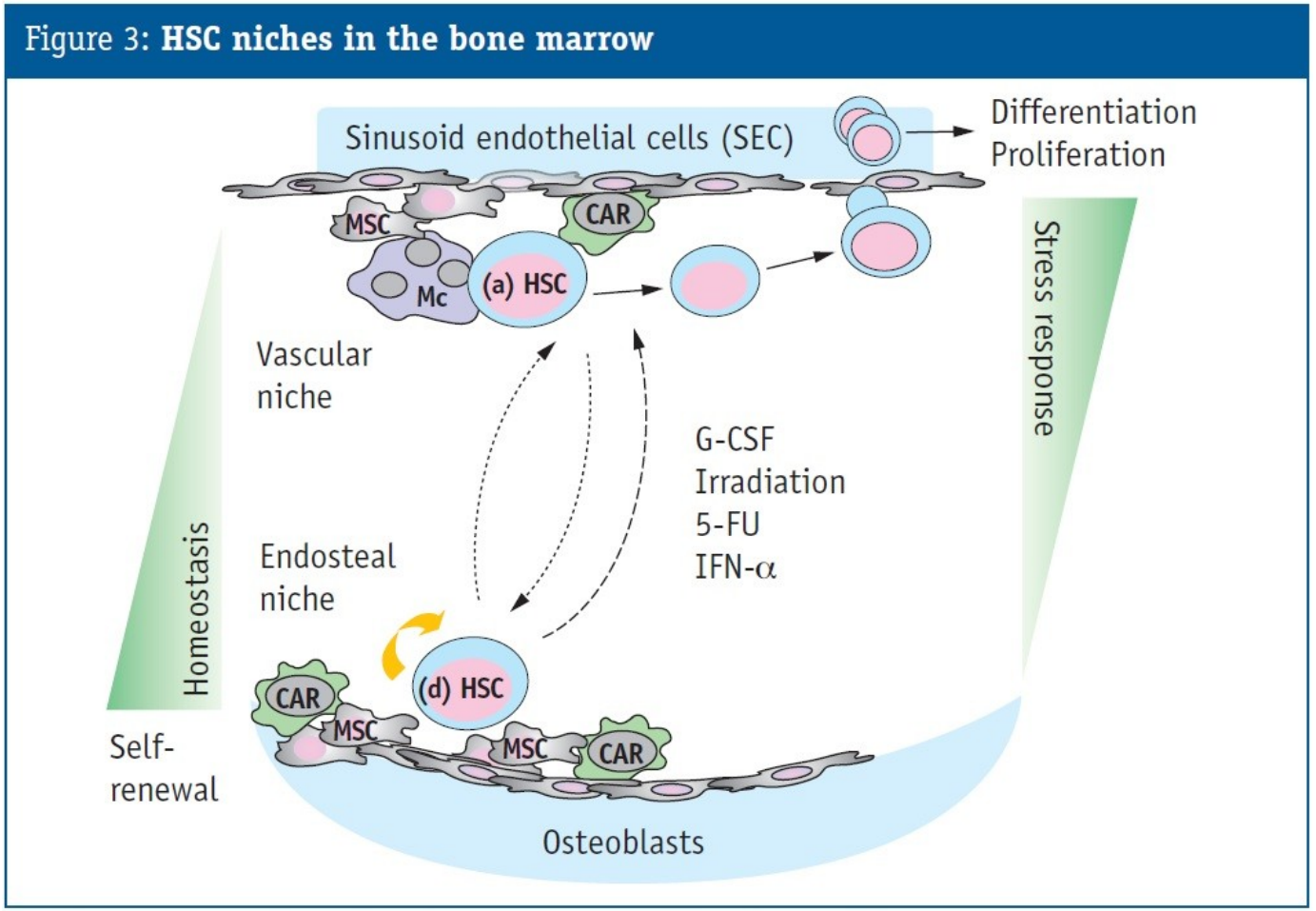
Hematopoetická kmenová buňka (HSC)

- Osteoblastická nika
- Vaskulární nika
- CXCL12 (**stromal cell-derived factor 1**, **SDF1**) reguluje migraci HSCs
- Stromální buňky podporují hematopoézu – např. produkcí c-Kit ligandu
- Další cytokiny – interleukiny (IL), trombopoetin (Tpo), erytropoetin (Epo) ovlivňují funkci progenitorů



Cell 2008 132, 631-644DOI: (10.1016/j.cell.2008.01.025)

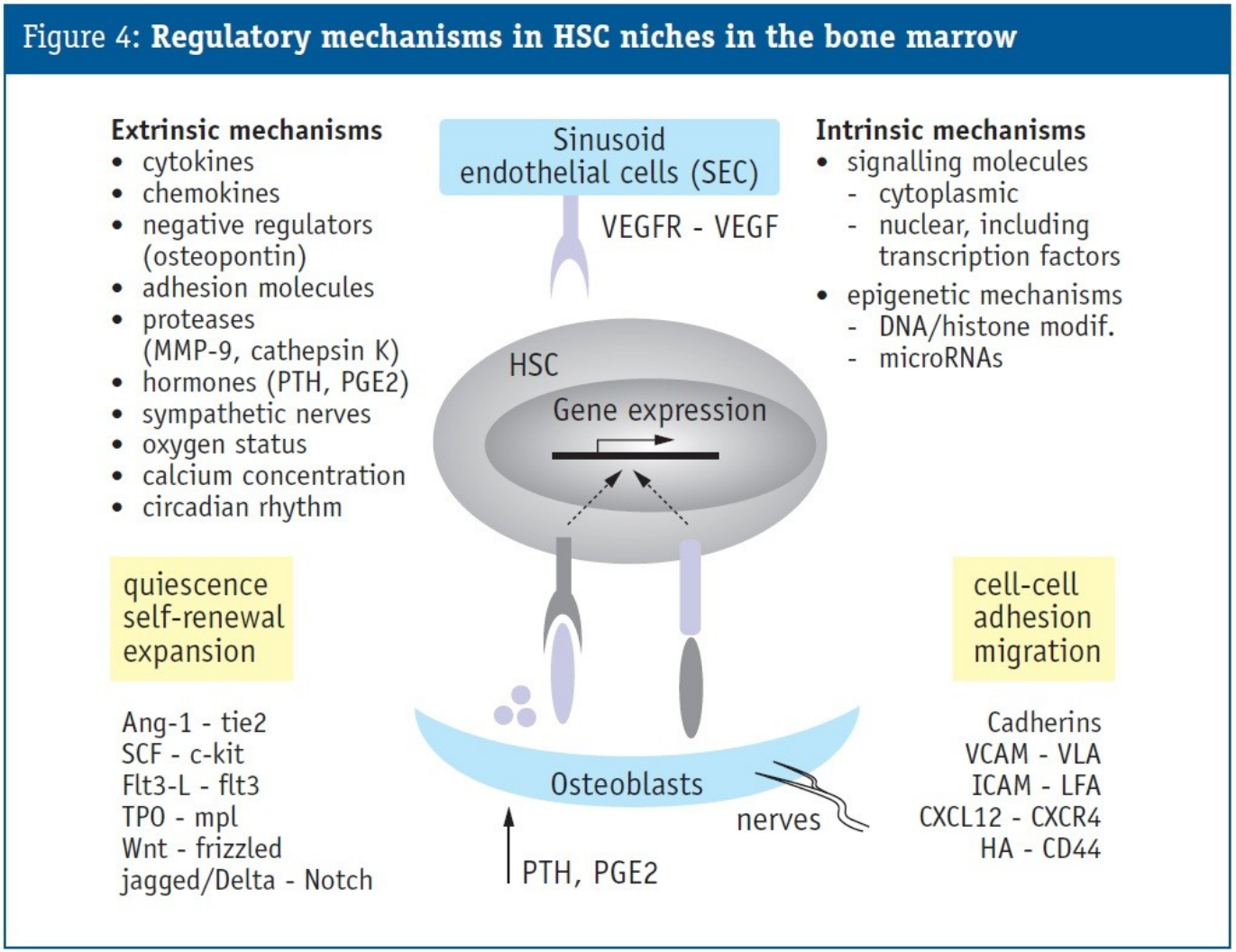
Hematopoetická kmenová buňka (HSC)



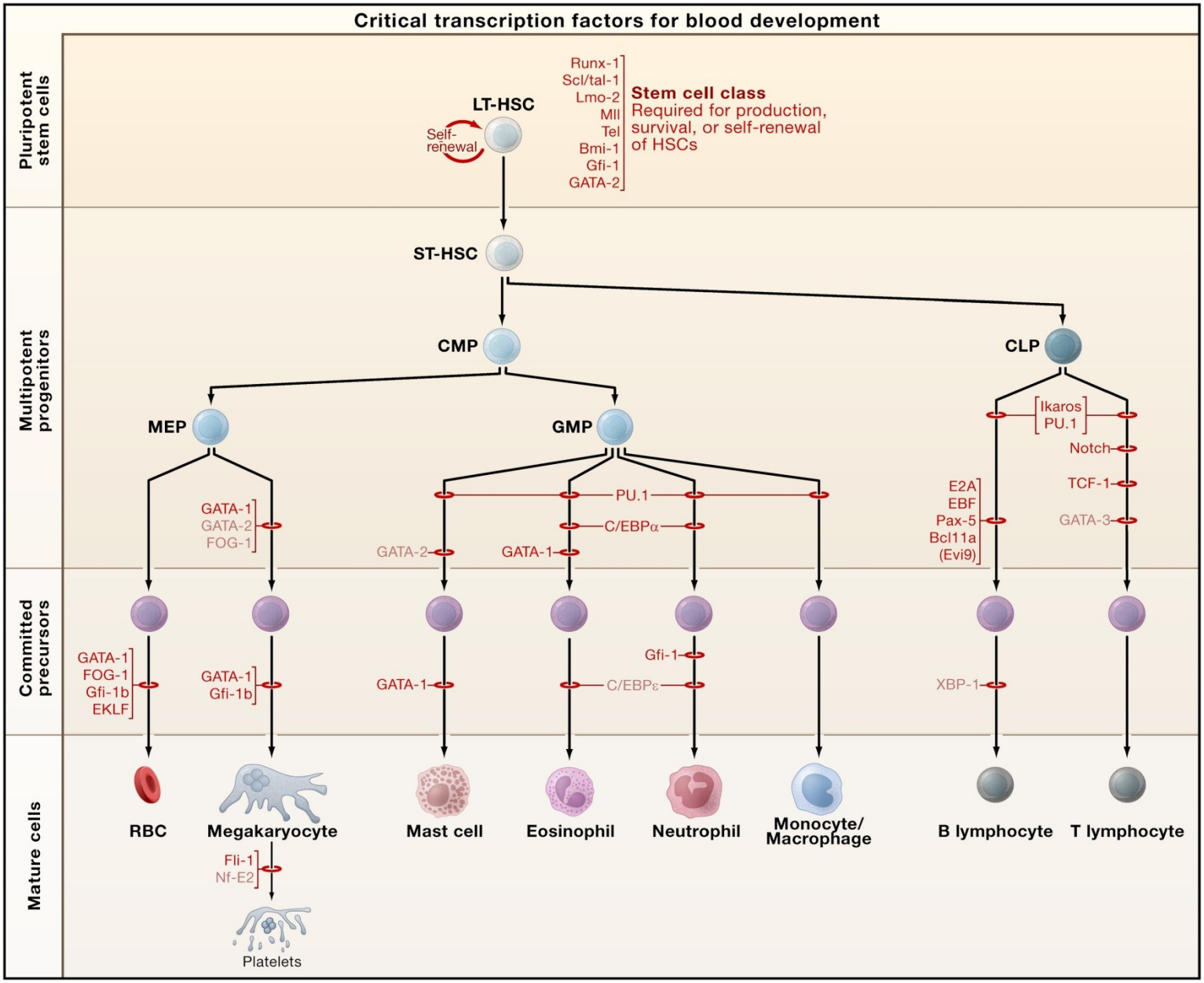
(d): dormant HSCs, (a): activated HSCs; MSC: mesenchymal stem cells; CAR: CXCL12-expressing reticular cells; Mc: monocytes/macrophages

https://ebmtonline.forumservice.net/

Hematopoetická kmenová buňka (HSC)



https://ebmtonline.forumservice.net/



Cell 2008 132, 631-644DOI: (10.1016/j.cell.2008.01.025)

Cytokiny v hematopoéze

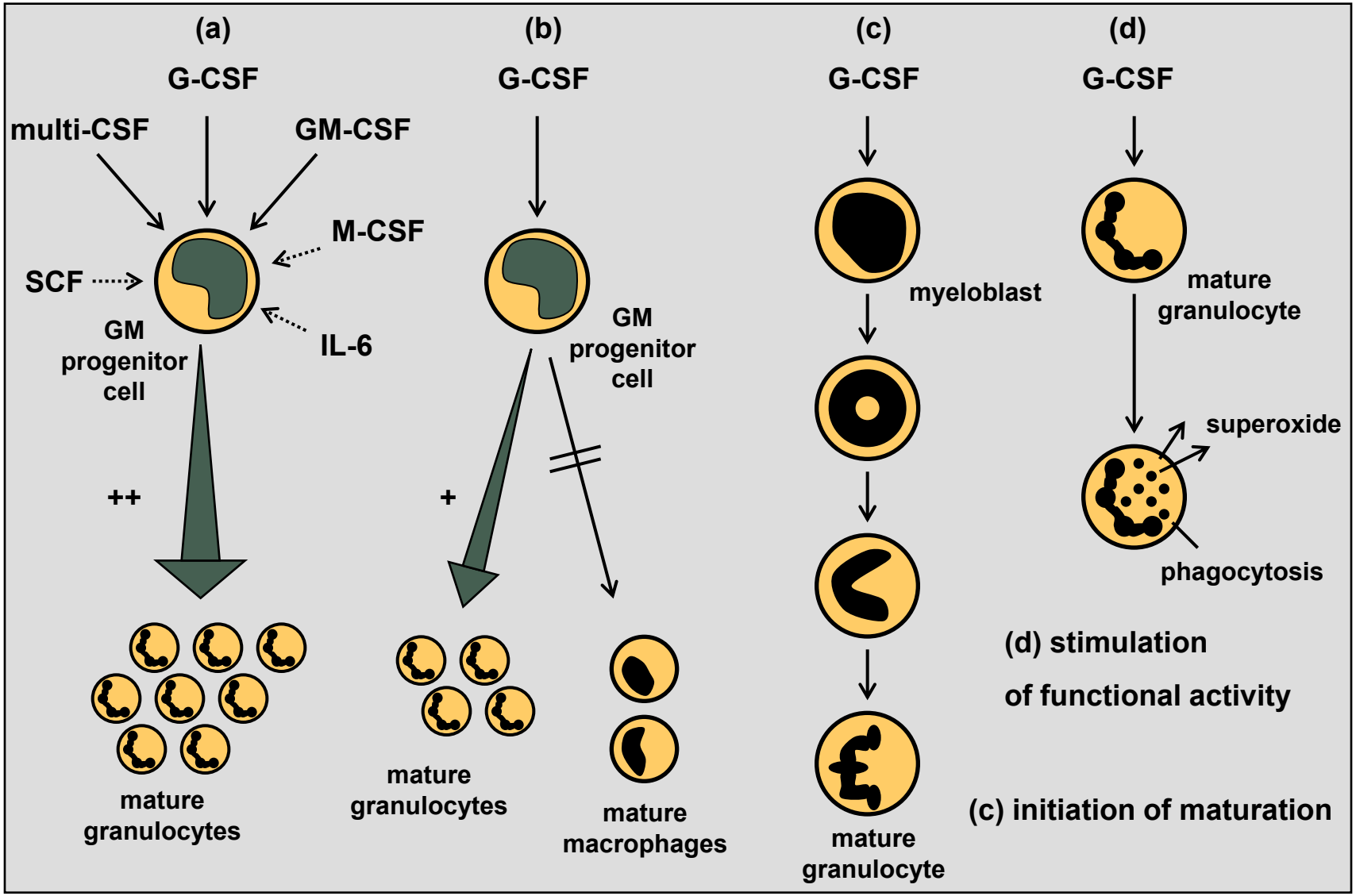
Cytokine[a]	Symbol	Source	Target
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	GM-CSF	T cells, endothelial cells, fibroblasts	CMP, ErP, GMP, EoP, BaP, MKP, all granulocytes, erythrocytes
Granulocyte colony-stimulating factor	G-CSF	Endothelial cells, monocytes	ErP, GMP, EoP, BaP, MKP
Monocyte colony-stimulating factor	M-CSF	Monocytes, macrophages, endothelial and adventitial cells	GMP, MoP, monocytes, macrophages, osteoclasts
Erythropoietin	EPO	Kidney, liver	CMP, MEP, ErP
Thrombopoietin	TPO	Bone marrow	MKP, megakaryocytes
Interferon-γ	IFN-γ	$CD4^+$ T cells, NK cells	B cells, T cells, NK cells, neutrophils, monocytes
Interleukin 1	IL-1	Neutrophils, monocytes, macrophages, endothelial cells	$CD4^+$ T cells, B cells
Interleukin 2	IL-2	$CD4^+$ T cells	T cells, B cells, NK cells
Interleukin 3	IL-3	$CD4^+$ T cells	CMP, ErP, GMP, EoP, BaP, MKP, all granulocytes, erythroid cells
Interleukin 4	IL-4	$CD4^+$ T cells, mast cells	B cells, T cells, mast cells
Interleukin 5	IL-5	$CD4^+$ T cells	EoP, eosinophils, B cells
Interleukin 6	IL-6	Endothelial cells, neutrophils, macrophages, T cells	CMP, ErP, GMP, B cells, T cells, macrophages, hepatocytes
Interleukin 7	IL-7	Adventitial cells of bone marrow	Early pre-B, pre-T cells
Interleukin 8	IL-8	Macrophages, endothelial cells	T cells, neutrophils
Interleukin 9	IL-9	$CD4^+$ T cells	$CD4^+$ T cells, CMP, ErP
Interleukin 10	IL-10	Macrophages, T cells	T cells, B cells, NK cells
Interleukin 11	IL-11	Macrophages	CMP, ErP, GMP, T cells, B cells, macrophages, megakaryocytes

[a]Hemopoietic cytokines include colony-stimulating factors (CSFs), interleukins, and inhibitory factors. They are almost all glycoproteins with a basic polypeptide chain of about 20 kilodaltons. Nearly all of them act on progenitor stem cells, lineage-restricted progenitor cells, committed cells, and maturing and mature cells. Therefore, the targets listed above are target lines rather than individual target cells.

Cytokiny

- Nízká MW (< 80 kDa), často bývají glykosylovány (glykoproteiny)
- účastní se imunity a zánětu, kde regulují intenzitu a délku trvání odpovědi
- jsou produkovány - lokálně, po přechodnou dobu
- působí zejména autokrinně a parakrinně
- jsou vysoce účinné (pM)
- interagují vysoce specificky s povrchovými receptory
- po vazbě na receptory indukují přenost signálu vedoucí k transkripci cílových genů, **výsledný efekt je závislý na konkrétním kontextu**
- působí v síti, kde
  - svoje efekty vzájemně ovlivňují (zejm. svoji produkci)
  - indukují transmodulaci povrchových receptorů
  - mohou působit na buněčné funkce aditivně, synergicky anebo antagonisticky

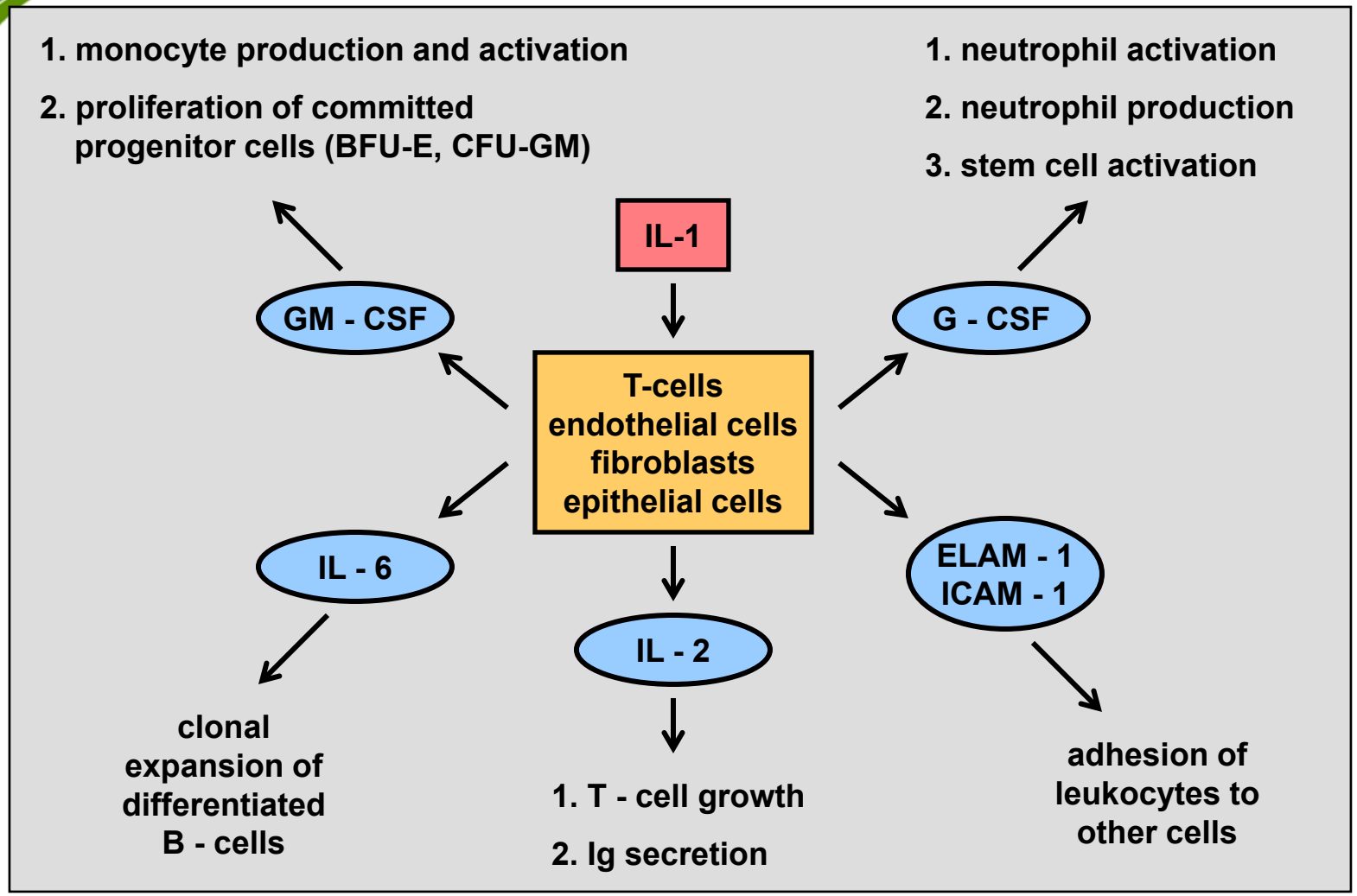
Cytokiny jsou multifunkční



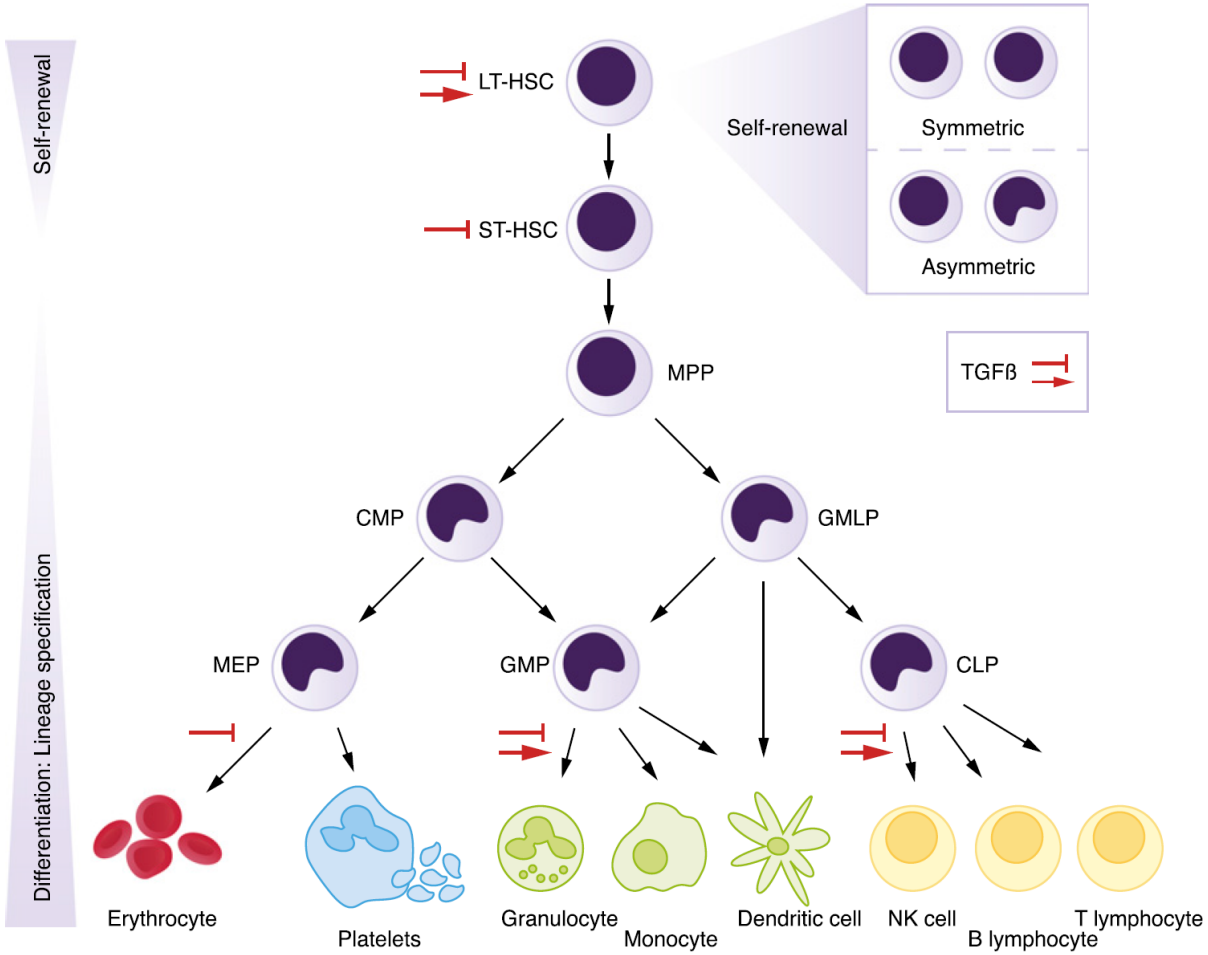
(a) cell production is dependent on regulator stimulation

(b) induction of commitment to form cells in a restricted lineage

Úloha IL – 1 v hematopoéze



Úloha TGF-β v hematopoéze



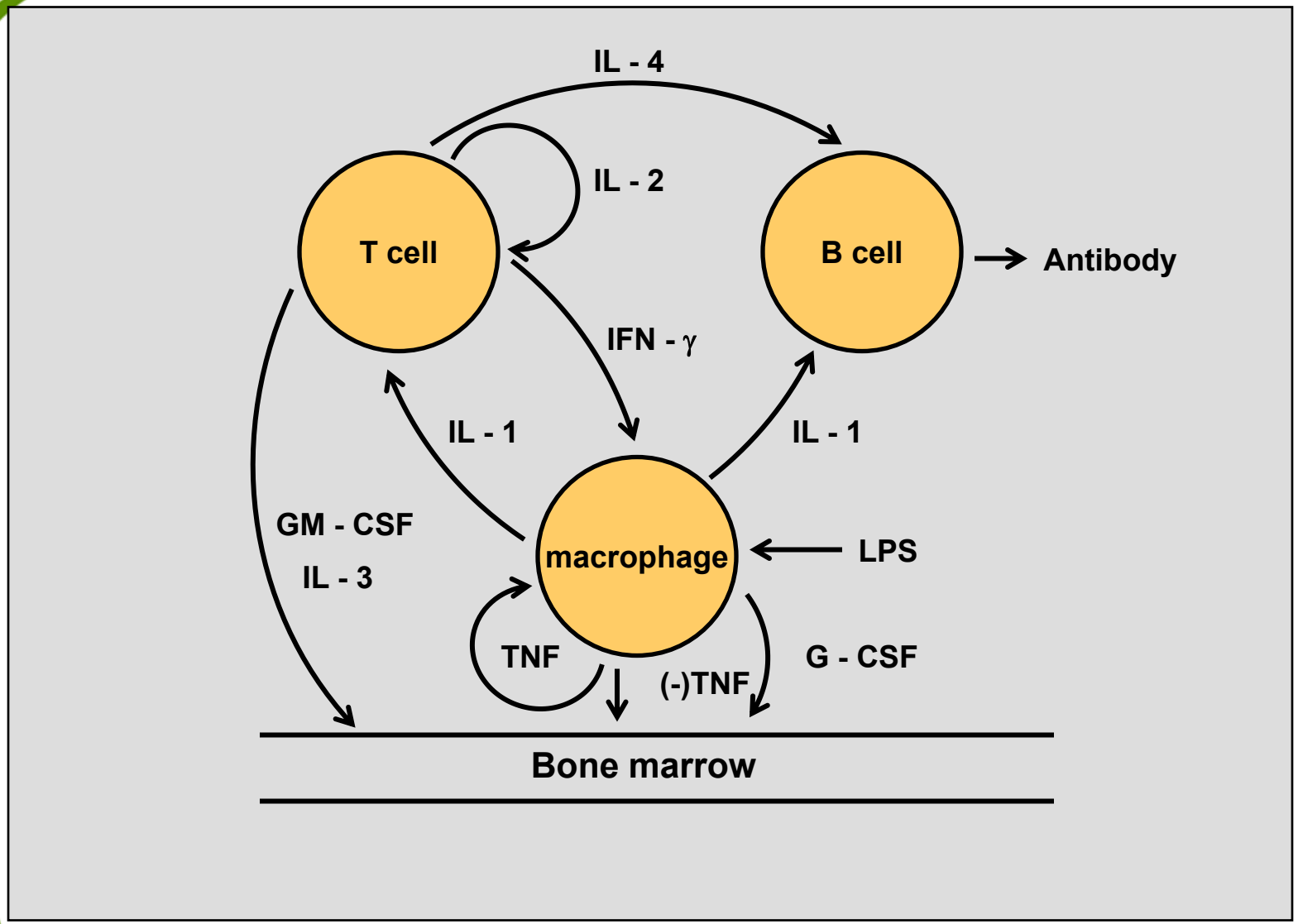
TGF-β signaling in the control of hematopoietic stem cells

Ulrika Blank and Stefan Karlsson

Division of Molecular Medicine and Gene Therapy, Lund Stem Cell Center, Lund University Hospital, Lund, Sweden

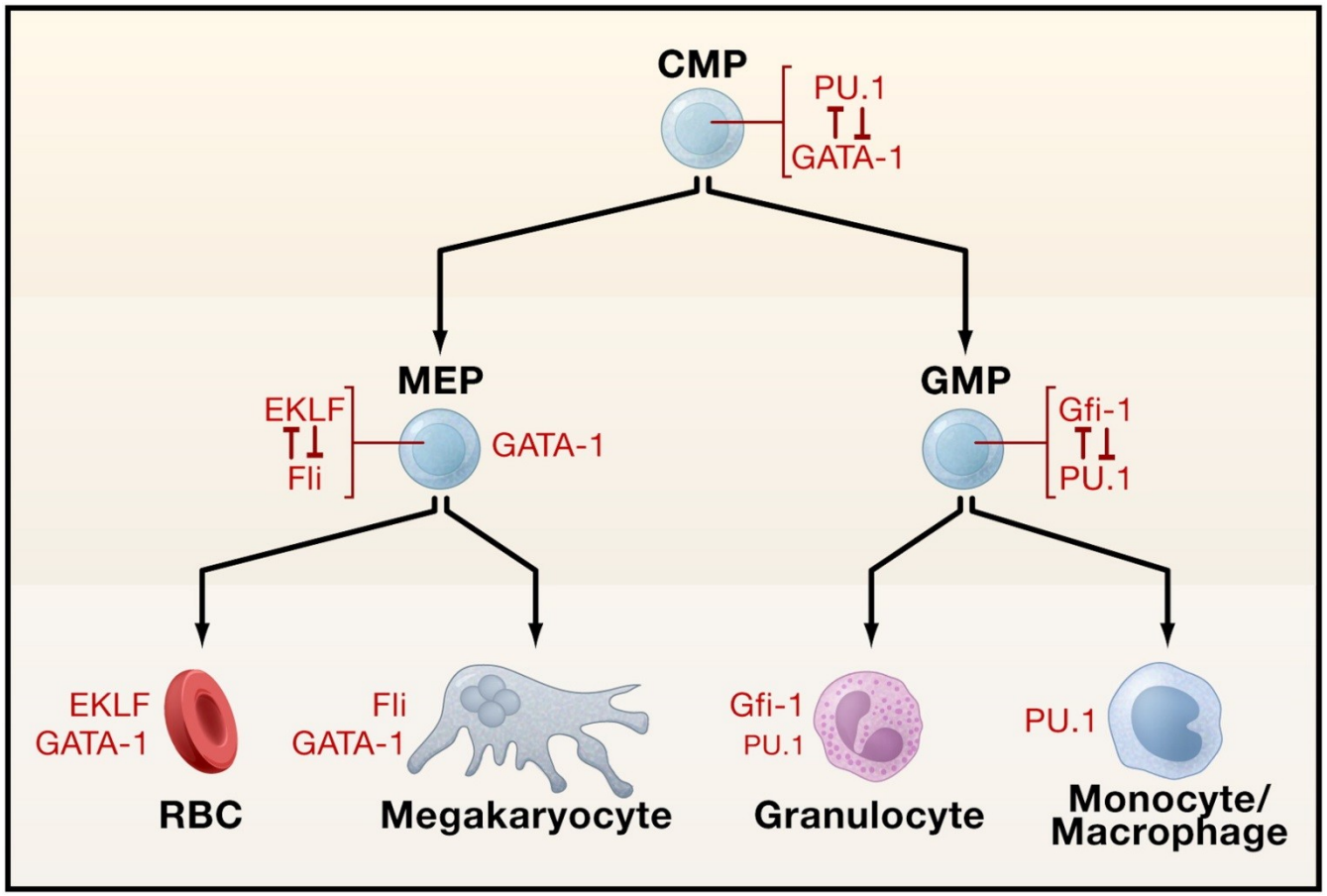
blood

Cytokiny působí v síti vzájemných interakcí



Antagonismus transkripčních faktorů v liniové determinaci

Common myeloid progenitor (CMP)
Megakaryocyte-erythroid progenitor (MEP)
Granulocyte-macrophage progenitor (GMP)



Imunofenotypizace

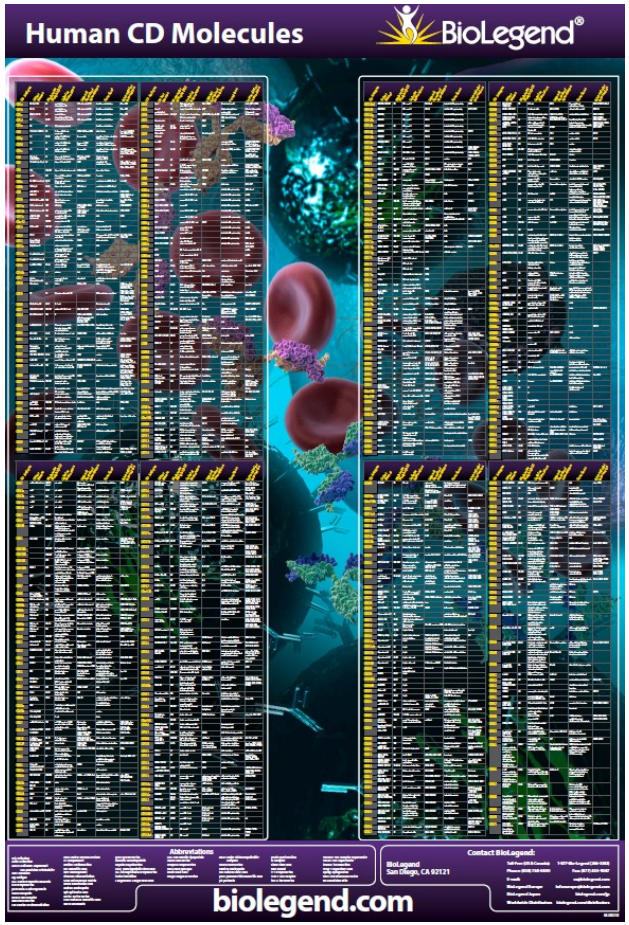
- **stanovení zastoupení jednotlivých subpopulací krevních elementů** (primárně leukocytů) na základě exprese vybraných **povrchových antigenů**, případně v kombinaci s intracelulární produkcí cytokinů a expresí intracelulárních antigenů.

CD („Cluster of Differentiation“)

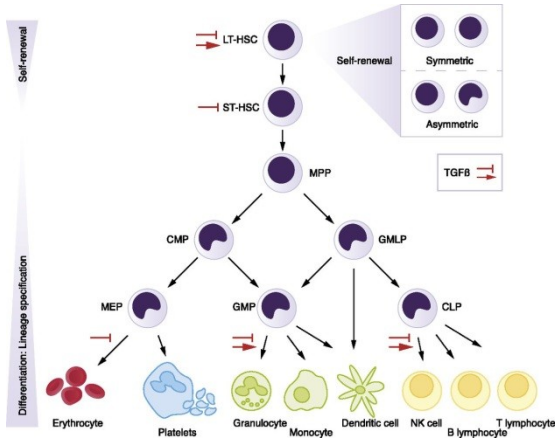
- **systém označení povrchových molekul leukocytů.** Soubor povrchových molekul (znaků, antigenů) buněk mající stejný epitop, který lze identifikovat stejnou protilátkou.
- Pojí se s určitými funkcemi a vlastnostmi buňky. Většina CD má proto alternativní názvy vztahující se k jejich funkci nebo struktuře.
- Využívají se pro rozpoznávání buněčných populací při imunofenotypizaci.
- Dodnes definovány CD1 až CD350. Některá CD jsou skupinami příbuzných molekul – jednotlivé molekuly se pak označují písmeny (např. CD62L, CD62P, CD62E)

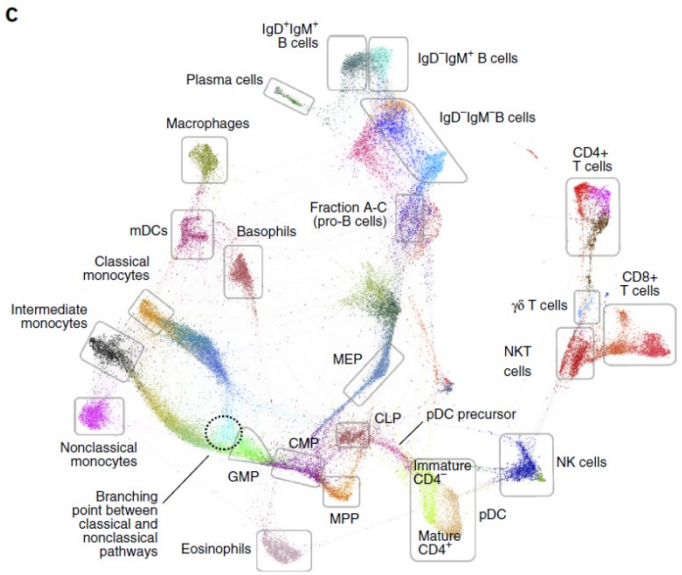
CD molekuly

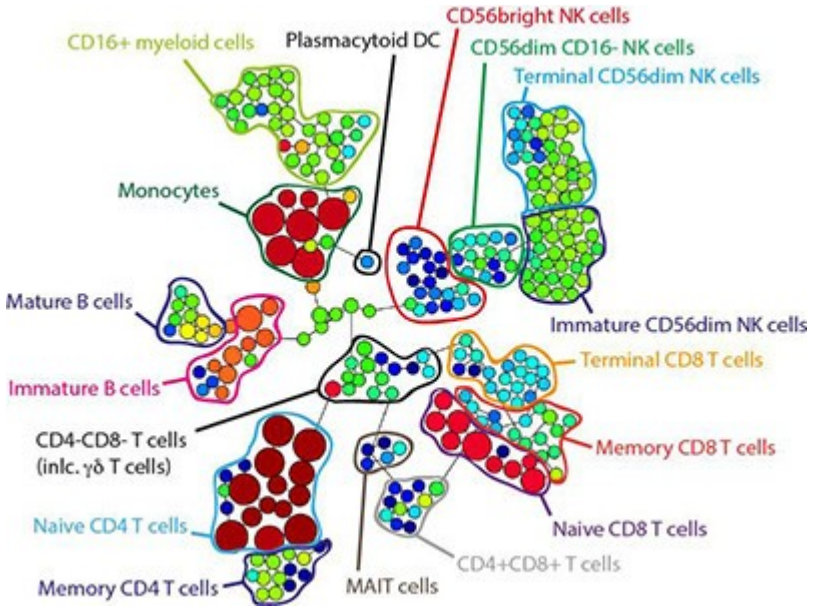
- https://www.biolegend.com/cell_markers
- http://www.hcdm.org/



The hematopoietic hierarchy – novel approaches

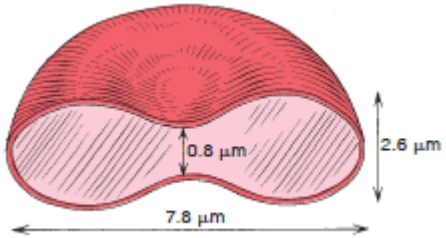


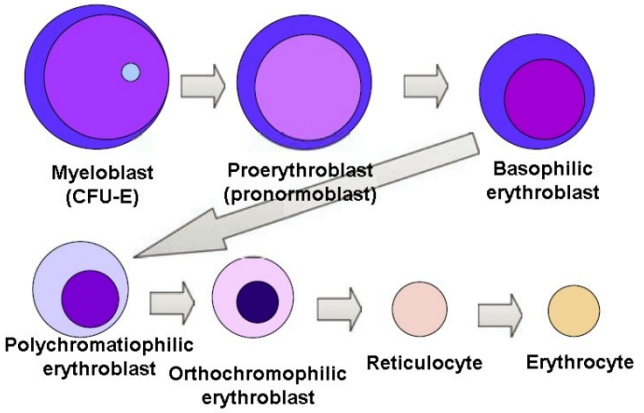




Erytrocyty

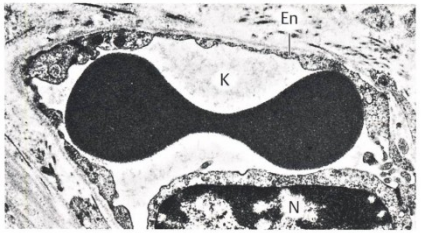
- Buňky (bikonkávní disky, 7,5 μm) bez jádra a dalších organel (u savců), malé kondenzované jádro a organely u ptáků plazů, obojživelníků a ryb
- Vnikají z jaderných prekurzorových buněk
- Obsahují hemoglobin, 95% všech proteinů erytrocytu
- Vývoj v kostní dřeni cca 8 dní
- Doba života cca 120 dní
- Staré erytrocyty likvidovány makrofágy v kostní dřeni, v játrech a slezině

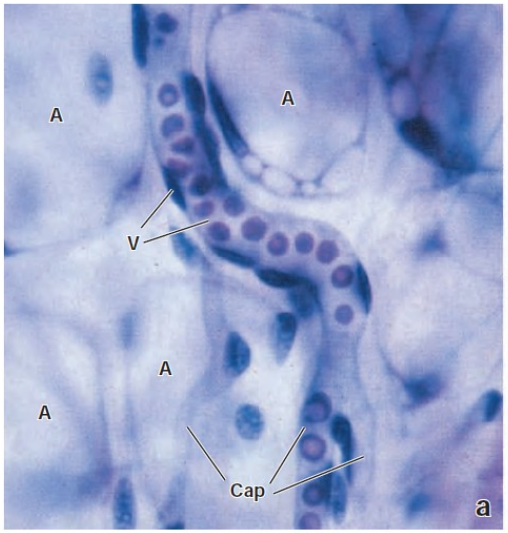


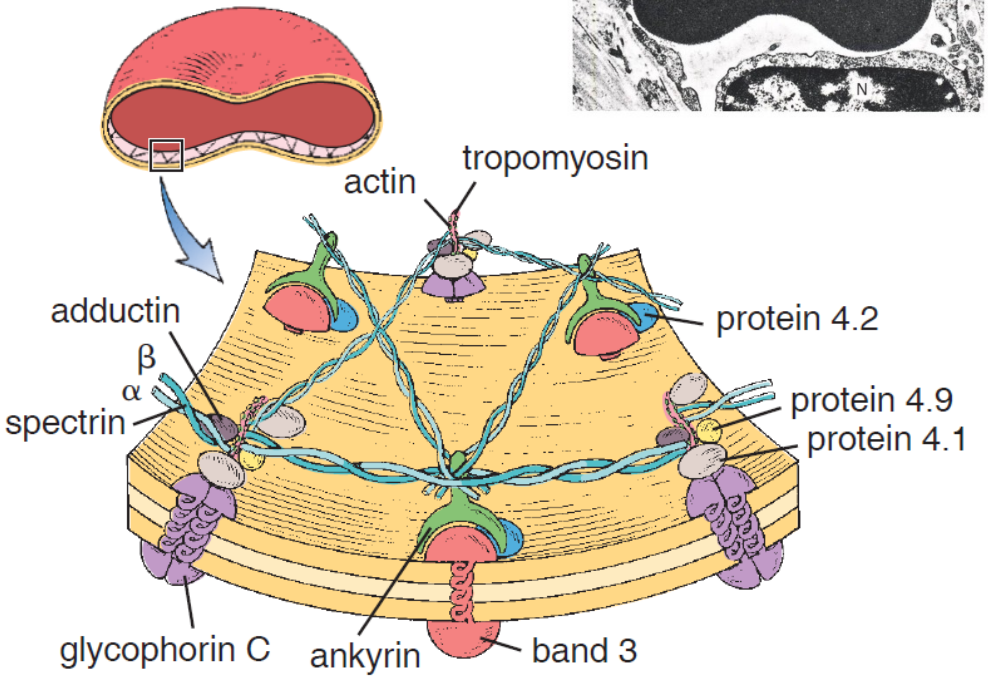


Membránová organizace erytrocytu

- Plochá síť filament spektrinu propojena krátkými filamenty aktinu je ukotvena pomocí adaptorových proteinů k membráně
- Jsou pasivně tvarovatelné, důležité pro prostupnost kapilárami, stárnoucí buňky ztrácí flexibilitu

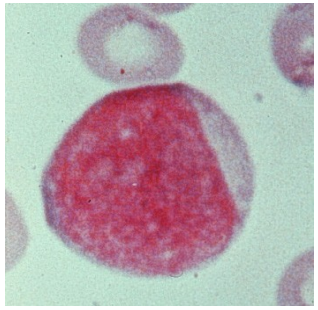




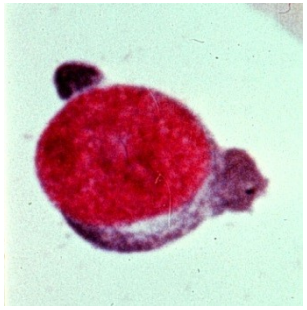


Vývojová stádia erytrocytů

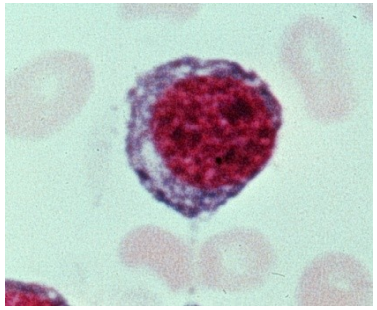
kmenová buňka



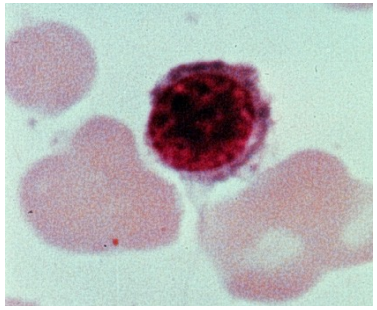
proerytroblast (pronormoblast)



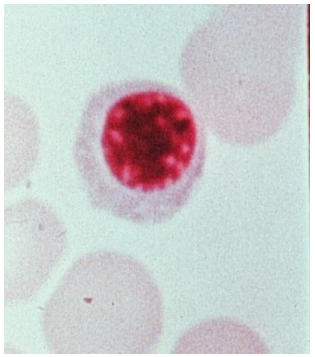
basofilní erytroblast



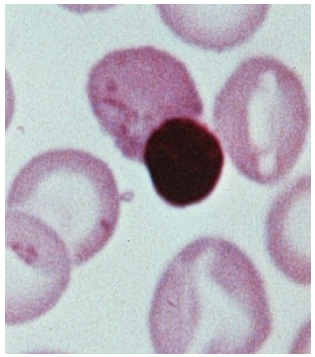
polychromatofilní erytroblast



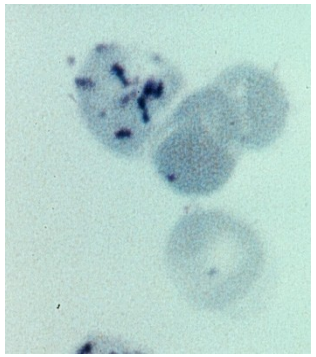
ortochromatofilní erytroblast (normoblast, metaerytroblast)



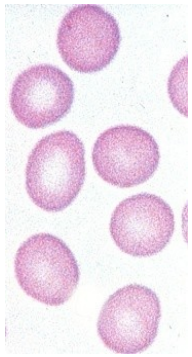
ortochromatofilní erytroblast extrudující jádro



reticulocyt (polychromatofilní erytrocyt)



zralý erytrocyt

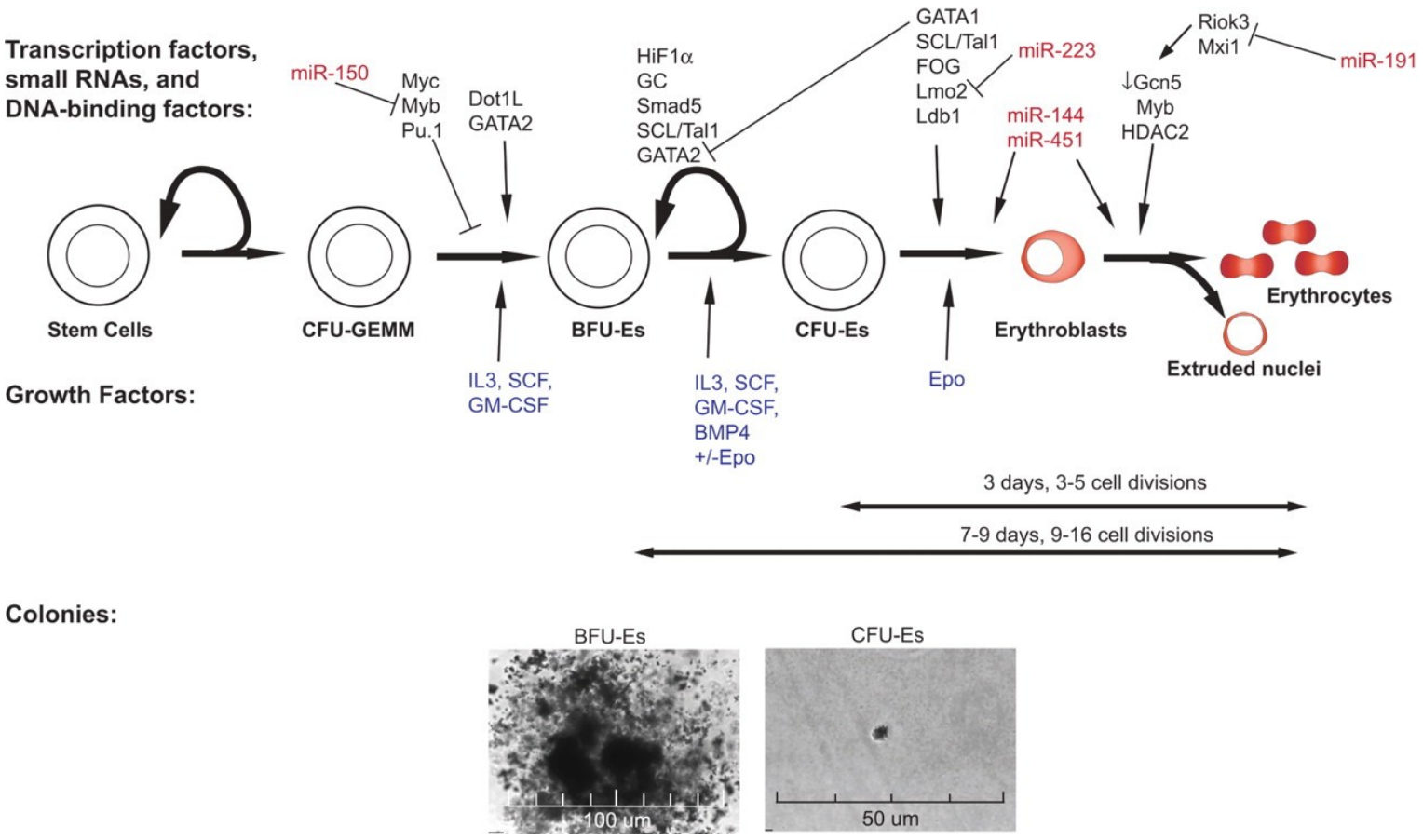


http://www.mcl.tulane.edu/

Regulace erytropoézy

- Obecné faktory
  - hypoxie –> erythropoietin (embryogeneze - játra, po narození v peritubulárních buňkách kortexu ledvin)
  - růstové faktory, hormony (testosteron vs. estrogeny)
  - vitamíny
- Maturační faktory
  - Vitamin B 12
  - Folic acid
- Faktory nezbytné pro produkci hemoglobinu
  - Vitamin C – napomáhá absorbci železa (Fe+++ - Fe++)
  - Proteiny – aminokyseliny pro syntézu globinu
  - Železo a měď pro syntézu hemu
  - Vápník, kobalt, nikl

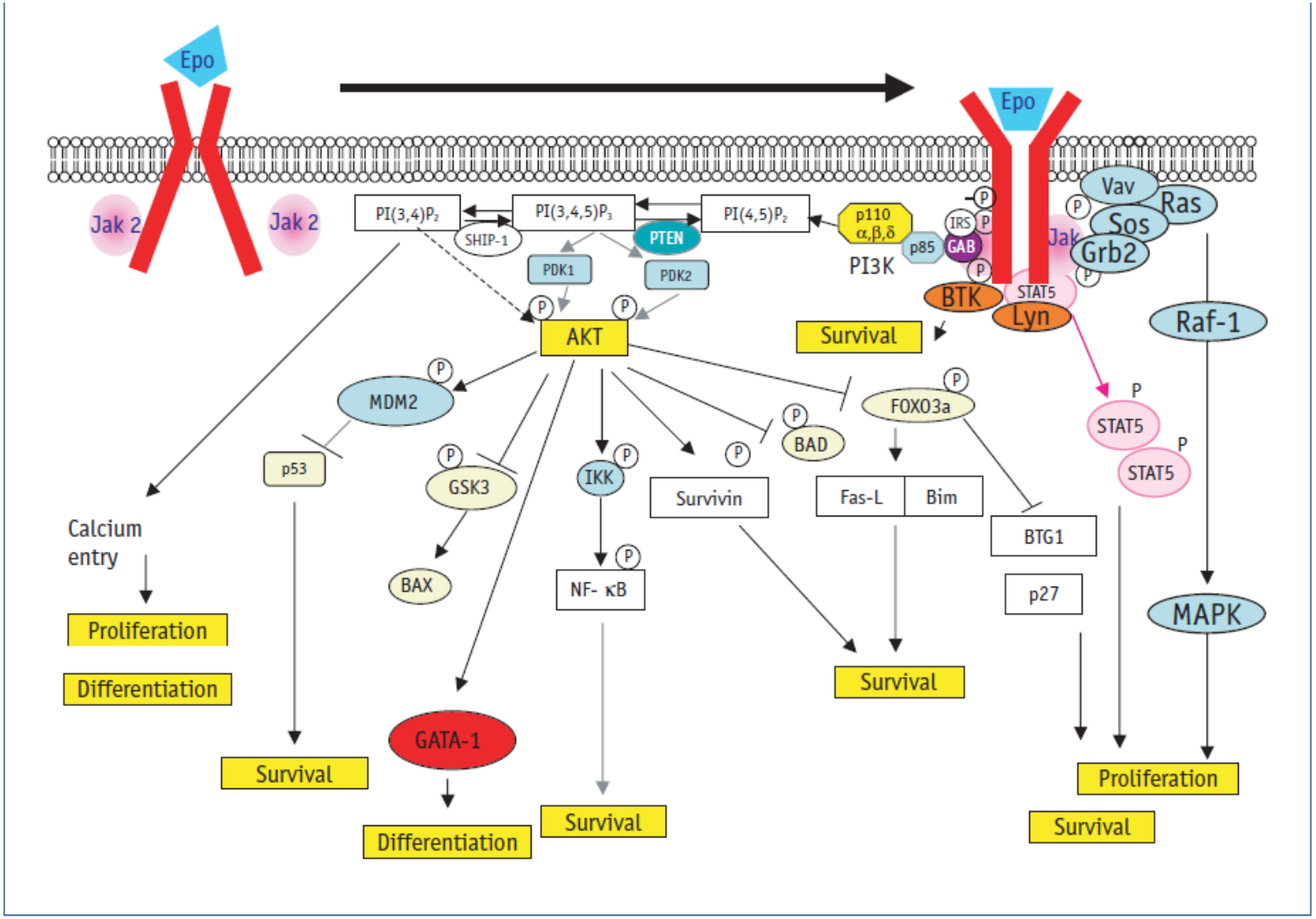
Regulace erytropoézy



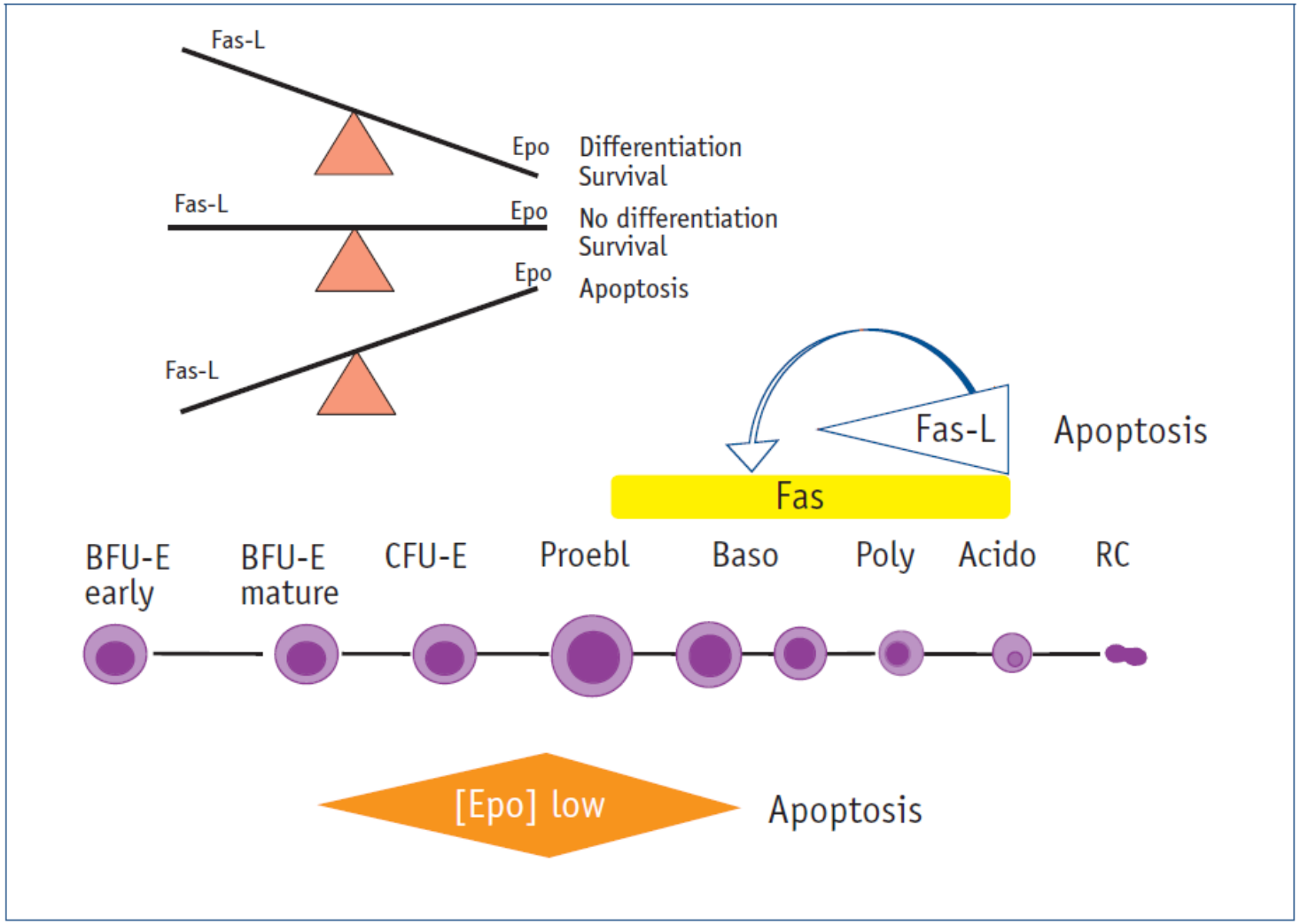
Shilpa M. Hattangadi et al. Blood 2011;118:6258-6268

blood

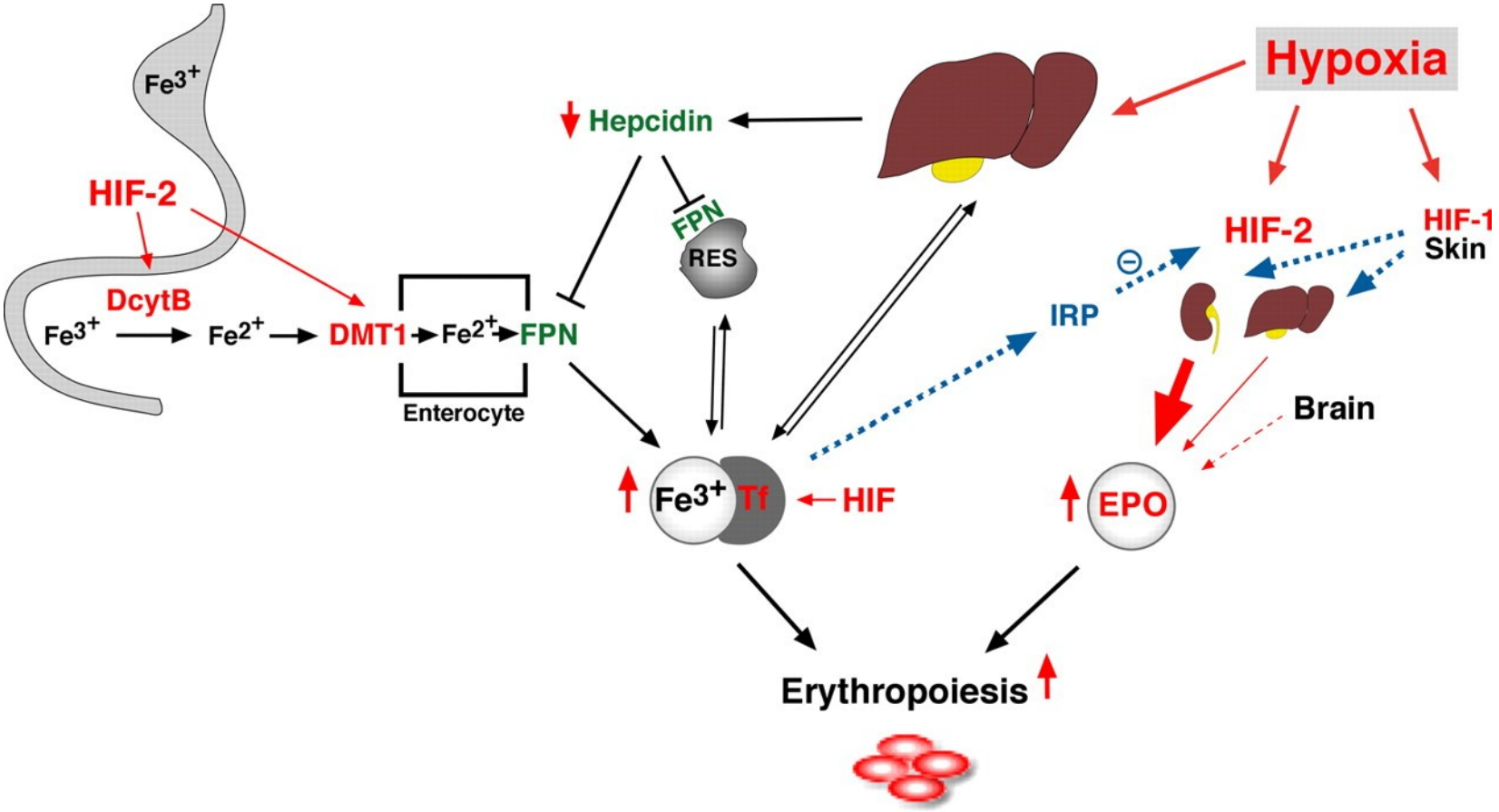
Erytropoéza a EpoR



Regulace erytropoézy



Hypoxie koordinuje syntézu EPO s metabolismem železa



Volker H. Haase Am J Physiol Renal Physiol 2010;299:F1-F13

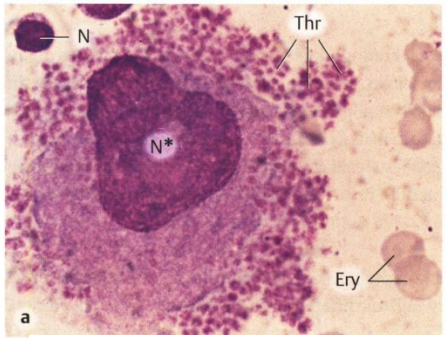
©2010 by American Physiological Society

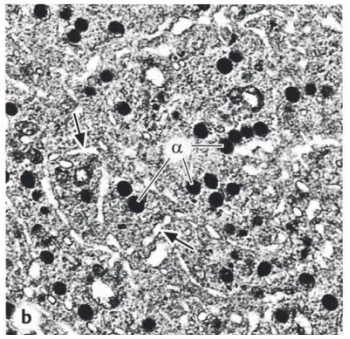
AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY
Renal Physiology

Trombocyty

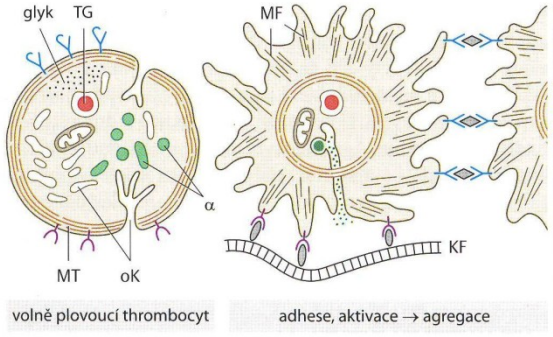
- Krevní destičky, 250 tis./ul
- Klíčová role při srážení krve
- Bejzaderné fragmenty megakaryocytů
- postupné zvětšování buňky jako výsledek tzv. endomitóz (replikace chromosomů bez rozdělení jádra)
- vznik obrovské polyploidní buňky (až 64 sad chromosomů) – megakaryocytu (až **150 µm**)
- vznik cytoplazmatických granul
- odštěpování fragmentů (trombocytů) z periferie (až 8 000 z jedné buňky)
- stadia: megakaryoblast, promegakaryocyt, megakaryocyt

- V cirkulaci cca 10 dní, likvidace makrofáfy sleziny

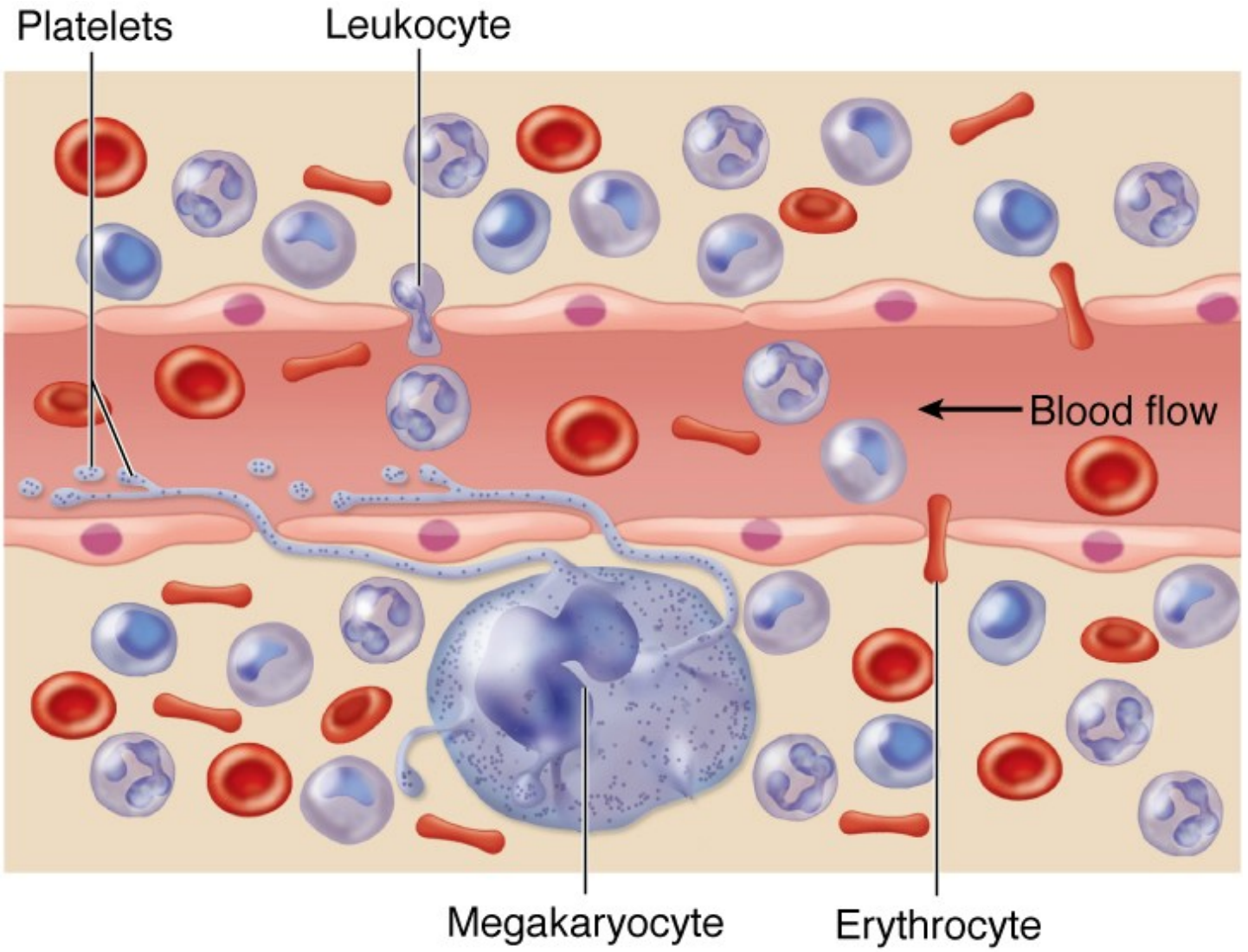




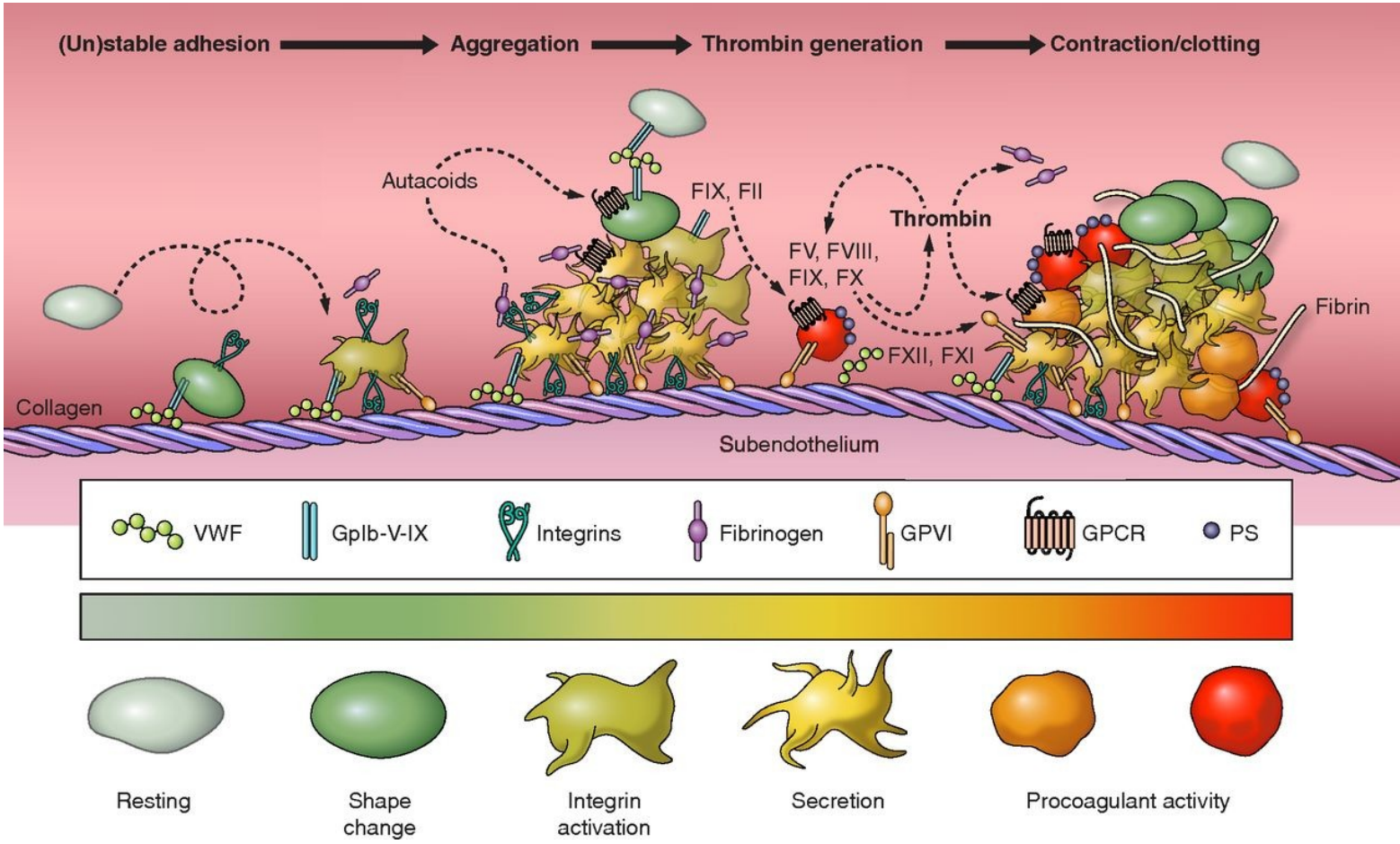
- Tvar bikonvexního disku, 2,5µm
- Tvar udržován mikrotubuly
- Na membráně receptory pro adhezi
- Obnažený kolagen při poranění cévy vyvolá adhezi - > aktivace, vytvoření pseudopodií a uvolnění granul



Trombocyty


Platelets
Leukocyte
Blood flow
Megakaryocyte
Erythrocyte

Aktivace a adheze trombocytů



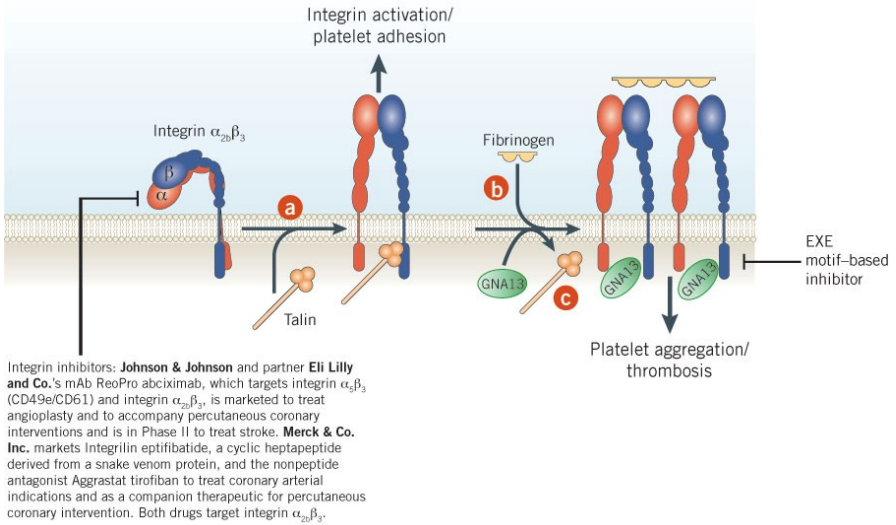
Henri H. Versteeg et al. Physiol Rev 2013;93:327-358

©2013 by American Physiological Society

Physiological Reviews

Trombolýza

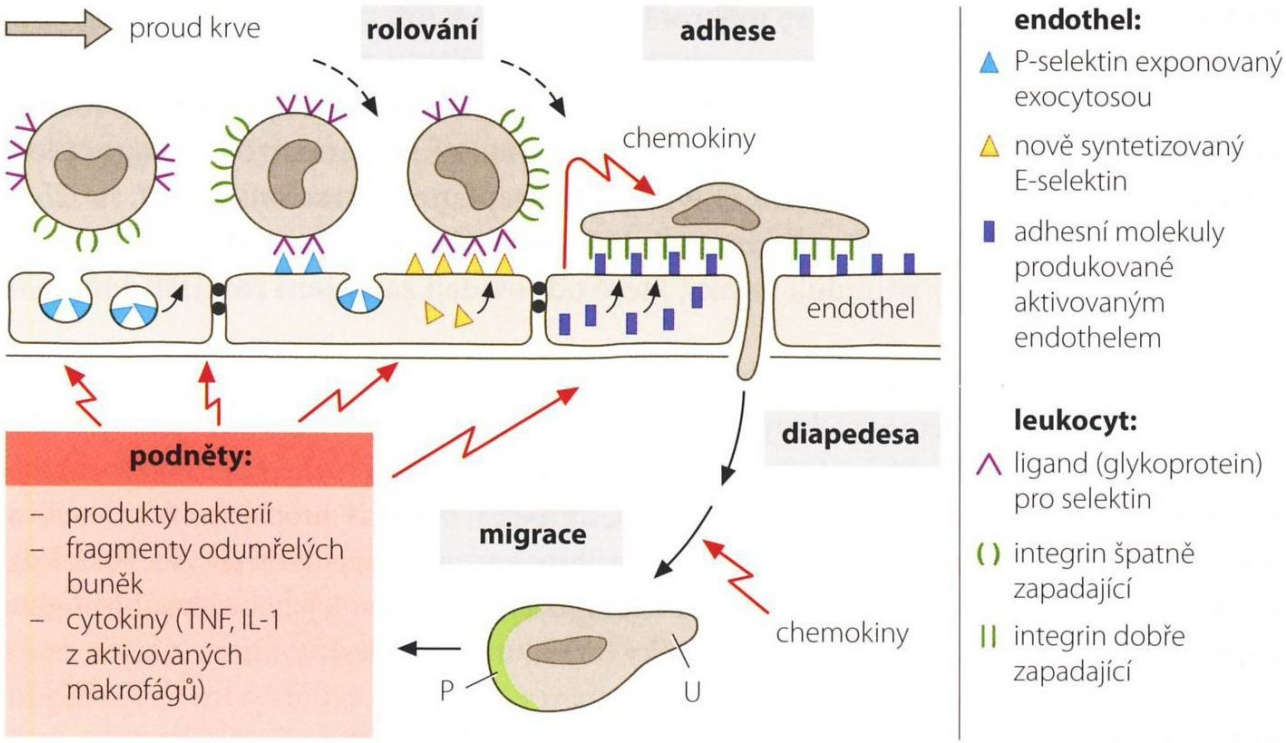
- léčebný proces, který má za cíl rozpuštění krevní sraženiny vzniklé v některé cévě (trombus), nebo zanesené do místa uzávěru krevním tokem z jiného místa (embolus)
- Aplikace látek která rozpouští krevní sraženiny, např. rekombinantních aktivátorů plazminogenu
- používá v akutních stavech, kdy je nutné sraženinu rozpustit rychle a účinně - ischemická mozková mrtvice, tepenný uzávěr na dolní končetině a klinicky se projevující masivní plicní embolie



Integrin inhibitors: **Johnson & Johnson** and partner **Eli Lilly and Co.**'s mAb ReoPro abciximab, which targets integrin $\alpha_5\beta_3$ (CD49e/CD61) and integrin $\alpha_{2b}\beta_3$, is marketed to treat angioplasty and to accompany percutaneous coronary interventions and is in Phase II to treat stroke. **Merck & Co. Inc.** markets Integrilin eptifibatide, a cyclic heptapeptide derived from a snake venom protein, and the nonpeptide antagonist Aggrastat tirofiban to treat coronary arterial indications and as a companion therapeutic for percutaneous coronary intervention. Both drugs target integrin $\alpha_{2b}\beta_3$.

Leukocyty

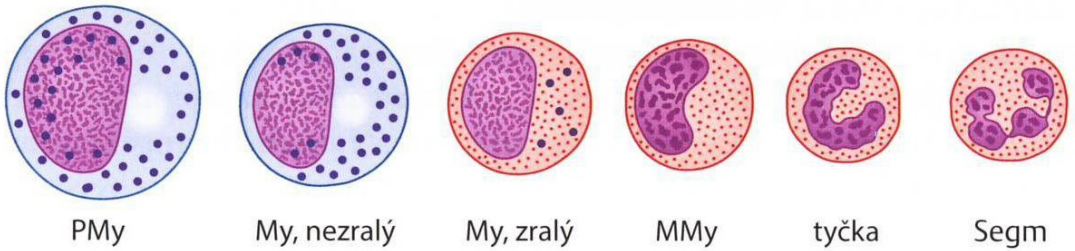
- Slouží k obraně organismu v **intersticiu**, 5 tis./ul krve
- Granulocyty, monocyty, lymfocyty
- Cirkulaci opouštějí po krátké době (kromě lymfocytů) a zůstávají v extravasálním prostoru



Granulopoéza

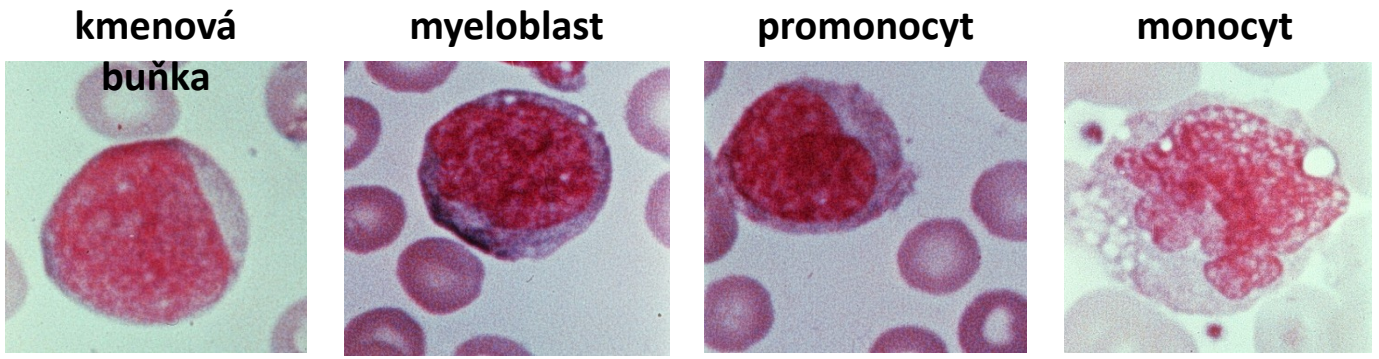
- **označení pro vývoj všech granulocytů (neutrofilních, eosinofilních a basofilních) nebo někdy jen vývoj neutrofilních granulocytů.**
- Počáteční prekurzory neutrofilních granulocytů jsou společné s monocyty. Na úrovni progenitorů GM-CFU se linie rozdělují.
- Granulocyty po dokončení diferenciace zrají v kostní dřeni a potom jsou uvolňovány do krevního řečiště. V případě zvýšené potřeby neutrofilů se uvolňují do krevního řečiště nezralé neutrofily – tyčky.
- Z krve migrují do různých tkání na základě stimulace chemotaktickými faktory.

CFU-G → MyBl → PMy → My, nezralý → My, zralý → MMy → tyčka → Segm			
procesy vývoje	proliferace (cca 4 mitosy) + diferenciace	diferenciace	krev / intersticium
trvání	cca 5 d	cca 3 d	< 1 d / 2–3 d



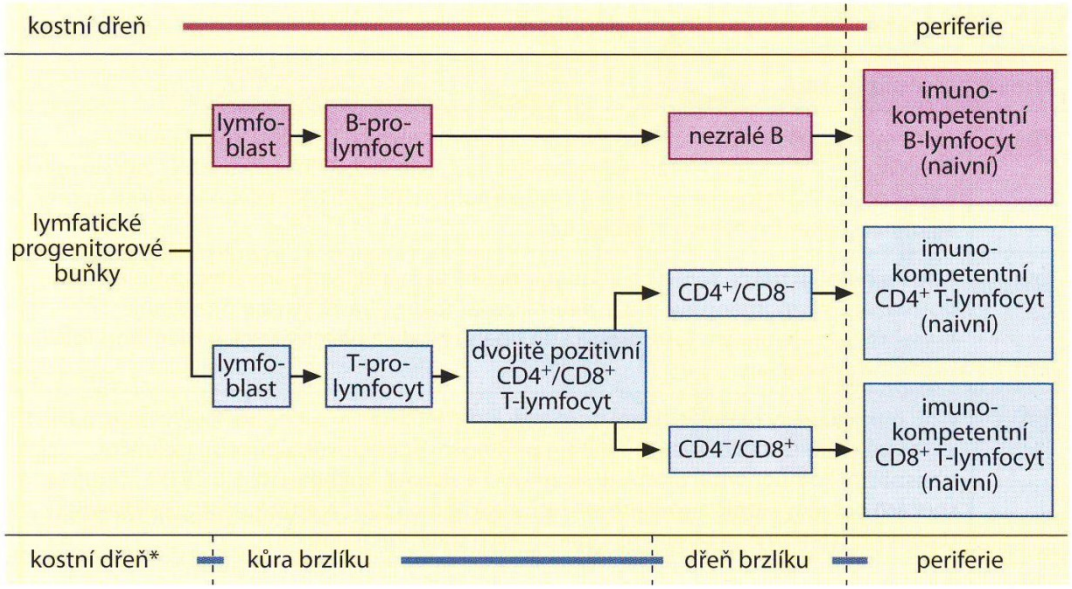
Monocytopoéza

- obtížná identifikace stadií v běžném krevním nátěru
- monoblast, promonocyt, monocyt (vývoj trvá přibližně 55 hod.)
- změna tvaru jádra
- vývoj azurofilních granul (GER, GA)
- zralé vstupují do krve, cirkulují 8 - 16 hod., pak vstupují do tkání a dozrávají v různé typy makrofágů, které mají obvykle životnost několik měsíců



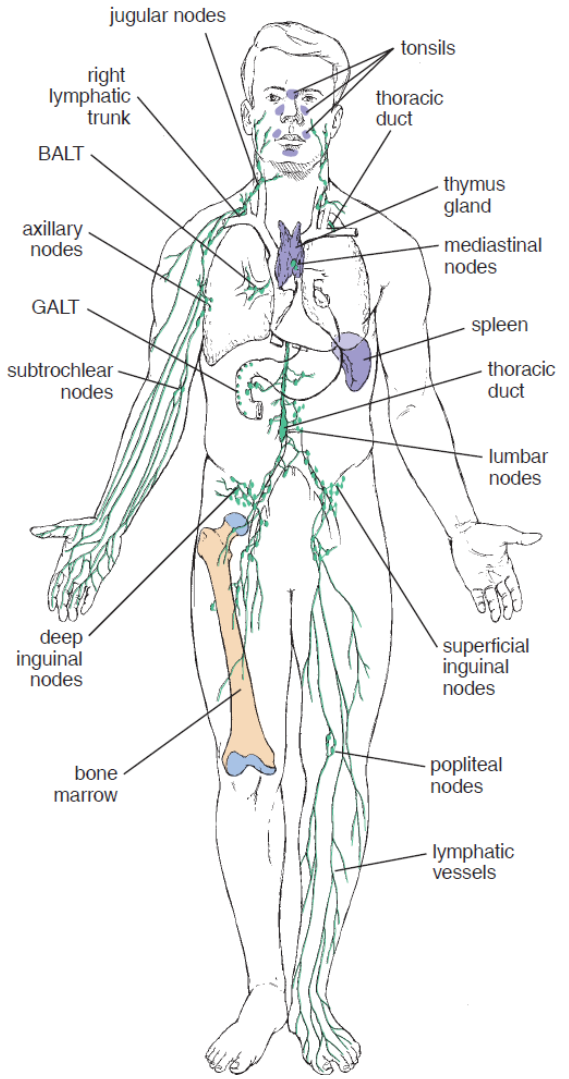
Lymfocytopoéza

- progenitory všech lymfocytů vznikají v kostní dřeni
- některé migrují do thymu, kde se diferencují v T-lymfocyty
- ty, které zůstávají v kostní dřeni, se diferencují v B-lymfocyty a migrují do periferních lymfatických orgánů, kde se dále mohou množit (lymfatické uzliny, slezina)
- stadia: lymfoblast → 2-3 dělení → prolymfocyt (nemá ještě povrchové antigeny) → dělení → lymfocyt



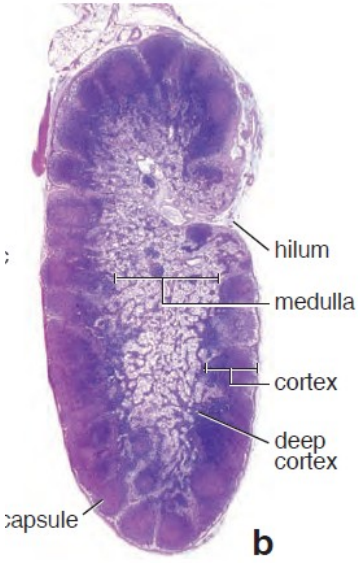
Lymfatické orgány

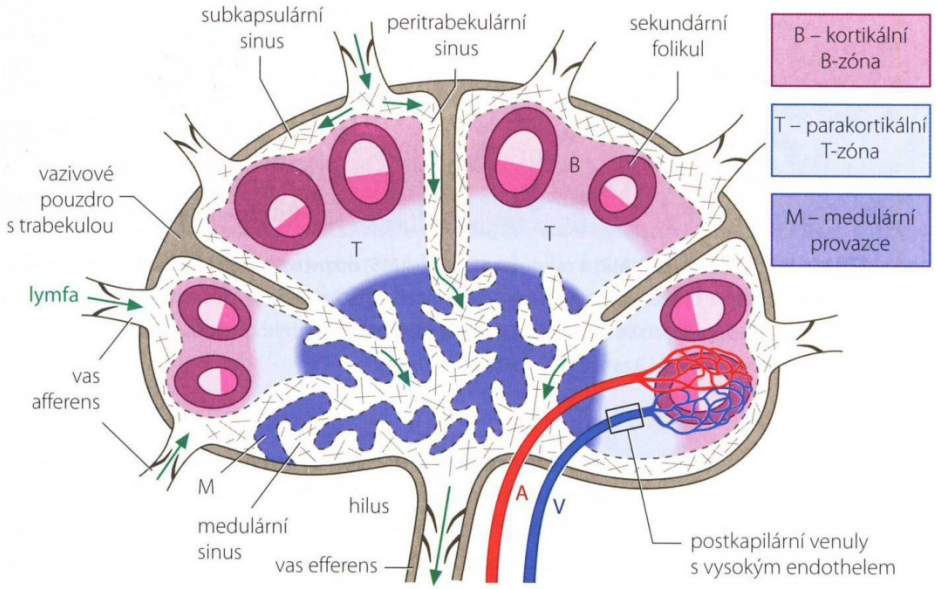
- Primární
  - Kostní dřeň
  - Thymus (brzlík)
- Sekundární
  - Mízní uzliny
  - Slezina
  - Slizniční lymfatická tkáň (MALT)
  - Tonsily (mandle)
  - Peyerovy pláty
  - …



Lymfatické uzliny

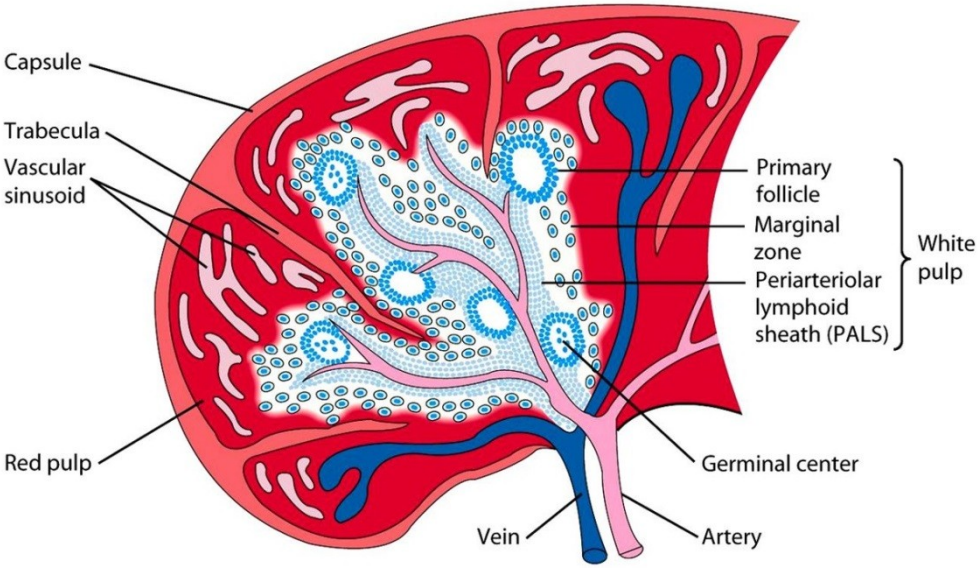
- Řetězec filtračních jednotek v systému lymfatických cév
  - vkleslina = hilus, vstup artérií, nervů, výstup vén, lymfatických cév
  - na povrchu – pouzdro = capsula – husté kolagenní vazivo → trabekuly
  - podkladem - retikulární vazivo (retikulární buňky, retikulární vlákna, základní amorfní hmota)
  - Kůra, cortex, B-zóna
  - Parakortikální oblast, T-zóna
  - Dřeň, medulla
- Kapilární prostory, lymfatický sinus, vystlány endoteliálními buňkami
- V případě aktivace zůstávají lymfocyty v uzlině, proliferují a diferencují do efektorových buněk
- Neaktivované cirkulují, 5 mil. buněk/min vstupuje z krve do sekundárních lymfoidních orgánů

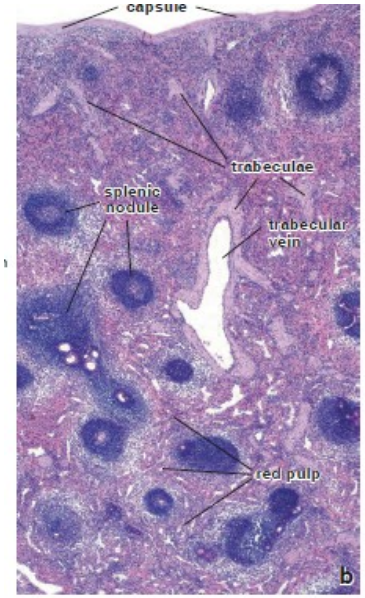




Slezina

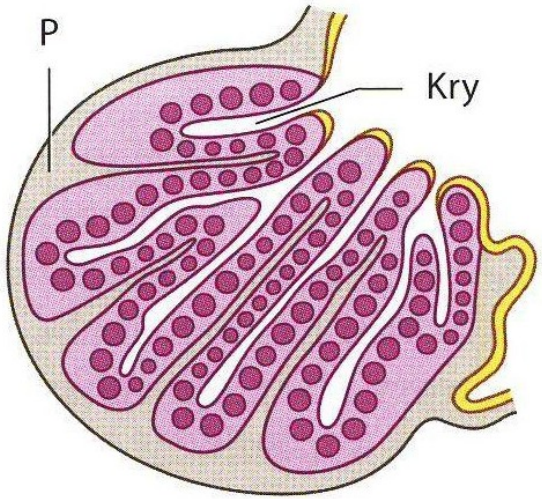
- Filtrační a imunitní orgán v krevním oběhu
- Funkce
  - Odstranění zestárlých a poškozených erytrocytů
    - Červená pulpa (vazivové retikulum protkané venózními sinusy)
    - Makrofágy pohlcují fagocytované erytrocyty – recyklace
      - Hemové železo navázáno na ferritin, transport pomocí transferinu do erytropoetických buněk
      - Z hemu vzniká bilirubin, v komplexu s albuminem transportován do jater, v konjugaci s kys. glukuronovou vyloučen z jater ve žluči
  - Sekundární lymfoidní orgán
    - Bílá pulpa, systém lymfatických folikulů (B- lymfocyty, folikulární dendritické buňky)

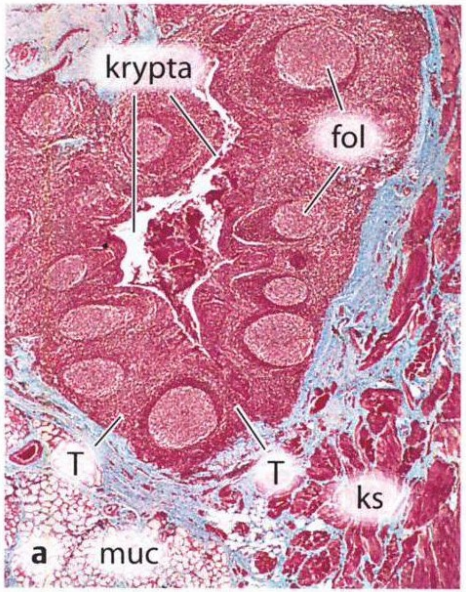




Slizniční lymfatická tkáň

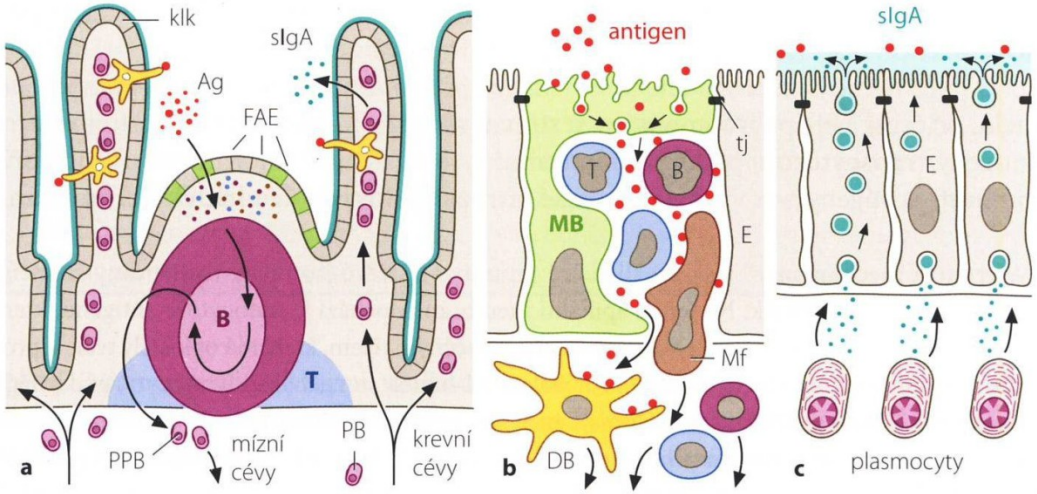
- Patrová mandle
  - Povrch tvořen nerohovějícím epitelem, rozbrázděn do cca 20ti krypt
  - Krypty obsahují epiteliální buňky, leukocyty, mikroorganismy
  - Pod kryptami – sekundární lymfatické folikuly – B-dependentní oblast
  - Interfolikulární zóna – T-dependenntní oblast





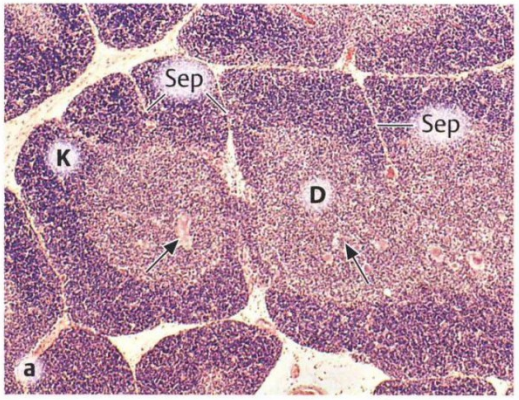
Slizniční lymfatická tkáň

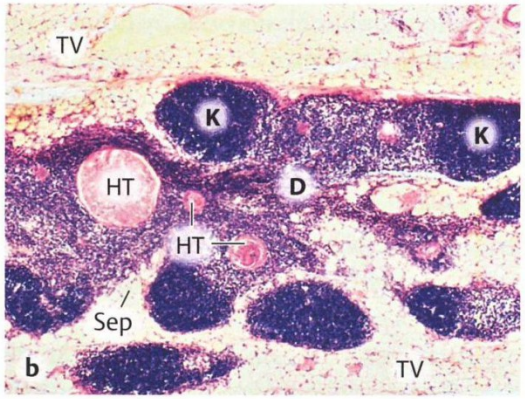
- Lymfatická tkáň střevní sliznice (MALT, Mucosa-associated lymphoid tissue)
  - Shlukováním lymfatických folikulů v některých částech trávicí trubice vznikají Peyerovy pláty
  - B dependentní oblast – folikul, T-dependentní zóna vyplňuje interfolikulární oblasti
  - Povrh epitelu nad folikulem (FAE) neobsahuje mucinózní vrstvu (nebo jen tenkou), chybí klky a pohárkové buňky
  - M-buňky bez mikroklků, dochází na nich k endocytóze antigenů
  - Enterocyty transportují protilátky transcytózou
    - Protilátky IgA jsou tvořeny subepitelovými plasmatickými buňkami
    - IgA spolu se sekretem exokrinních žláz vážou antigeny a mikroorganizmy – shlukování a opsonizace
    - IgA i v mateřském mléce – pasivní imunizace trávicího a dýchacího traktu kojence



Thymus, brzlík

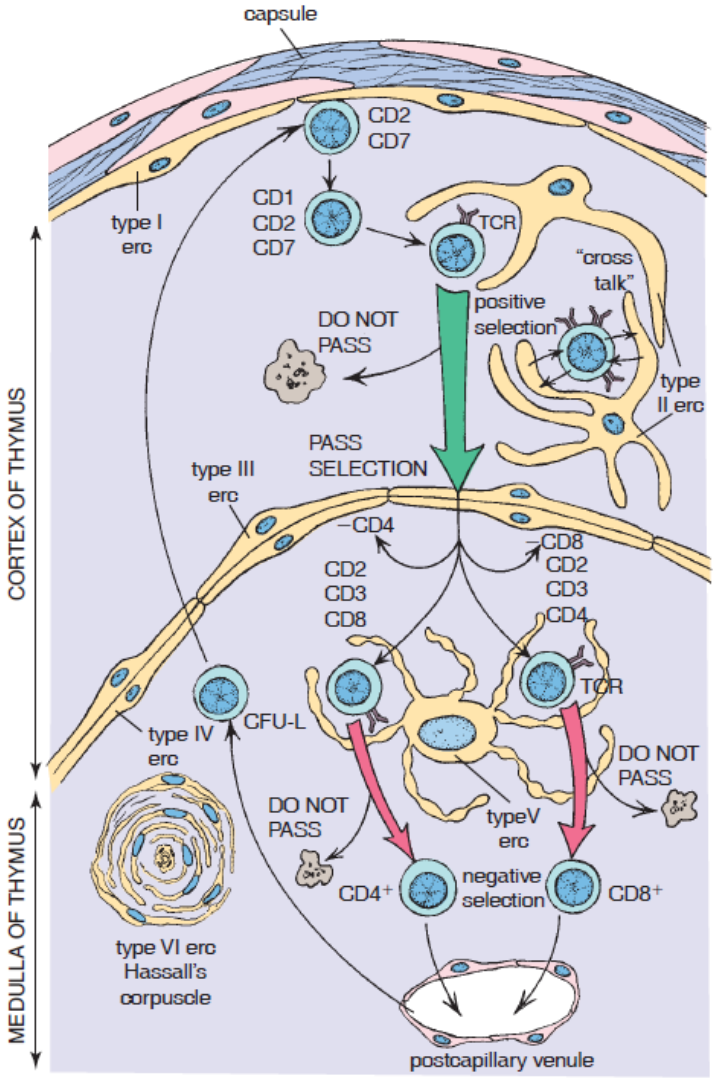
- Umístěn v mezihrudí, za sternem před perikardiem
- Maxima rozvoje dosahuje v dětství (cca 20-30g)
- S koncem puberty rychlá involuce, zůstavují jen rezidua v tukovém vazivu
- Primární lymfatický orgán systému T-buněk, tvořen retikulárním epitelem (rozvětvené, navzájem spojené buňky, mezi kterými je tkáňový mok)
- V časném fetálním období je osídlen prekursory T-lymfocytární linie – thymocyty
- Vyzrávání imunokompetentních T-lymfocytů pod vlivem diferenciačních faktorů a kontaktu s retikulárním epitelu thymu, autotolerance





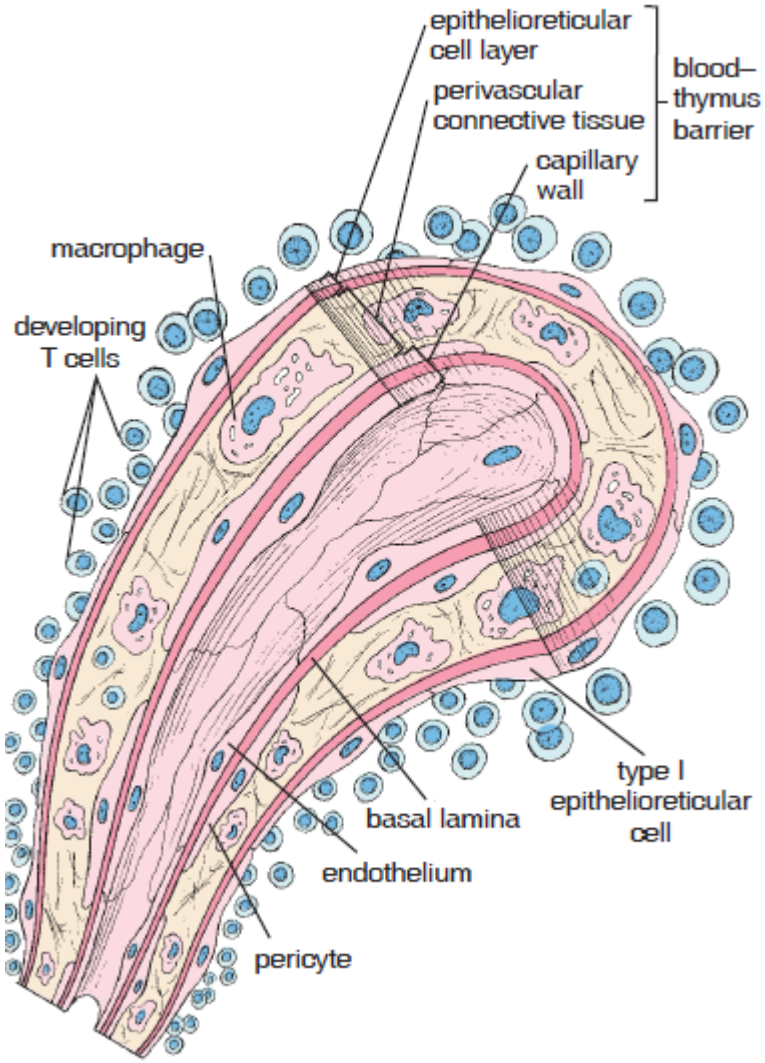
Thymus, brzlík

- Retikulární epitelové buňky – obsahuji CK vlákna, jsou spojeny desmosomy,
- Vrstva u kortexu – obaluje thymocyty – ‚pečovatelské‘ buňky
- vytváří trojrozměrnou síť osídlenou thymocyty
- Podílí se na pozitivní a negativní selekci T-buněk
- Hassalova tělíska – podoba eosinofilních agregátů (jejich počet a velikost roste s věkem)

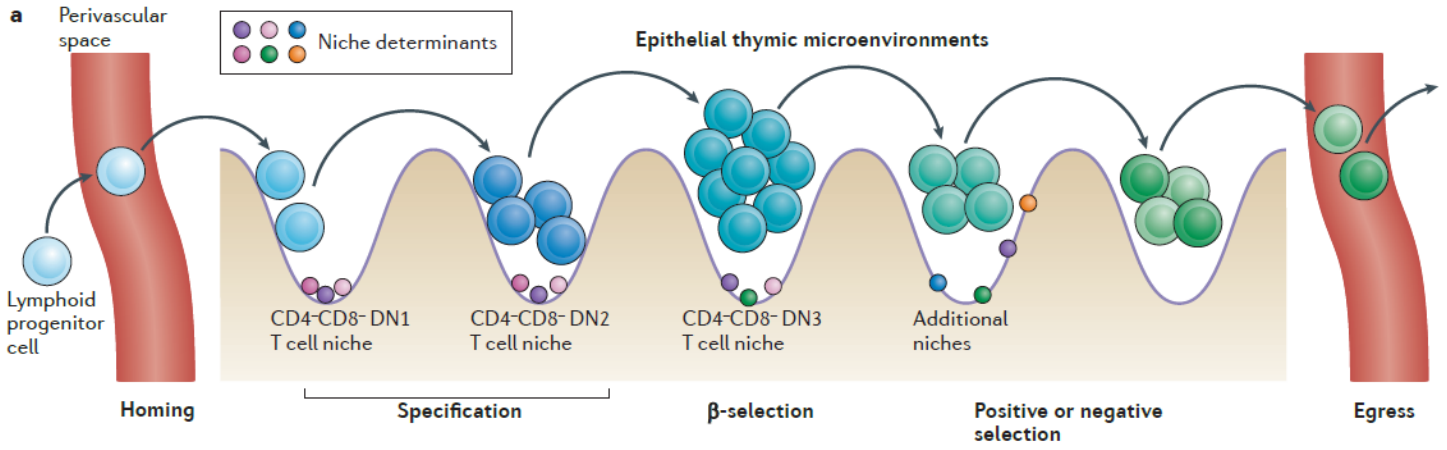


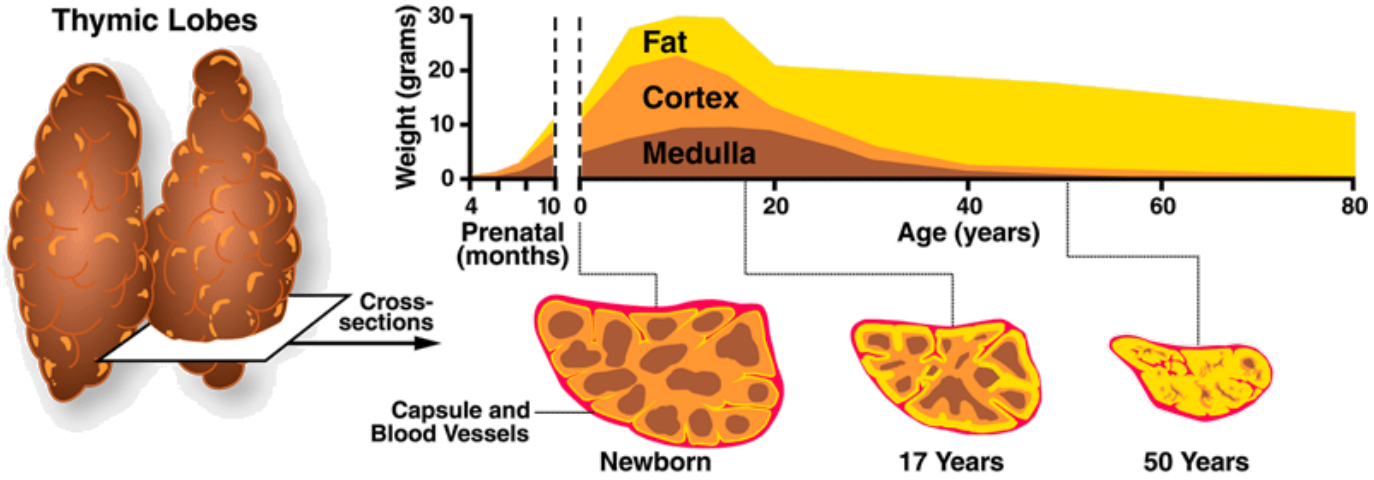
Hemothymová bariéra

- ochraňuje T lymfocyty před antigeny cirkulujícími v krvi
  - souvislá endotelová výstelka kapilár
  - BL endotelu (perikapilární prostor) - vazivo + perivaskulární makrofágy fagocytují malá množství materiálu, který pronikne cévní stěnou)
  - BL retikulárního epitelu
  - perivaskulární hraniční membrána
- HTB je vyvinuta v kůře, chybí ve dřeni

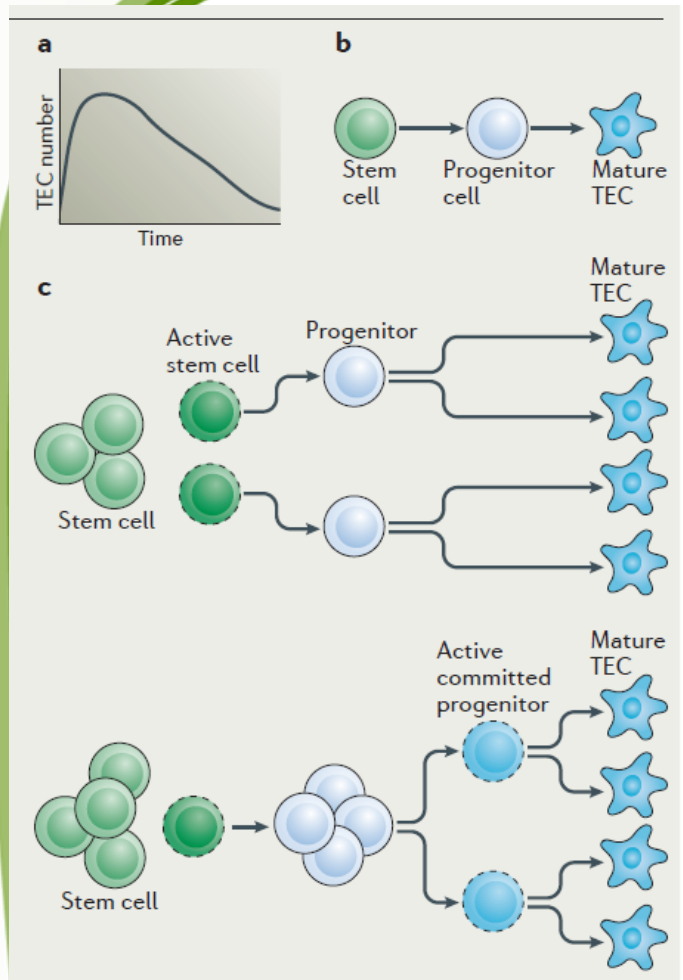


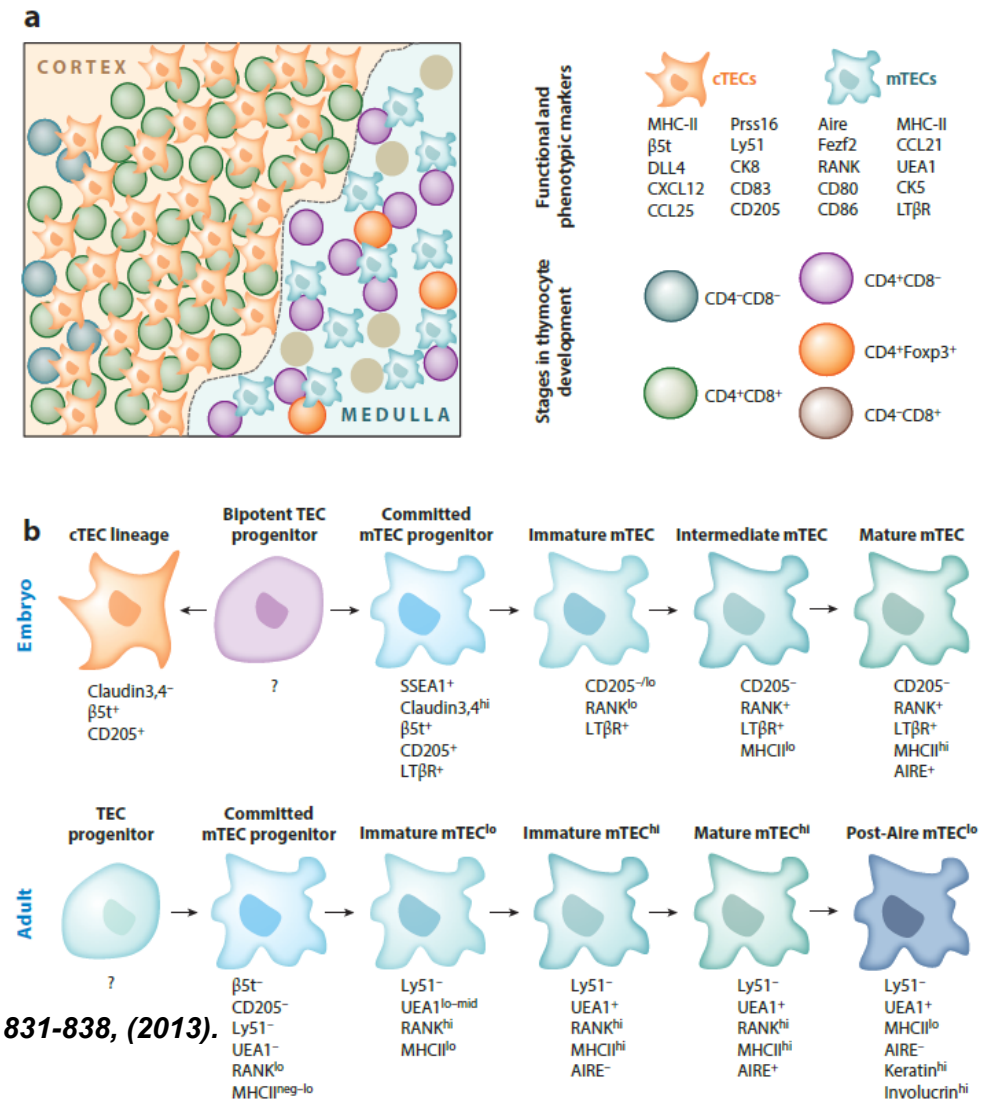
Involuce thymu





Epitel thymu





Boehm, T. *et al. Nat Rev Immunol* ***13, 831-838, (2013).***

Shrnutí

- Krev představuje tkáň s vysokou mírou sebeobnovy,
- krvetvorba je hierarchicky organizována,
- je precizně řízena prostřednictvím mezibuněčných interakcí a signalizací prostřednictvím solubilních faktorů – cytokinů,
- všechny zralé krevní buňky vznikají z hematopoetické kmenové buňky jejíž funkce ovlivňuje prostředí v nice kmenové buňky v kostní dřeni.

Literatura

- Histologie, Renate Lullmann-Rauch, GRADA, 2012
- Histology – A Text and Atlas, M. H. Ross. W. Pawlina, Wolters Kluwer, 2011
- GUIDE to GENERAL HISTOLOGY and MICROSCOPIC ANATOMY, Petr Vaňhara, Miroslava Sedláčková, Irena Lauschová, Svatopluk Čech, Aleš Hampl, Published by Masaryk University, ISBN 978-80-210-8453-7
- Atlas fyziologie člověka, S. Stefan, D. Agamemnon, Grada, 2016