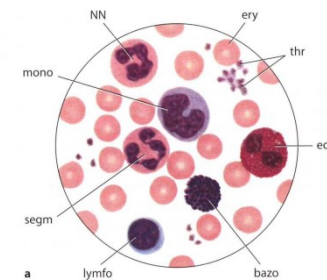


Krvetvorba, systém krevních buněk a krvetvorné orgány; principy diferenciace

Karel Souček

Krev – složení a funkce

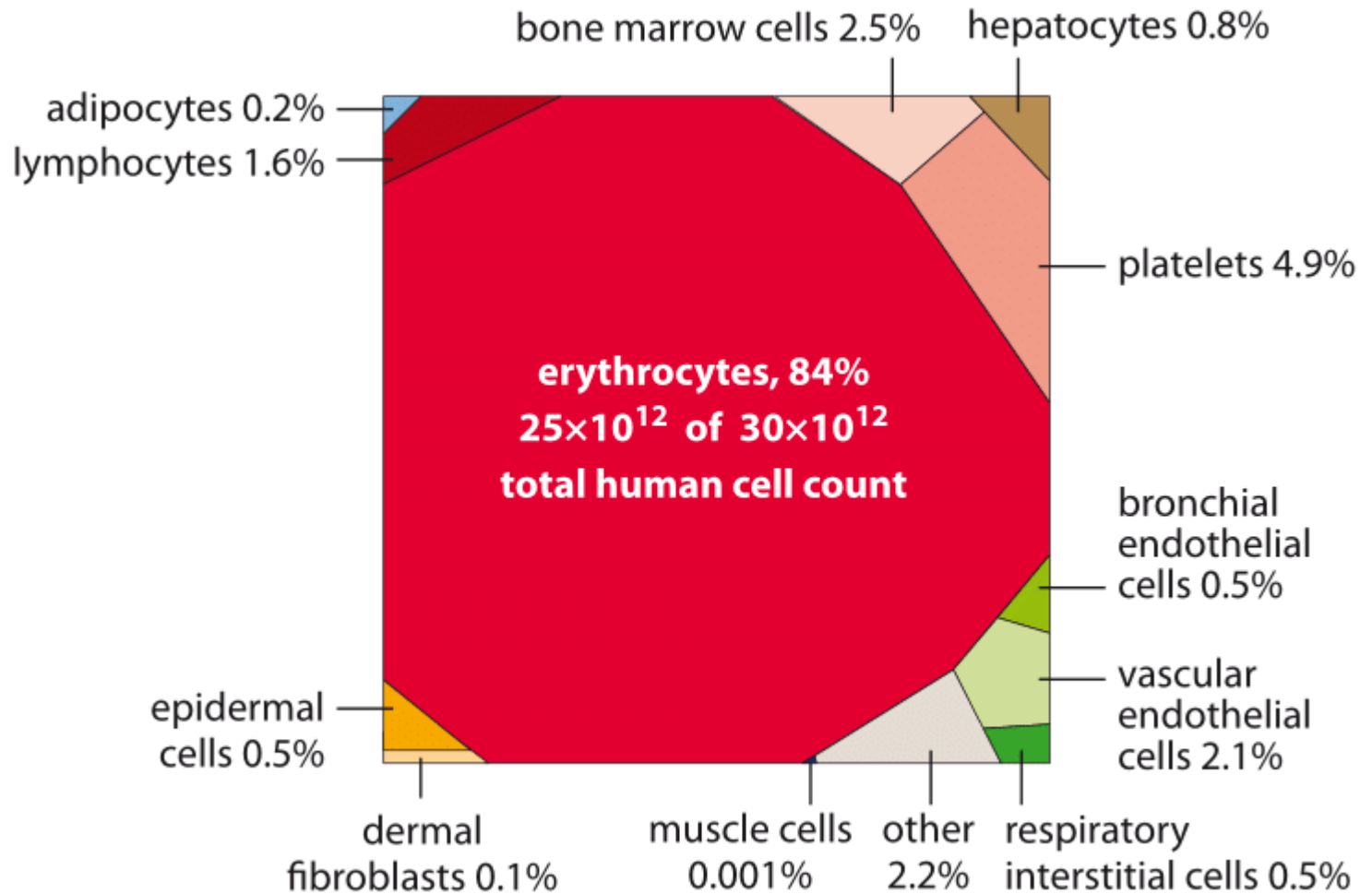
- Suspenze buněk v roztoku obsahujícím proteiny a elektrolyty (krevní plazma)
- Slouží pro transport plynů, výživných a odpadních látek, hormonů a dalších regulátorů
- Množství krve u dospělého člověka je ~ 4,5 - 5 litrů (6-8% celkové hmotnosti)
- ~ 40% objemu krve jsou buňky
 - Erythrocyty – transport 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
blood Neutrophils	1-5 days	101940
white blood cells Eosinophils	2-5 days	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
platelets	10 days	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
blood B cells (mouse)	4-7 weeks	107910
trachea	1-2 months	101940
hematopoietic stem cells	2 months	109232
sperm (male gametes)	2 months	110319, 110320
bone osteoblasts	3 months	109907
red blood cells	4 months	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

Jaký podíl našeho těla tvoří krevní buňky?



Jaký podíl našeho těla tvoří krevní buňky?

Typ buňky	Počet/ μ l 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 (μ l = mm^3)

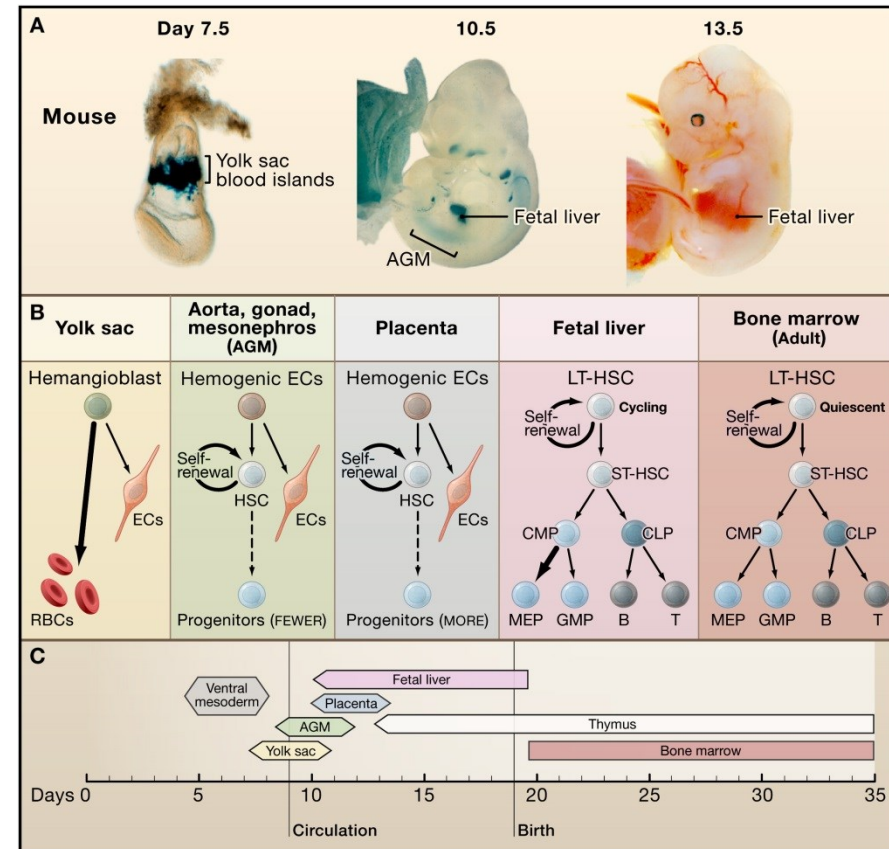
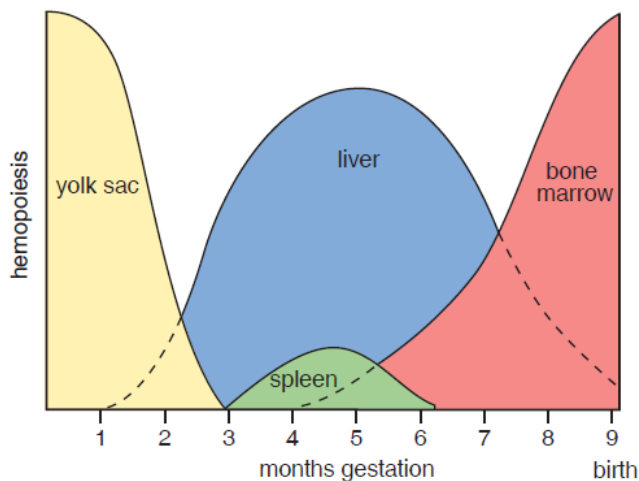
** doplněno podle hodnot uváděných v ČR

Hematopoéza

- **proces tvorby krevních buněk proliferací a diferenciací jejich prekurzorů**
- Produkce dostatečného množství krevních buněk vyžaduje
 - proliferaci buněk mitotickým dělením
 - diferenciací 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)

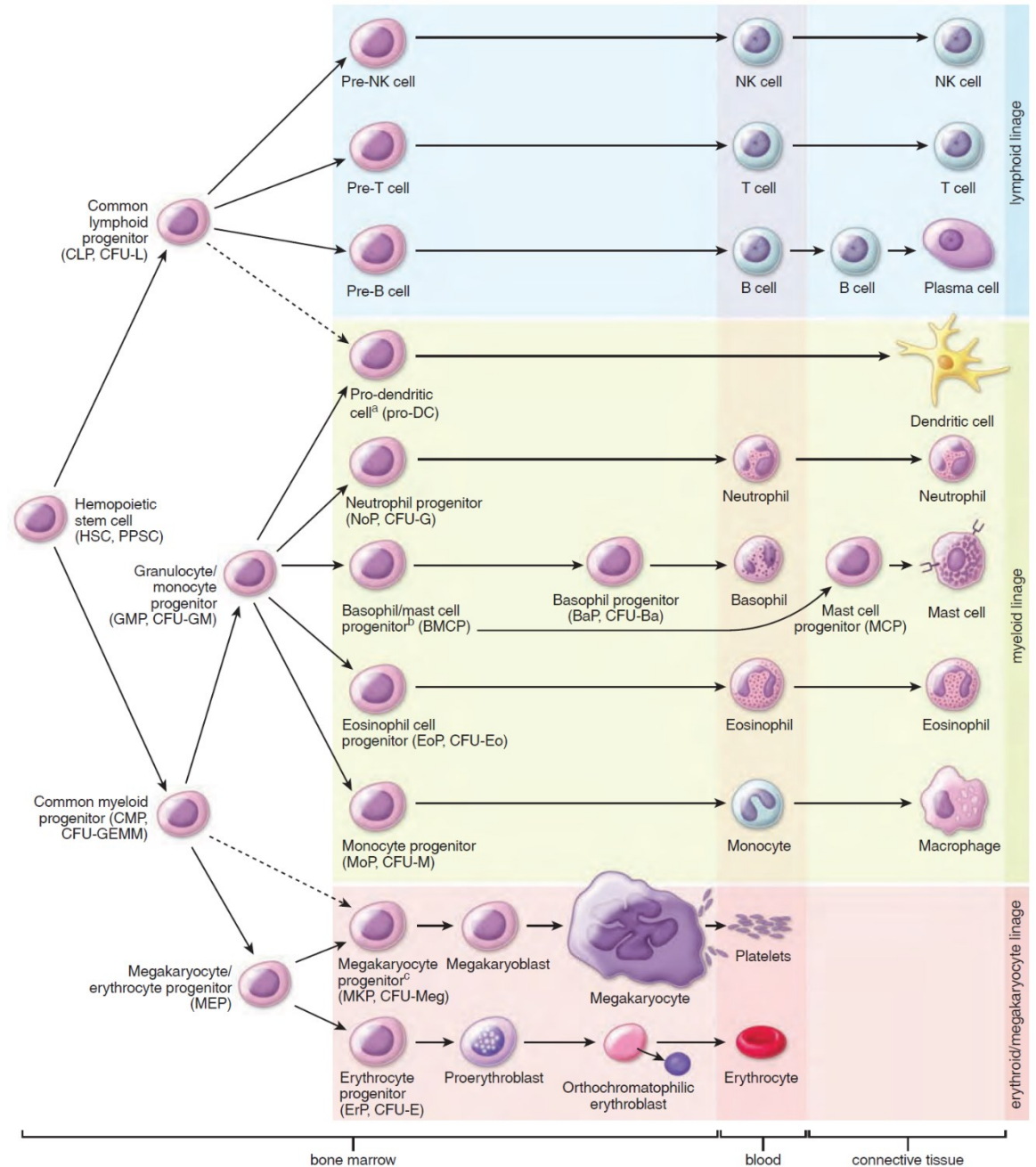
Větvě hematopoézy

Lymphoidní:

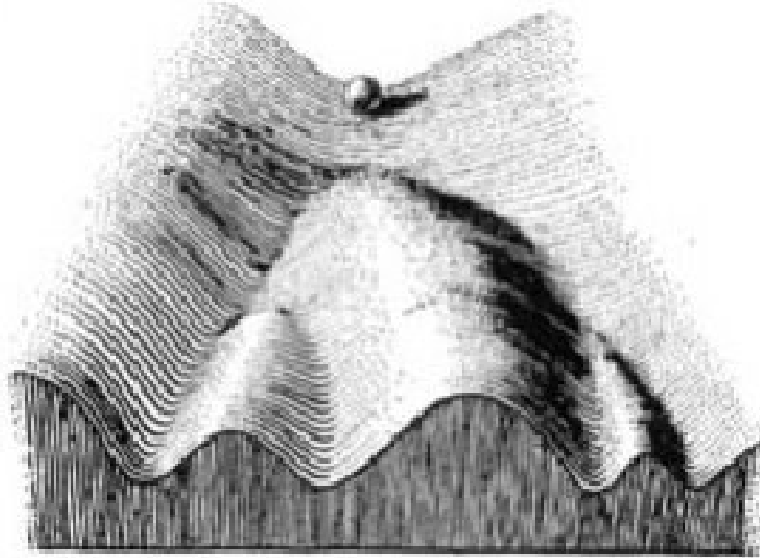
produkce T lymfocytů
produkce B lymfocytů

Myeloidní:

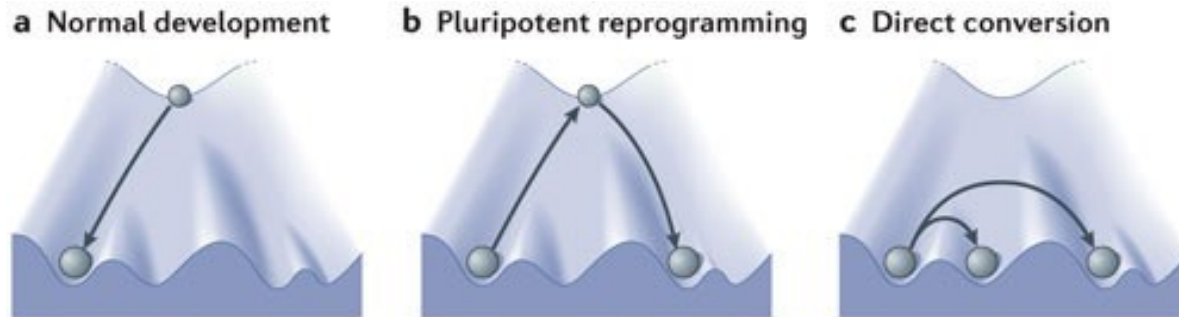
erythropoéza
monocytopoéza
granulopoéza
(eosinopoéza, basopoéza)
trombocytopoéza



Buněčná plasticita



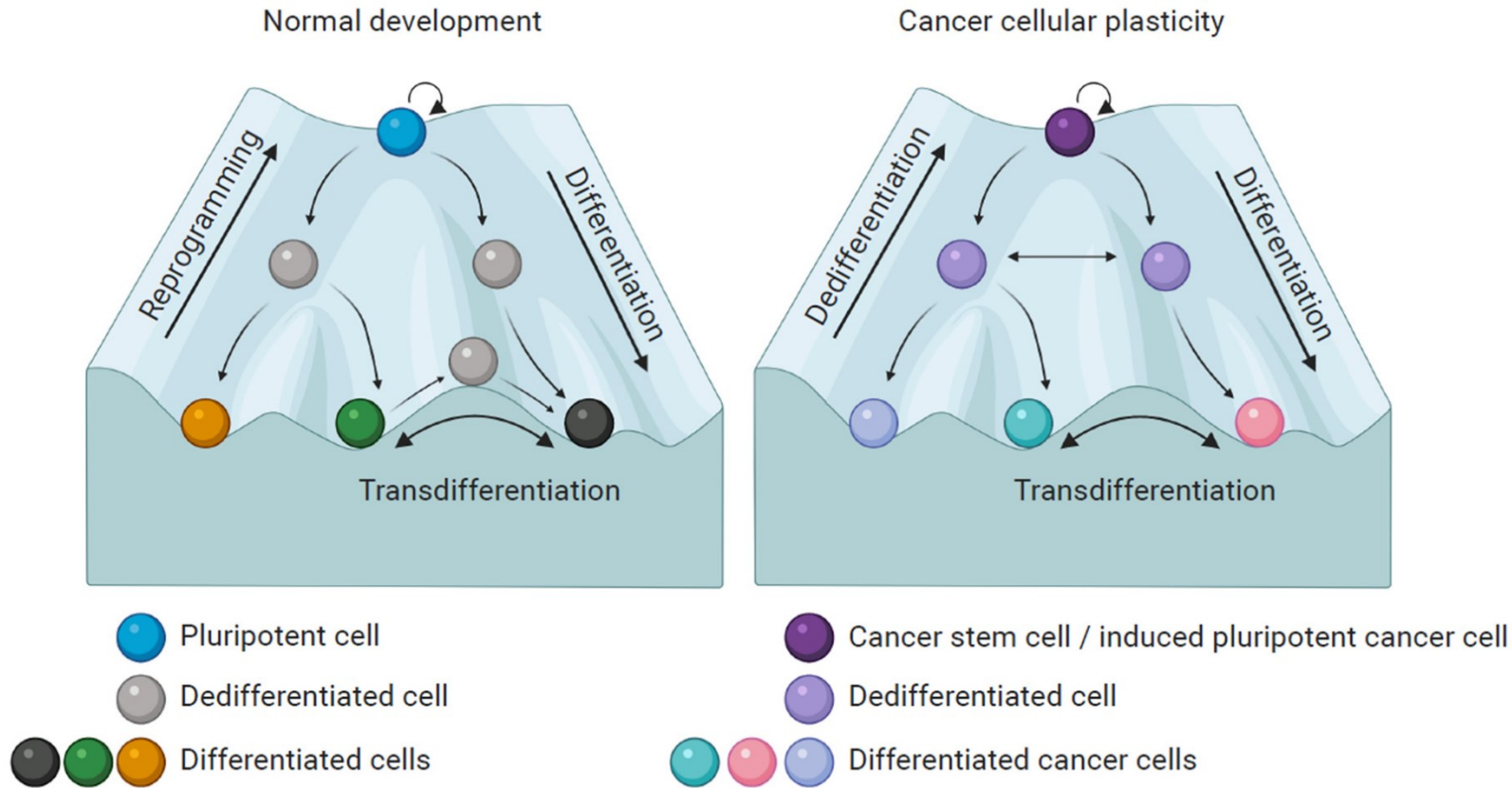
1957, Conrad Waddington



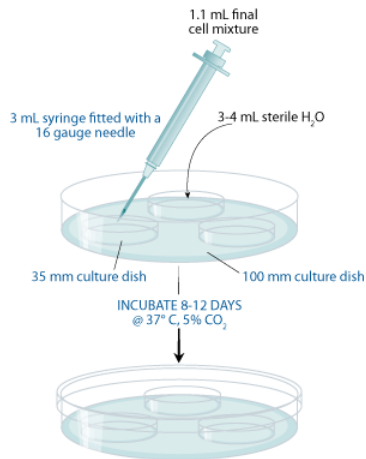
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

<https://www.nature.com/articles/nrm3543/figures/1>

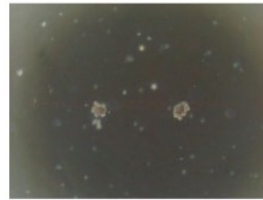
Buněčná plasticita



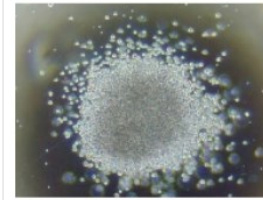
Charakterizace hematopoetických kmenových a progenitorových buněk - Colony Forming Cell (CFC) Assay



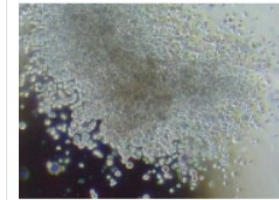
Colony Types



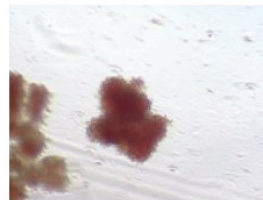
CFU-E (Colony forming unit-erythroid): Clonogenic progenitors that produce only one or two clusters with each cluster containing from 8 to approximately 100 hemoglobinized erythroblasts. It represents the more mature erythroid progenitors that have less proliferative capacity.



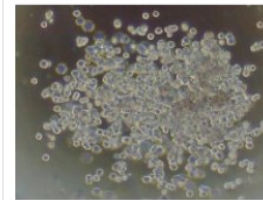
CFU-G (Colony forming unit-granulocyte): Clonogenic progenitors of granulocytes that give rise to a homogeneous population of eosinophils, basophils or neutrophils.



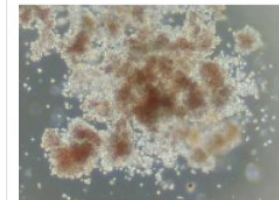
CFU-GM (Colony forming unit-granulocyte, macrophage): Progenitors that give rise to colonies containing a heterogeneous population of macrophages and granulocytes. The morphology is similar to the CFU-M and CFU-G descriptions.



BFU-E (Burst forming unit-erythroid): The size of the colony can be described as small (3 to 8 clusters), intermediate (9 to 16 clusters), or large (more than 16 clusters) according to the number of clusters present. These are primitive erythroid progenitors that have high proliferative capacity.

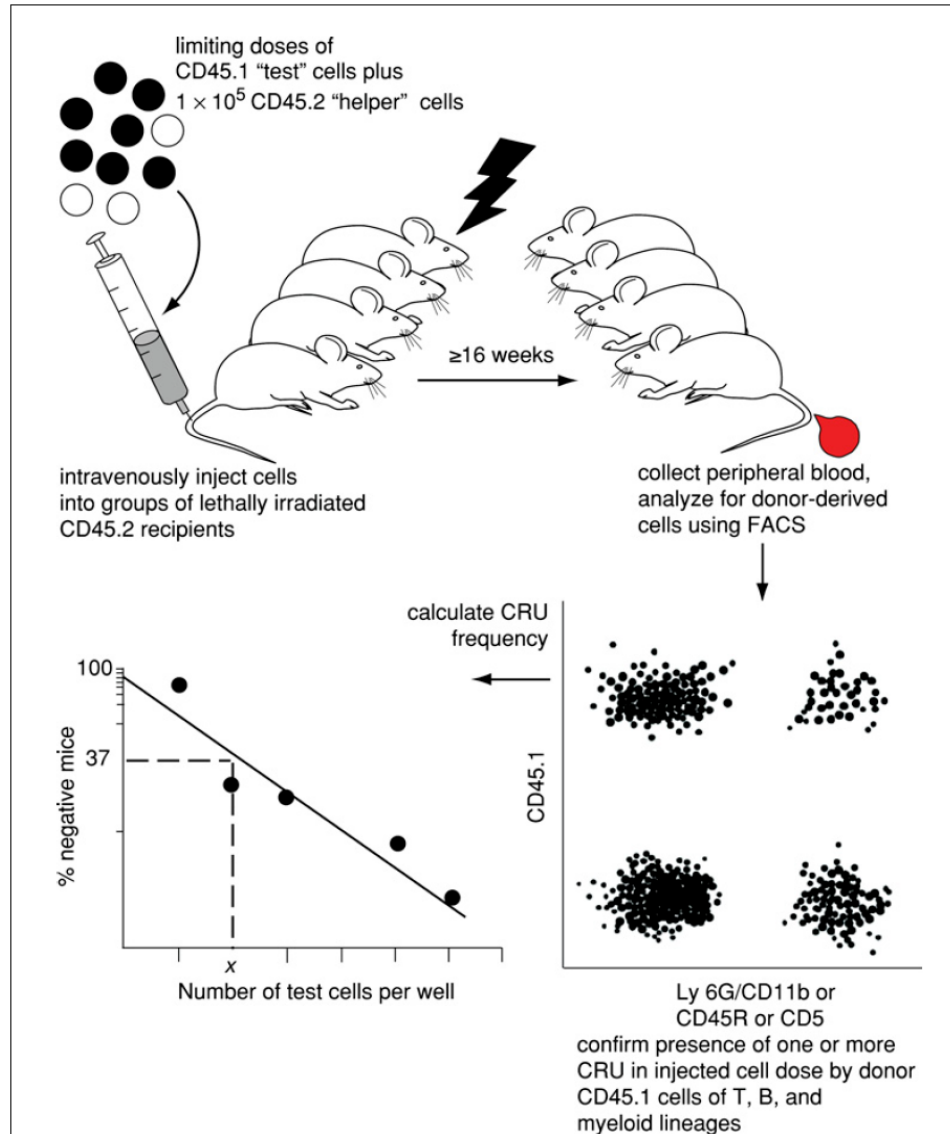


CFU-M (Colony forming unit-macrophage): Clonogenic progenitors of macrophages that give rise to a homogenous population of macrophages.

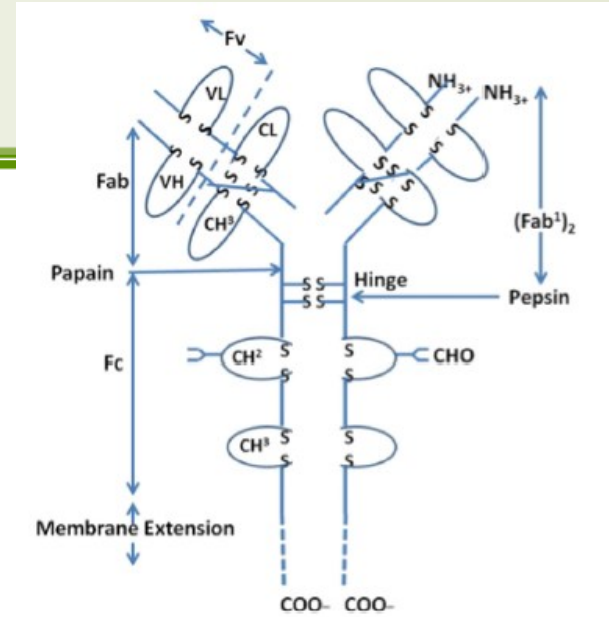
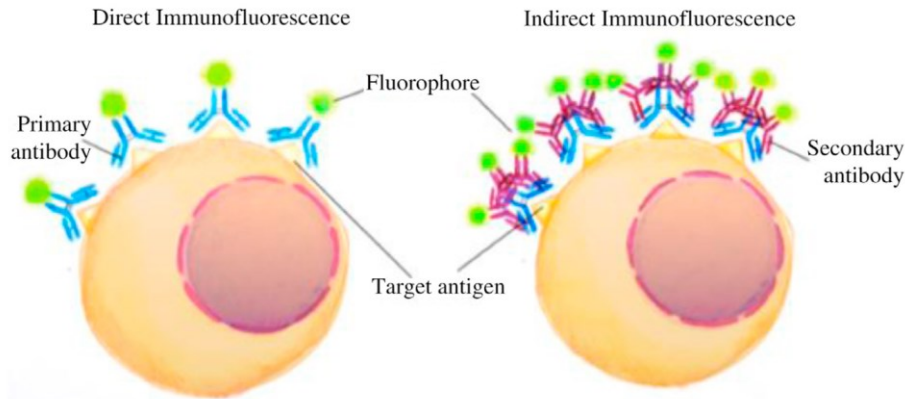


CFU-GEMM (Colony forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte): Multi-lineage progenitors that give rise to erythroid, granulocyte, macrophage and megakaryocyte lineages, as the name indicates.

Charakterizace hematopoetických kmenových a progenitorových buněk – competitive repopulation assay, CRU

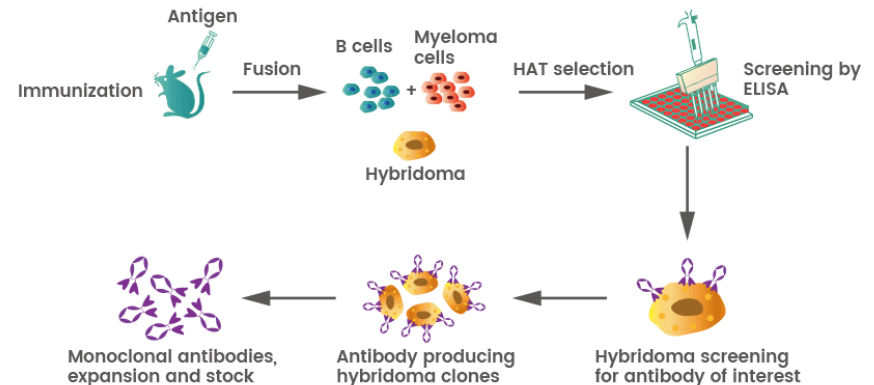


Immunodetekce



History:

- 1940 – Conns, imunofluorescenční značení kryožezů
- 1959 – Singer, vývoj metody konjugující protilátky se značkou
- 1966 - Graham&Karnovsky, metoda značení protilátek enzymy (HRP)
- 1974 – Taylor&Burns – rutinní imunohistochemie
- 1975 – Kohler&Milstein – produkce monoklonálních protilátek pomocí hybridomů





Explore



Validate



Learn

Search h

Search for

Application

Any



Search

[Advanced search](#) ▾e.g. [Her2](#), [Transcription factors](#), [Chromosome X](#)

A portal for validated antibodies

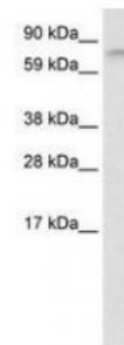
Antibodypedia scores antibodies to guide researchers to choose an appropriate antibody for a particular application. The resource contains information about more than four million publicly available research antibodies towards over 19,000 human protein targets from more than 85 providers.

Use "Search for" to find validated antibodies against your target protein for a particular application! The antibodies are scored using the [validation principles](#) outlined by the International Working Group for Antibody Validation and we encourage feedback from researcher by [submitting validation data](#) for a particular antibody.

Content updated 2021-09-09

4480670 reviewed antibodies from **95 providers**, covering gene-products encoded by **19109 genes** (approximately **95%** of all human genes).
Primary data available for **2181179** experiments.

Featured Validations

**LS-C433002**

Fetal Brain Lysate. This image was taken for the unconjugated form of this product. Other forms have not been tested.

[More info](#)

THE HUMAN PROTEIN ATLAS

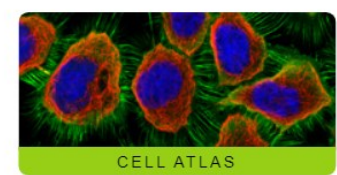
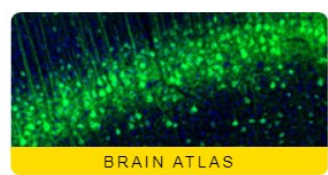
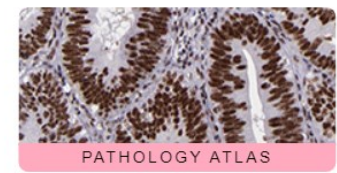
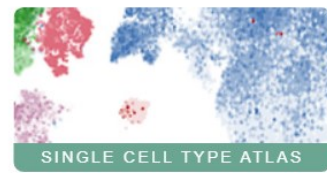
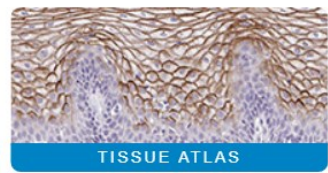
MENU HELP NEWS

SEARCH¹

dsg1

Search Fields »

e.g. ACE2, GFAP, EGFR



Digital collection

History of the Human Protein Atlas

1993 PROSEQUESTING

1995 FIRST COMPLETED ANTIBODY-BASED

2000 HPA PILOT PROJECT (CHR 21)

2005 TISSUE MICROARRAYS THE HPA DATA MANAGEMENT SYSTEM

2004 LAUNCH OF THE HUMAN PROTEIN ATLAS PORTAL

2014

read more

Recent news

Wed, 28 Jul 2021
A single cell type map of human tissues

Thu, 22 Jul 2021
Movie of the month: The Fatty Liver

Tue, 15 Jun 2021
Movie of the month: The Spleen

[all news articles](#)

PRESS ROOM

INTRODUCTION

PUBLICATIONS

LICENCE & CITATION

DOWNLOADABLE DATA

Version: 20.1
Atlas updated: 2021-02-24
[release history](#)

Proteome analysis based on
26941 antibodies targeting
17165 unique proteins

contact@proteinatlas.org

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.

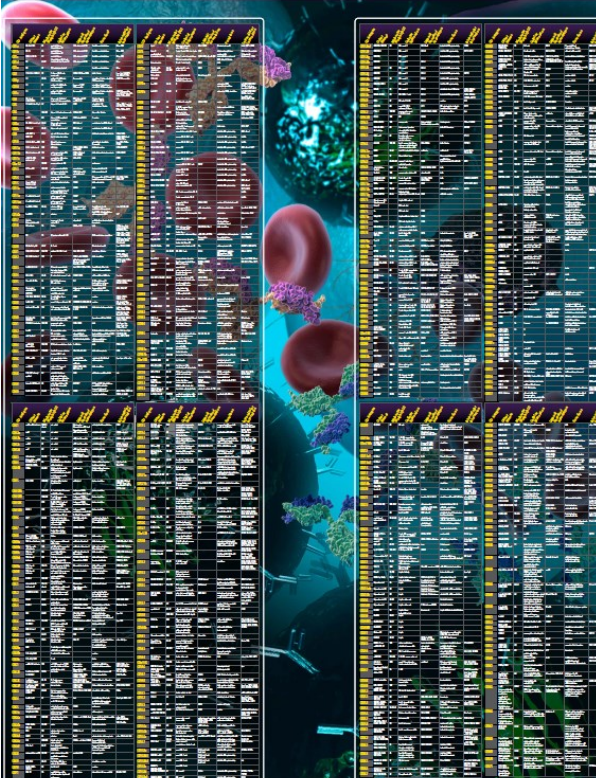
CD („Cluster of Differentiation“)

- **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/>

Human CD Molecules 



biolegend.com

Contact BML agents:
 BML agents are available in the following countries:
 Australia, Canada, China, Denmark, France, Germany, India, Italy, Japan, Korea, Mexico, New Zealand, Norway, Poland, Portugal, Russia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, Taiwan, Thailand, United Kingdom, USA, Vietnam

biolegend.com

Contact BML agents:
 BML agents are available in the following countries:
 Australia, Canada, China, Denmark, France, Germany, India, Italy, Japan, Korea, Mexico, New Zealand, Norway, Poland, Portugal, Russia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, Taiwan, Thailand, United Kingdom, USA, Vietnam

Mouse CD Molecules 



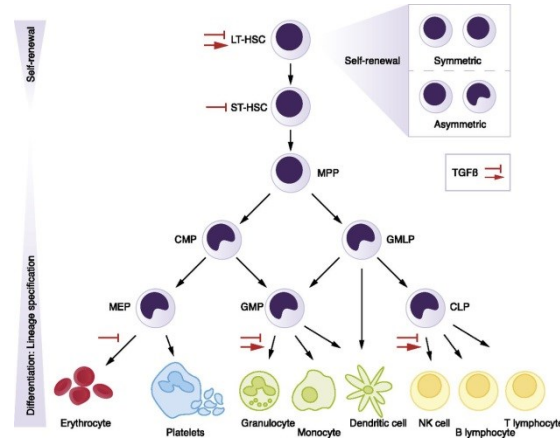
biolegend.com

Contact BML agents:
 BML agents are available in the following countries:
 Australia, Canada, China, Denmark, France, Germany, India, Italy, Japan, Korea, Mexico, New Zealand, Norway, Poland, Portugal, Russia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, Taiwan, Thailand, United Kingdom, USA, Vietnam

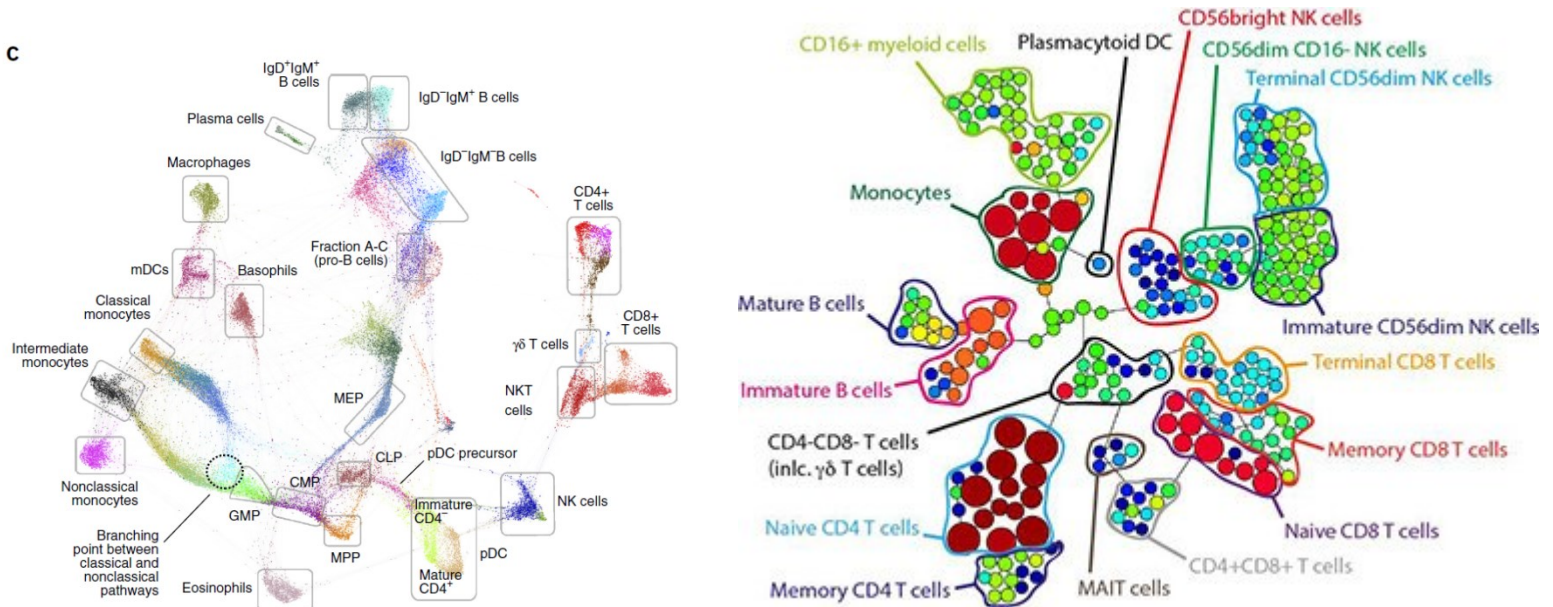
biolegend.com

Contact BML agents:
 BML agents are available in the following countries:
 Australia, Canada, China, Denmark, France, Germany, India, Italy, Japan, Korea, Mexico, New Zealand, Norway, Poland, Portugal, Russia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, Taiwan, Thailand, United Kingdom, USA, Vietnam

The hematopoietic hierarchy – novel approaches



C





CD Maps – Dynamic Profiling of CD1–CD100 Surface Expression on Human Leukocyte and Lymphocyte Subsets

Tomas Kalina^{1,2†}, Karel Fišer^{1†}, Martín Pérez-Andrés^{3,4}, Daniela Kužilková¹, Marta Cuenca⁵, Sophinus J. W. Bartol⁶, Elena Blanco^{3,4}, Pablo Engel⁵, and Menno C. van Zelm^{6,7*}, on behalf of the Human Cell Differentiation Molecules (HCDM) organization

¹ CLIP - Childhood Leukaemia Investigation Prague, Department of Paediatric Haematology and Oncology, Charles University, Prague, Czechia, ² Department of Paediatric Haematology and Oncology, University Hospital Motol, Prague, Czechia, ³ Department of Medicine, Cancer Research Centre (BMCC, USAL-CSIC), Cytometry Service (NUCLEUS), Institute of Biomedical Research of Salamanca, University of Salamanca, Salamanca, Spain, ⁴ Biomedical Research Networking Centre Consortium of Oncology (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, ⁵ Department of Biomedical Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ⁶ Department of Immunology, Erasmus MC, University Medical Center, Rotterdam, Netherlands, ⁷ Department of Immunology and Pathology, Monash University and the Alfred Hospital, Melbourne, VIC, Australia

OPEN ACCESS

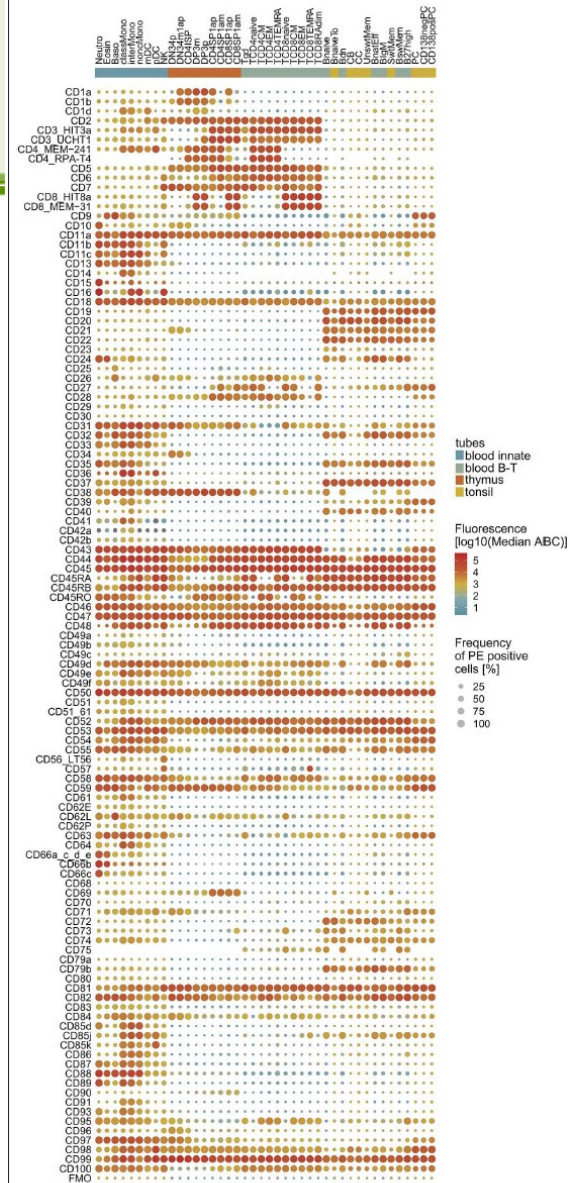
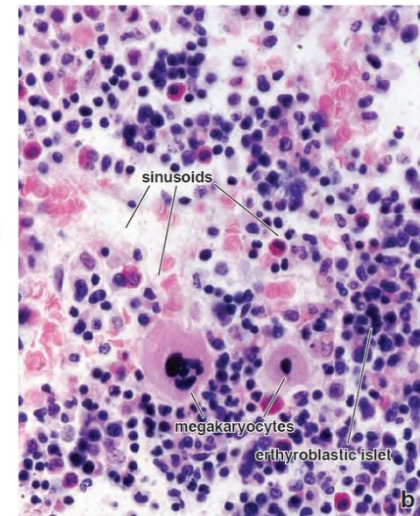
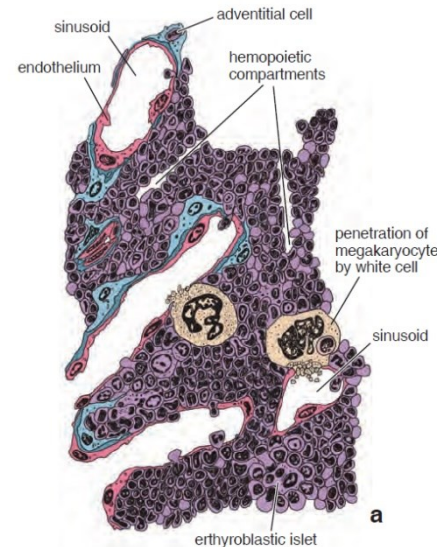


FIGURE 2 | Expression map of CD1–CD100 on all 42 non-overlapping cell subsets. CD markers are numerically ordered vertically with the FMO on the bottom row. The cell subsets are grouped (innate cells; thymocytes; T-cells; B cells) and sorted within lineage on their maturity. The median expression level is visualized by color, and the median percentage of positive cells is visualized by the size of the dot. For cell type abbreviations, see **Supplementary Table 3**.

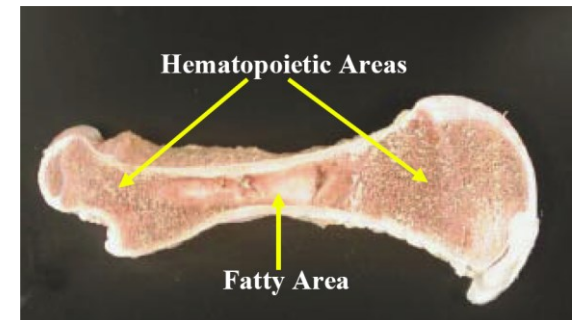
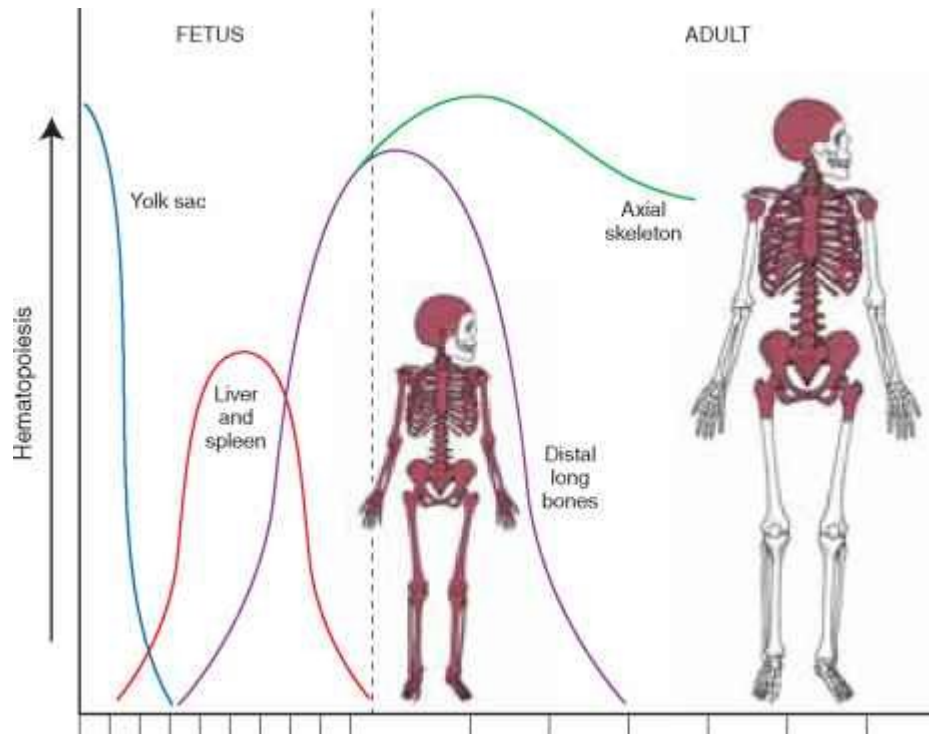
Kostní dřeň

- ▶ 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 adipocyty.
- ▶ Stromální buňky, makrofágy a endoteliální buňky spolu s hematopoetickými buňkami produkují růstové faktory regulující proliferaci a diferenciaci buněk.
- ▶ Strukturální 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

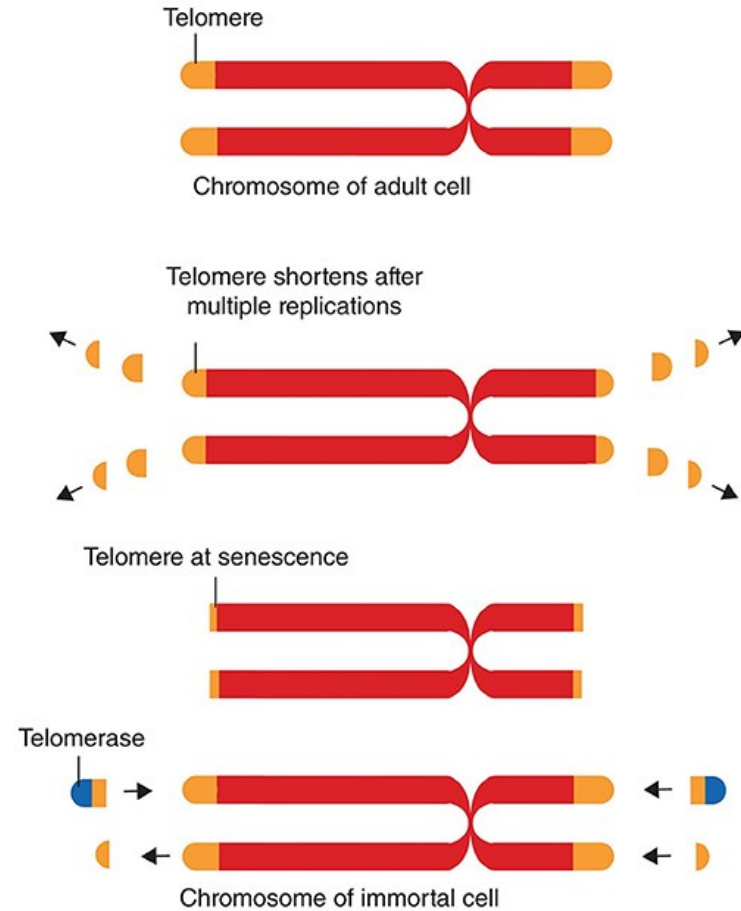
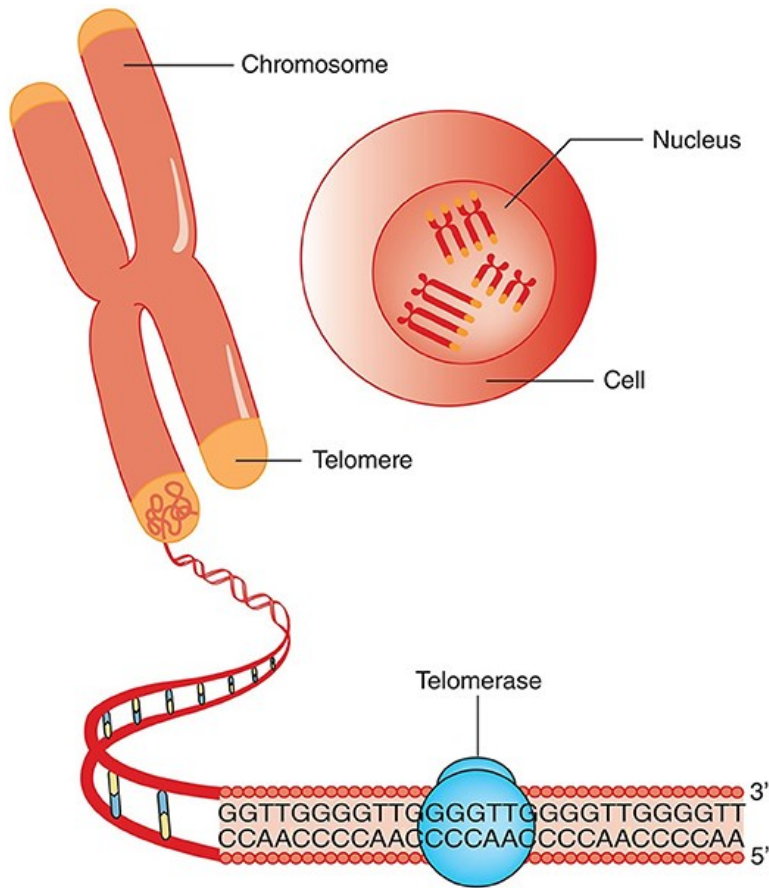


Kostní dřeň a věk

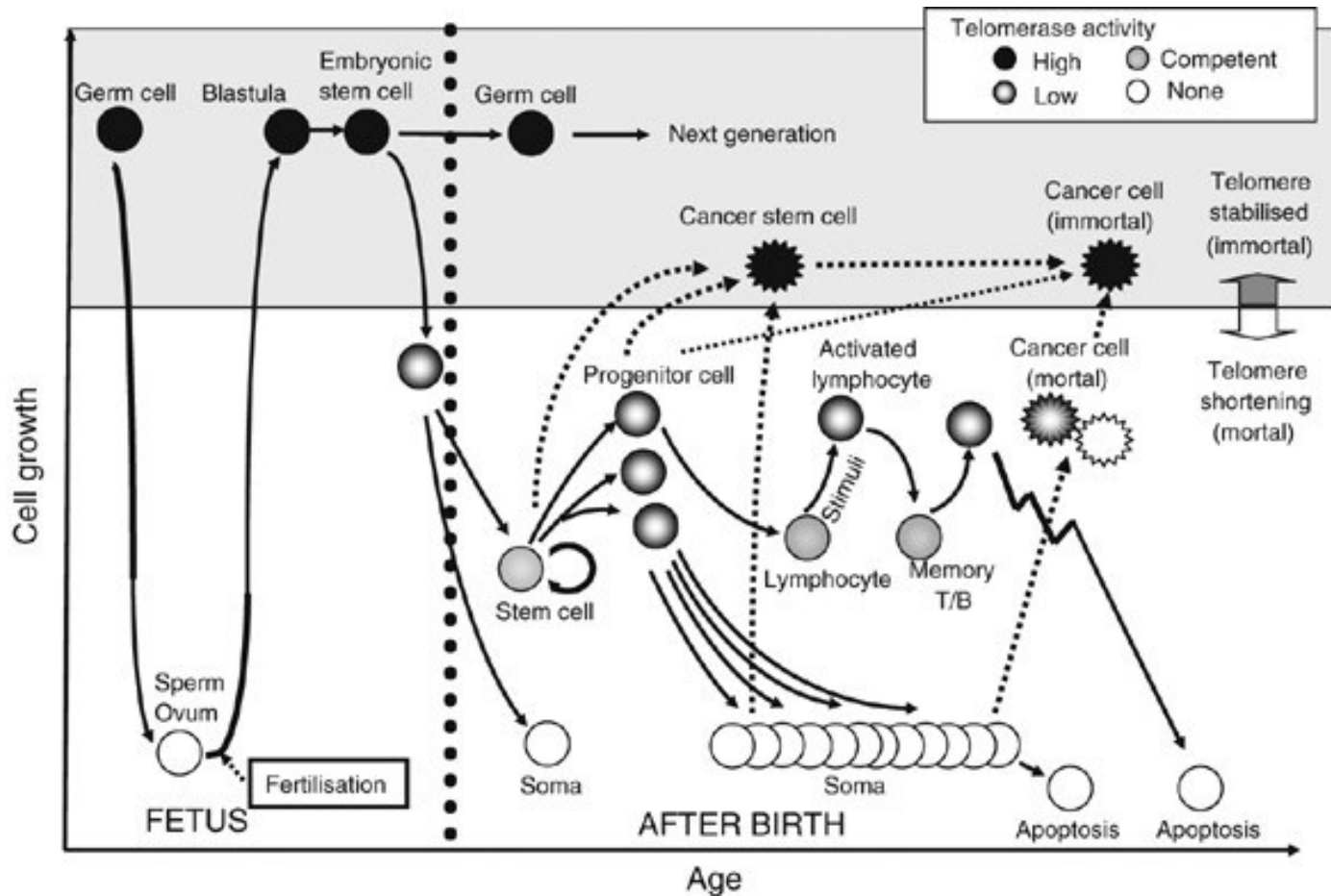
- ◆ **Převažující aktivita:**
 - mládí – ploché a dlouhé kosti
 - stáří – ploché kosti a konce dlouhých kostí
- ◆ **Mladí jedinci:** kostní dřeň celá červená, hematopoéza probíhá ve všech částech
- ◆ **Dospělí jedinci:** středová část kostí se postupně zaplňuje tukem a vytlačuje hematopoetické buňky;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



Úbytek telomer, délka telomer a telomeráza.

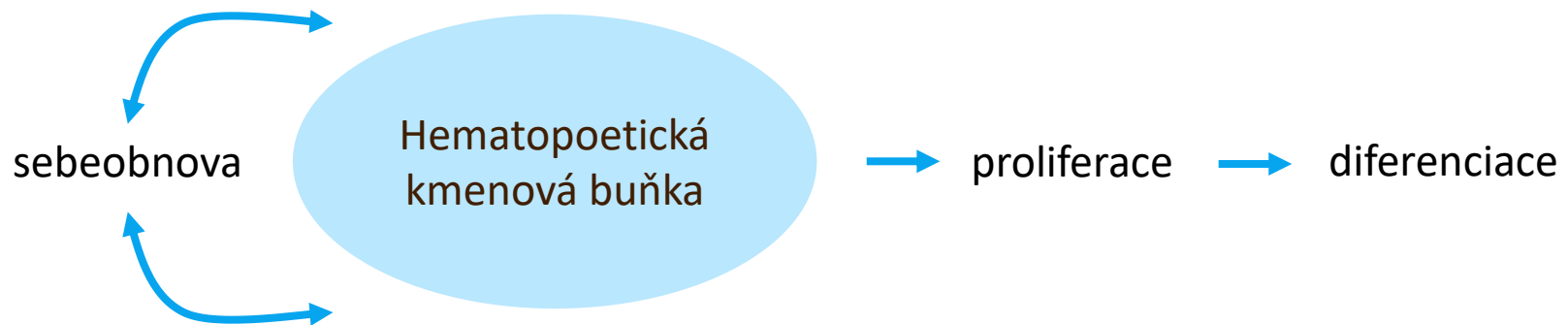


Dynamika telomer a telomerázy v lidských kmenových buňkách.



Hematopoetická kmenová buňka (HSC)

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



snižující se
proliferace

zvyšující se
diferenciace

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

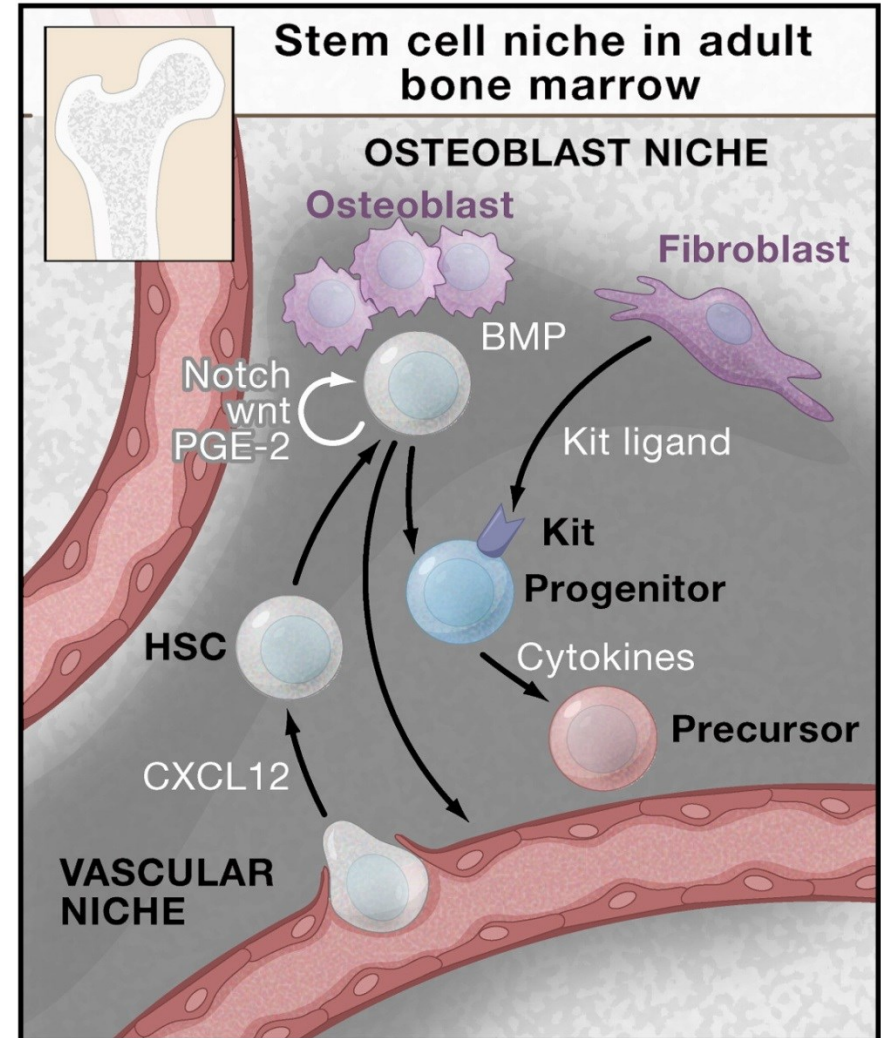
je již částečně diferencována a může dávat vznik jen dané buněčné linii (CFU).



Téměř a zcela **zralé krevní buňky.**

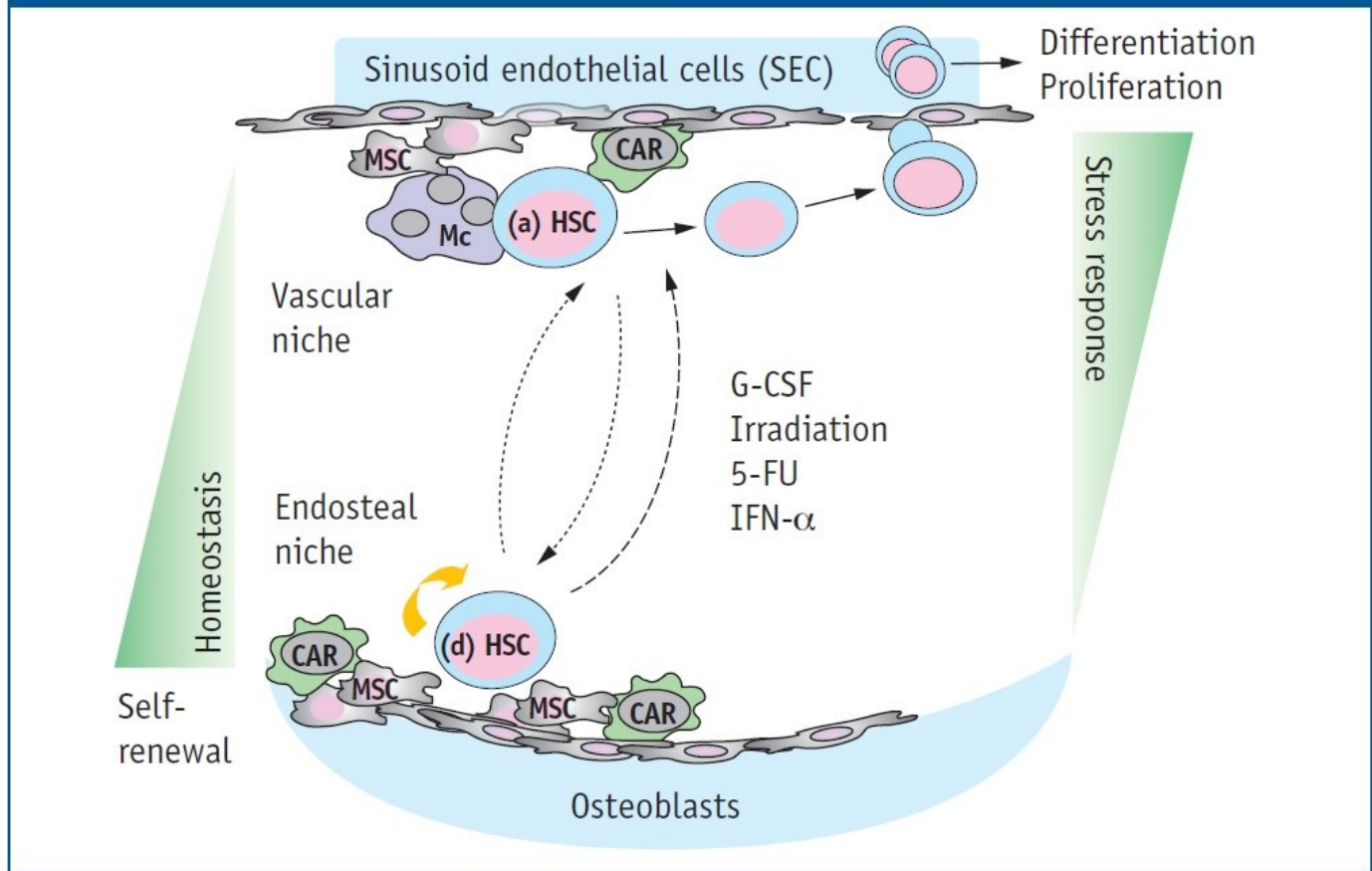
Hematopoetická kmenová buňka (HSC)

- 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), erythropoetin (Epo) ovlivňují funkci progenitorů



Hematopoetická kmenová buňka (HSC)

Figure 3: HSC niches in the bone marrow



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

Hematopoetická kmenová buňka (HSC)

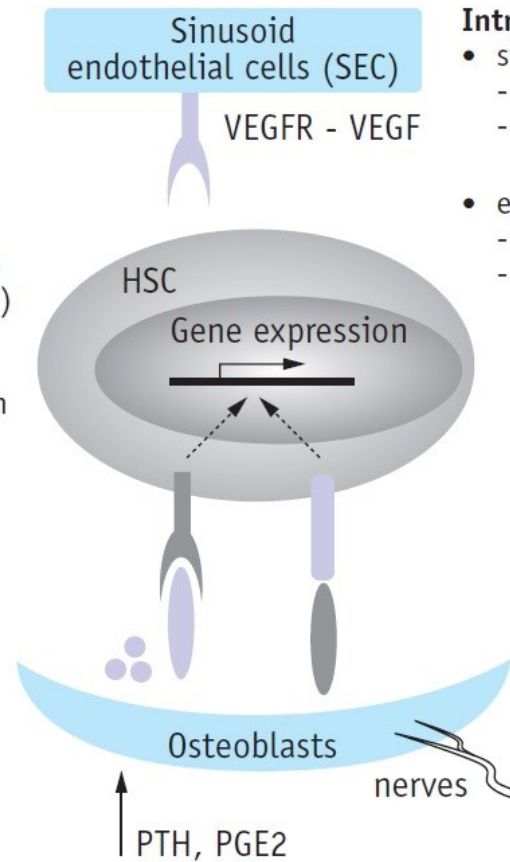
Figure 4: Regulatory mechanisms in HSC niches in the bone marrow

Extrinsic mechanisms

- cytokines
- chemokines
- negative regulators (osteopontin)
- adhesion molecules
- proteases (MMP-9, cathepsin K)
- hormones (PTH, PGE2)
- sympathetic nerves
- oxygen status
- calcium concentration
- circadian rhythm

quiescence
self-renewal
expansion

Ang-1 - tie2
SCF - c-kit
Flt3-L - flt3
TPO - mpl
Wnt - frizzled
jagged/Delta - Notch



Intrinsic mechanisms

- signalling molecules
 - cytoplasmic
 - nuclear, including transcription factors
- epigenetic mechanisms
 - DNA/histone modif.
 - microRNAs

cell-cell
adhesion
migration

Cadherins
VCAM - VLA
ICAM - LFA
CXCL12 - CXCR4
HA - CD44

Cytokiny v hematopoéze

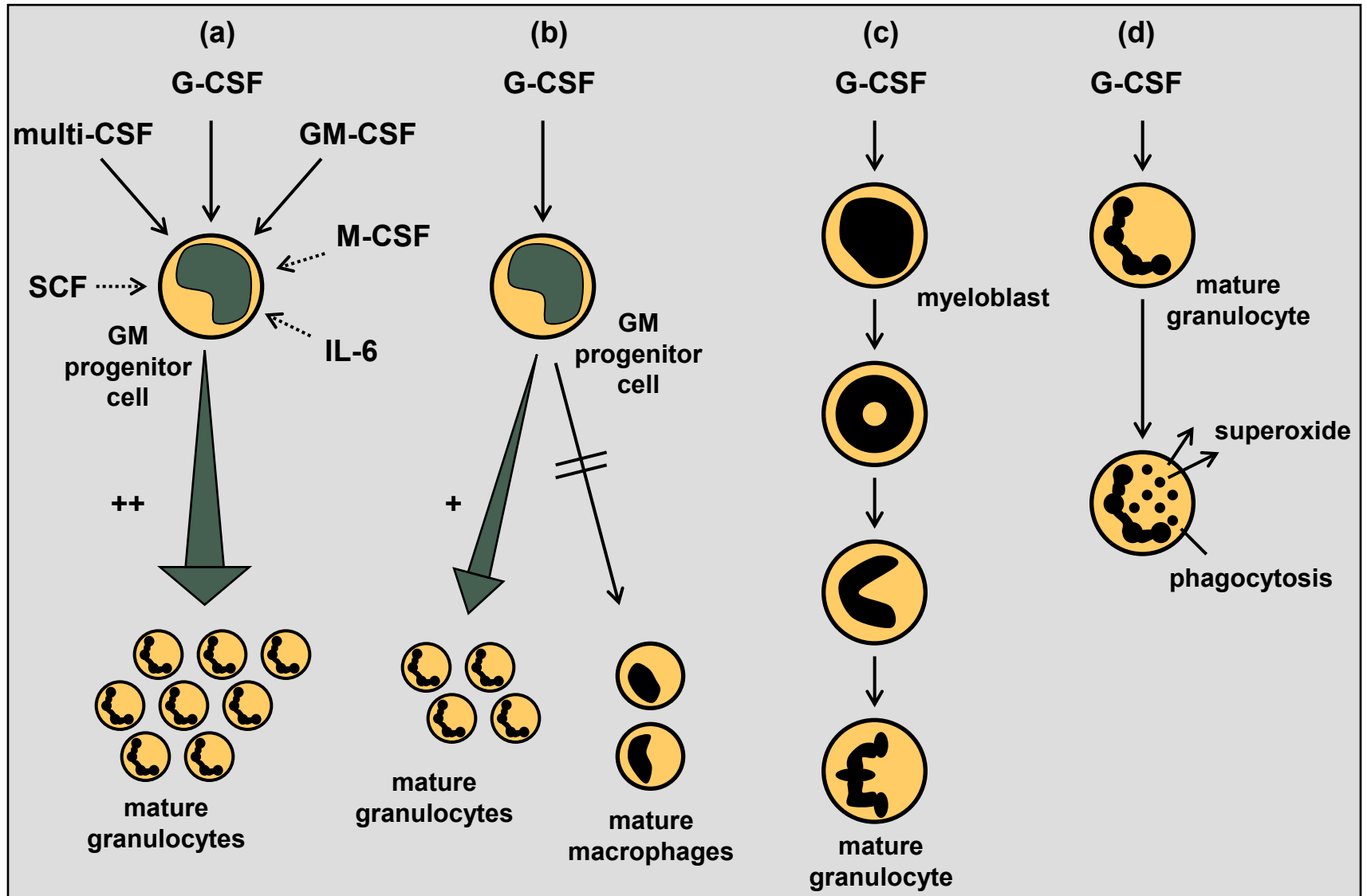
Cytokine ^a	Symbol	Source	Target
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	GM-CSF	T cells, endothelial cells, fibroblasts	CMP, ErP, GMP, EoP, BaP, MKP, all granulocytes, erythrocytes
Granulocyte colony-stimulating factor	G-CSF	Endothelial cells, monocytes	ErP, GMP, EoP, BaP, MKP
Monocyte colony-stimulating 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

^aHemopoietic 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 přenos 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

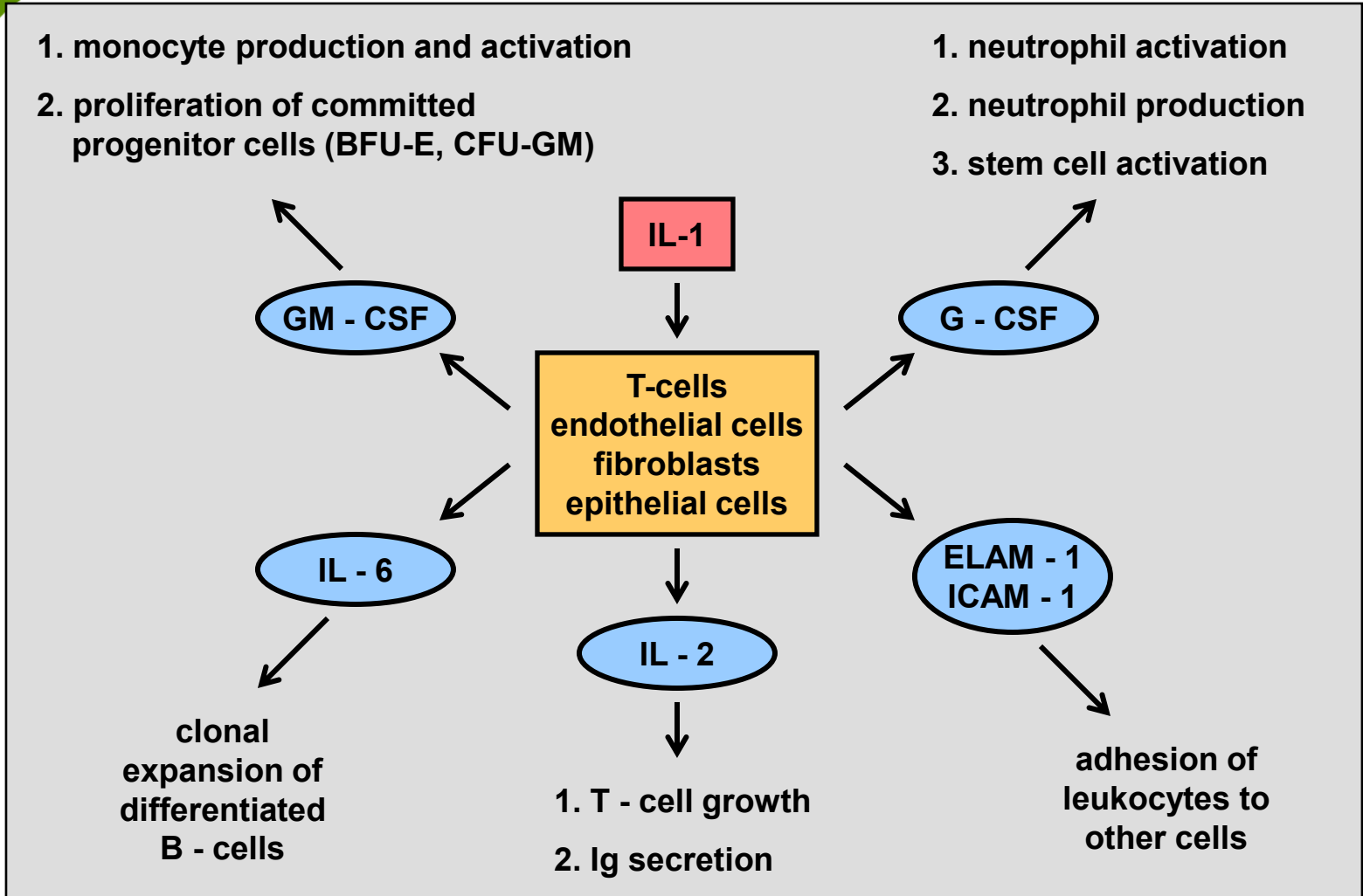
Cytokiny jsou multifunkční



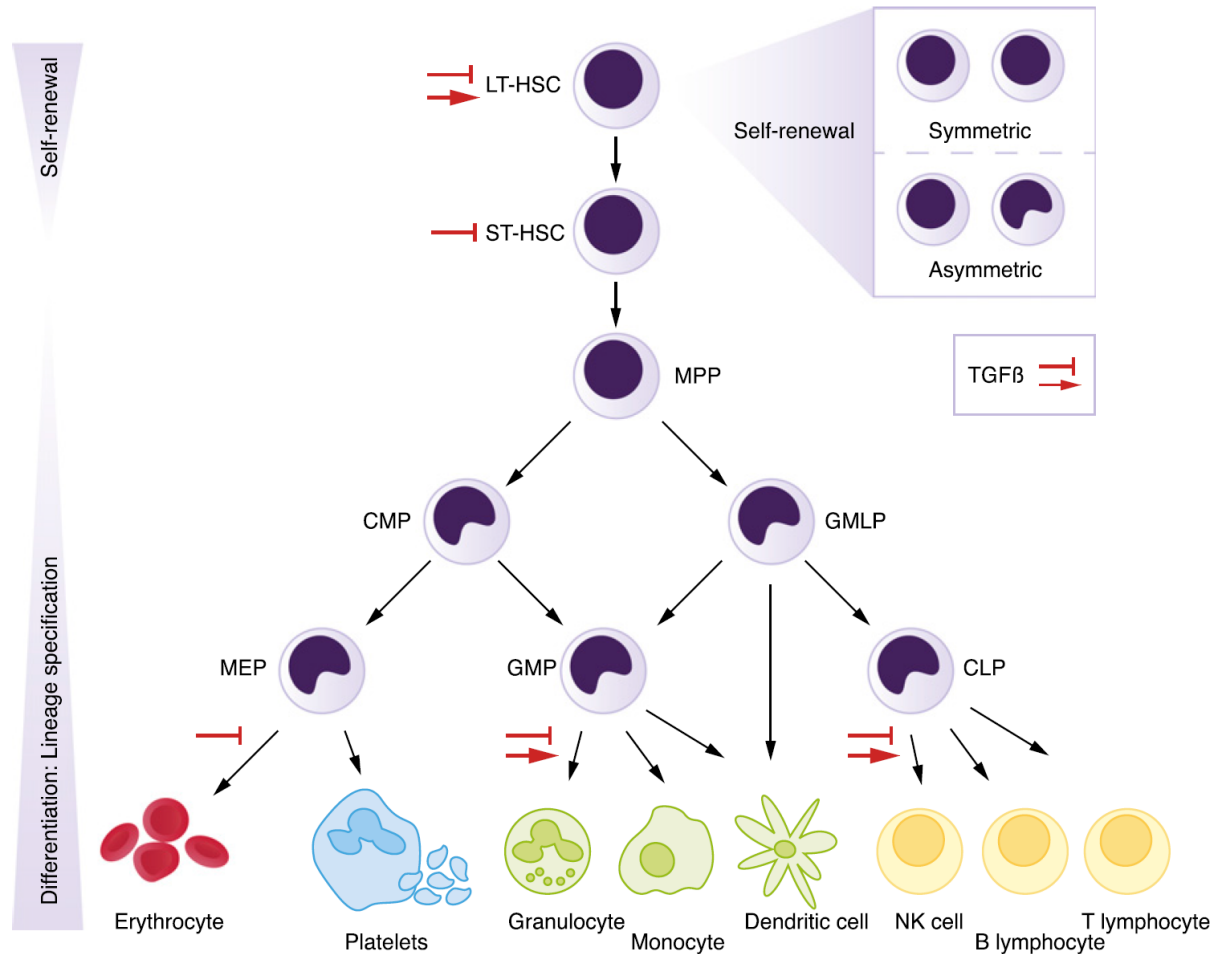
(a) cell production is dependent on regulator stimulation (c) initiation of maturation

(b) induction of commitment to form cells in a restricted lineage (d) Stimulation of functional activity

Úloha IL – 1 v hematopoéze



Úloha TGF-β v hematopoéze



TGF-β signaling in the control of hematopoietic stem cells

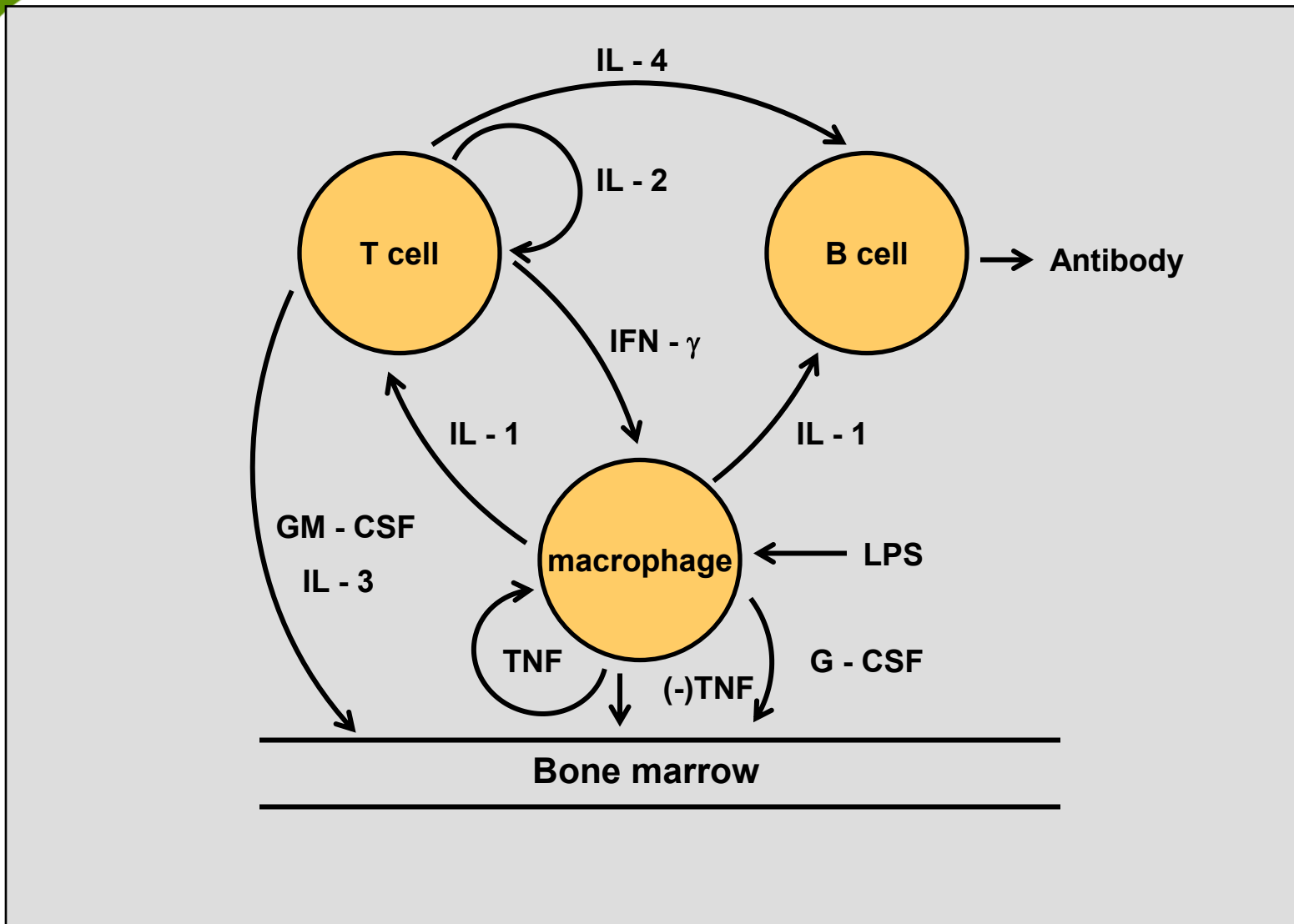
Ulrika Blank and Stefan Karlsson

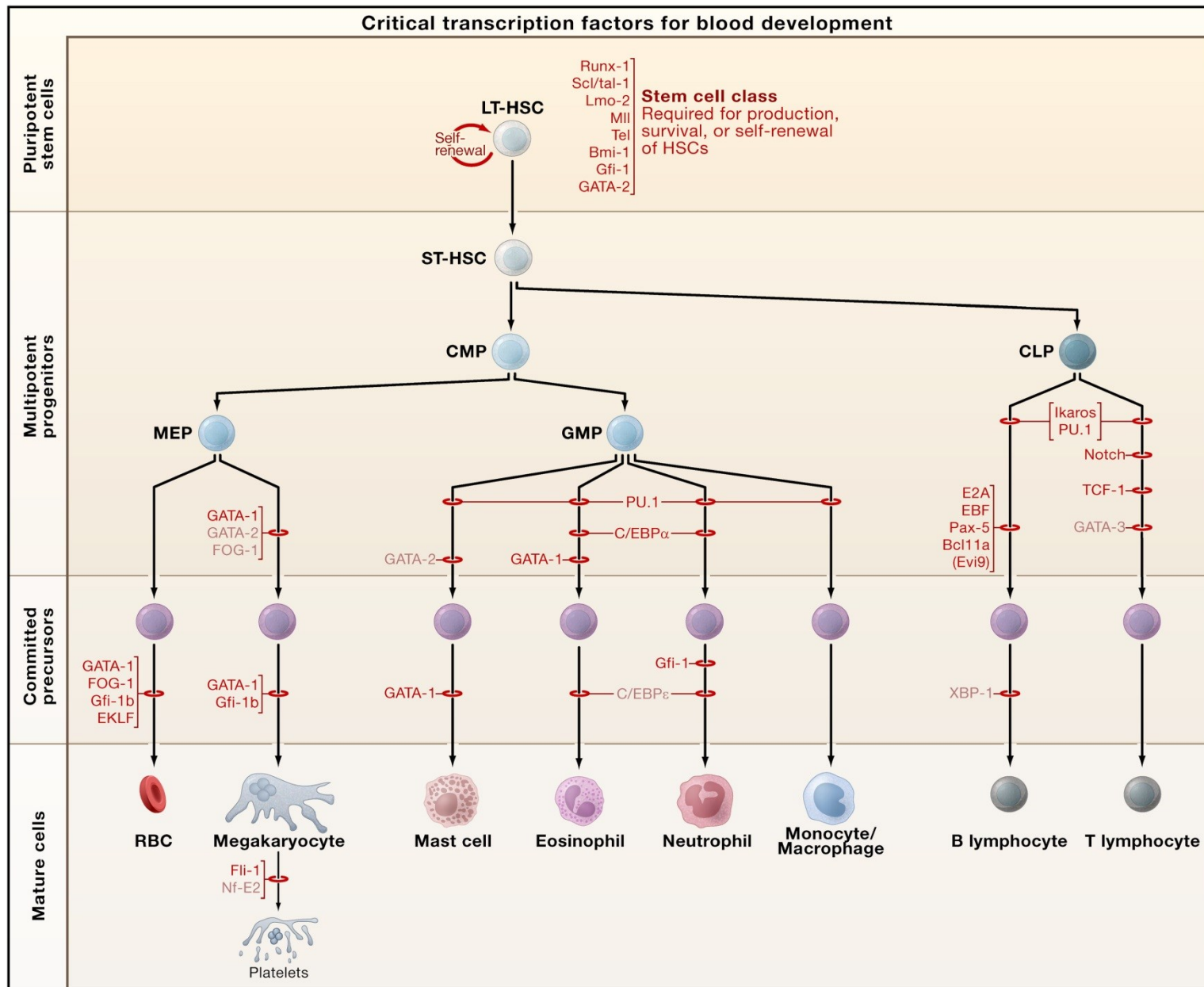
Division of Molecular Medicine and Gene Therapy, Lund Stem Cell Center, Lund University Hospital, Lund, Sweden



blood™

Cytokiny působí v síti vzájemných interakcí





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

LT-HSC, long-term hematopoietic stem cell; ST-HSC, short-term hematopoietic stem cell; CMP, common myeloid progenitor; CLP, common lymphoid progenitor; MEP, megakaryocyte/erythroid progenitor; GMP, granulocyte/macrophage progenitor; RBCs, red blood cells.

Table 1 | **Phenotypes of mice deficient in lineage-specific transcription factors involved in the myeloid system**

Transcription factor	Site of expression	Haematopoietic phenotype in knockout mice and conditional knockout mice	References
RUNX1	Haematopoietic cells, nervous tissue, skeletal muscle, reproductive tissue	Knockout: lack of all definitive haematopoiesis Conditional knockout: impaired megakaryocytic maturation, defective B-cell and T-cell development, myeloid proliferation	31,37,38
SCL	Haematopoietic cells ('haemangioblasts', HSCs, multipotential progenitors, erythrocytes, megakaryocytes and mast cells), endothelial cells, brain tissue	Knockout: complete absence of yolk sac haematopoiesis, lack of angiogenesis Conditional knockout: decreased erythrocytes and megakaryocytes, impaired ST-HSCs, normal LT-HSCs	39,133–135
PU.1	Haematopoietic cells (HSCs, CMPs, CLPs, GMPs, monocytes, granulocytes and B cells)	Knockout: lack of mature myeloid cells and B cells Conditional knockout: block prior to CMP and CLP stages, increased granulopoiesis, defective HSCs	23,24,40,41
C/EBP α	Haematopoietic cells (HSCs, CMPs, GMPs and granulocytes), liver, adipose tissue	Knockout: lack of GMPs and granulocytes, impaired monocytes, increased immature myeloid cells Conditional knockout: same as knockout mice, plus increased HSC self-renewal	26,54
IRF8	Haematopoietic cells (B cells, macrophages, dendritic cells and stimulated T cells)	Knockout: increased susceptibility to viral infections, increased granulocytic cells, CML-like disease	30
GFI1	Sensory epithelial cells in the inner ear, neuroendocrine cells of the lungs, neutrophils, B and T cells, HSCs	Knockout: reduction in earliest lymphoid progenitors, complete block in late neutrophil maturation, defective HSCs	29,70–72
C/EBP ϵ	Preferentially in myeloid and lymphoid cells	Knockout: abnormal late neutrophil maturation, block in eosinophil development, defective macrophage function	28,136

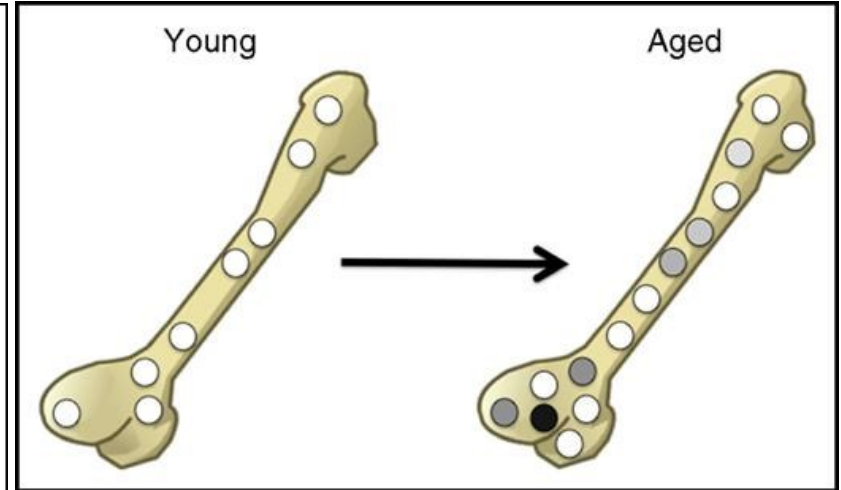
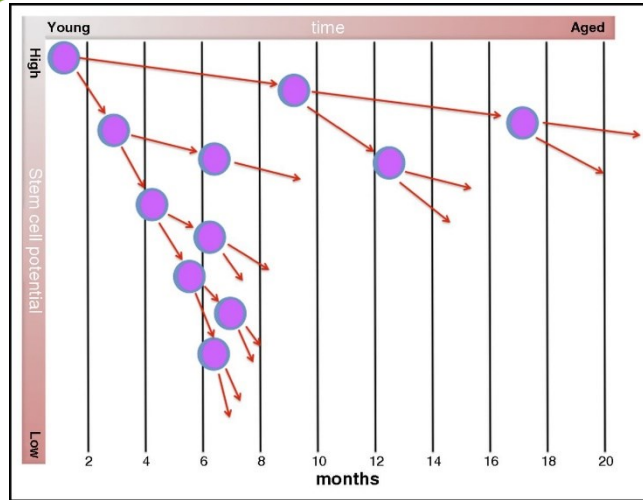
C/EBP, CCAAT/enhancer binding protein; CLP, common lymphoid progenitor; CML, chronic myeloid leukaemia; CMP, common myeloid progenitor; GFI1, growth-factor independent 1; GMP, granulocyte/monocyte progenitor; IRF8, interferon-regulatory factor 8; LT-HSC, long-term haematopoietic stem cell; PU.1, transcription factor encoded by *SP11*; RUNX1, runt-related transcription factor 1; SCL, stem-cell leukaemia factor; ST-HSC, short-term haematopoietic stem cell.

Table 2 | **Examples of transcription factor mutations in patients with AML**

Transcription factor	Mutations and effects	Frequency in AML	FAB system subtype	References
RUNX1-ETO (t(8;21))	RUNX1 DNA-binding domain fused to the transcriptional corepressor ETO; downregulates expression or activity of PU.1, C/EBP α and RUNX1	12–15%	M2	137
CBF β -MYH11 (inv16)	Inversion of breaks in chromosome 16; joins CBF β with the myosin gene <i>MYH11</i>	8–10%	M4 _{Ed}	137
PML-RAR α (t(15;17))	<i>PML</i> gene fused to <i>RARA</i> ; blocks myeloid transcription factors (such as C/EBP α and PU.1)	6–7%	M3	138
MLL fusions (t11q23)	<i>MLL</i> gene fused with one of 30 distinct genes encoding partner proteins; believed to dysregulate HOX genes	4–7%	Diverse pattern of myeloid and lymphoid leukaemias	139
C/EBP α	Amino-terminal dominant negative; carboxy-terminal loss of DNA binding	7–9%	M1, M2 (most), M4 (rare)	56,140,141
GATA1	Amino-terminal dominant negative	Nearly 100% in AMKL associated with Down's syndrome	M7 with Down's syndrome	96,97
PU.1	Mutations decrease heterodimer formation and DNA binding*; PU.1 activity downregulated by RUNX1-ETO, PML-RAR α and FLT3-ITD	<7%	M0, M4, M5, M6	3
RUNX1	Missense, nonsense or frameshift mutations (often biallelic); clustered within the runt domain	9%	M0 (most)	108

*Japanese cohort only. AML, acute myeloid leukaemia; AMKL, acute megakaryoblastic leukaemia; CBF β , core-binding factor- β ; C/EBP α , CCAAT/enhancer binding protein- α ; FAB, French-American-British; FLT3, FMS-related tyrosine kinase 3; GATA1, GATA-binding protein 1; HOX, homeobox; ITD, internal tandem duplication; MLL, mixed lineage leukaemia; MYH11, myosin heavy chain 11; PML, promyelocytic leukaemia; PU.1, transcription factor encoded by *SPI1*; RAR α , retinoic acid receptor- α ; RUNX1, runt-related transcription factor 1.

Stárnutí hematopoetických kmenových buněk



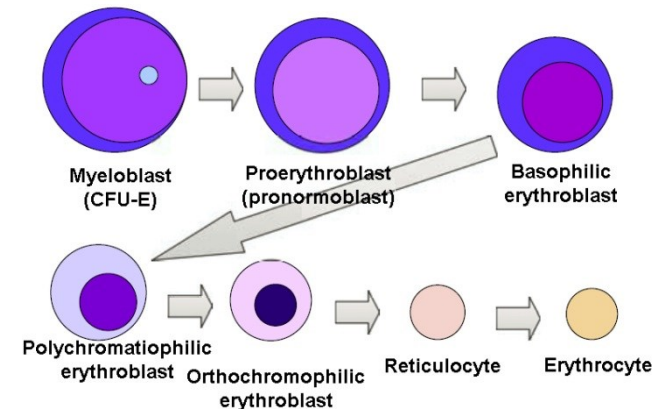
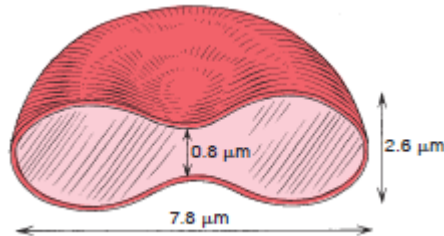
Young HSCs	Molecular reversibility high	Aged HSCs
Balanced lineage output	mTOR activation	Myeloid skeweing
High regenerative potential	ROS production	Lymphoid deficiency
Low frequency	Low mitochondrial function	Low regenerative potential
High self-renewal	Impaired autophagy	High frequency
Low pathology	Epigenetic reprogramming	Hematopoietic pathology
Polyclonal hematopoiesis	Polarity	Oligoclonal hematopoiesis
	Senescence	Atherosclerosis
	Telomere extension	
	Mutation in single loci	
	Random DNA damage	
	Molecular reversibility low	

Haematopoiesis in adults less than 65 years of age was massively polyclonal, with high clonal diversity and a stable population of 20,000–200,000 HSC/MPPs contributing evenly to blood production. By contrast, haematopoiesis in individuals aged over 75 showed profoundly decreased clonal diversity. In each of the older subjects, 30–60% of haematopoiesis was accounted for by 12–18 independent clones, each contributing 1–34% of blood production.

<https://www.nature.com/articles/s41586-022-04786-y>

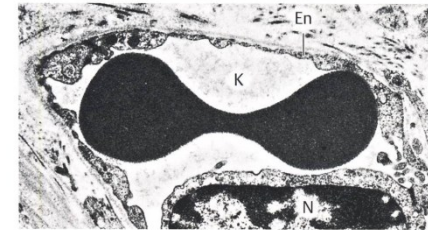
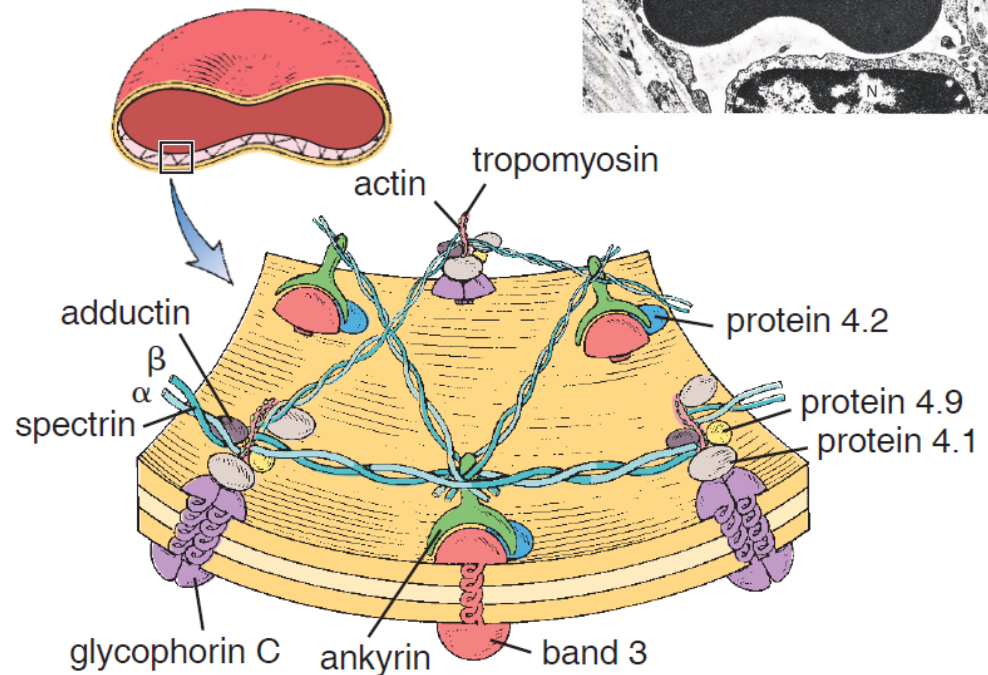
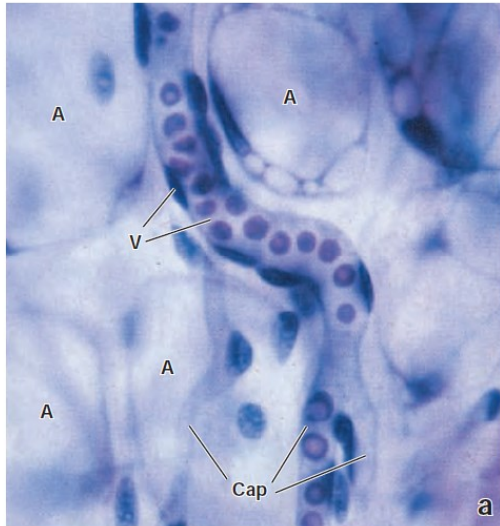
Erytrocyty

- 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



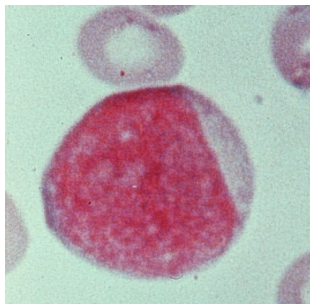
Membránová organizace erytrocytu

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



Vývojová stádia erytrocytů

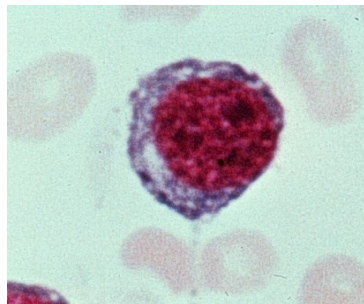
kmenová
buňka



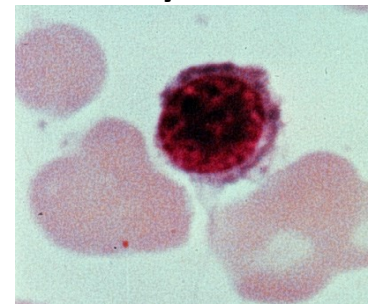
proerytroblast
(pronormoblast)



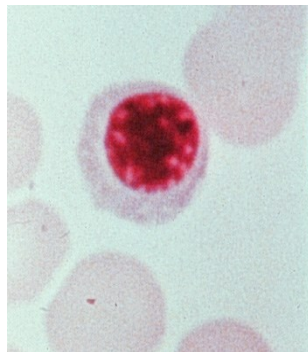
basofilní erytroblast



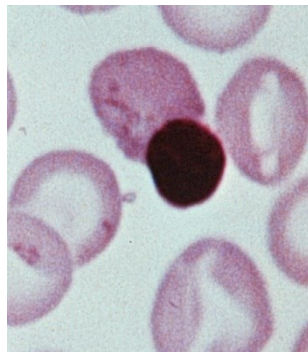
polychromatofilní erytroblast



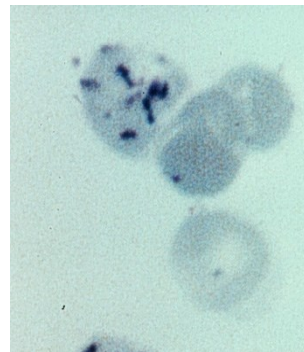
ortochromatofilní erytroblast
(normoblast, metaerytroblast)



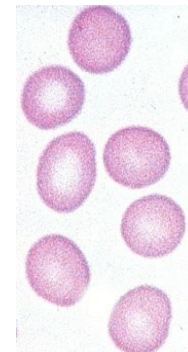
ortochromatofilní erytroblast extrudující jádro



reticulocyt (polychromatofilní erytrocyt)



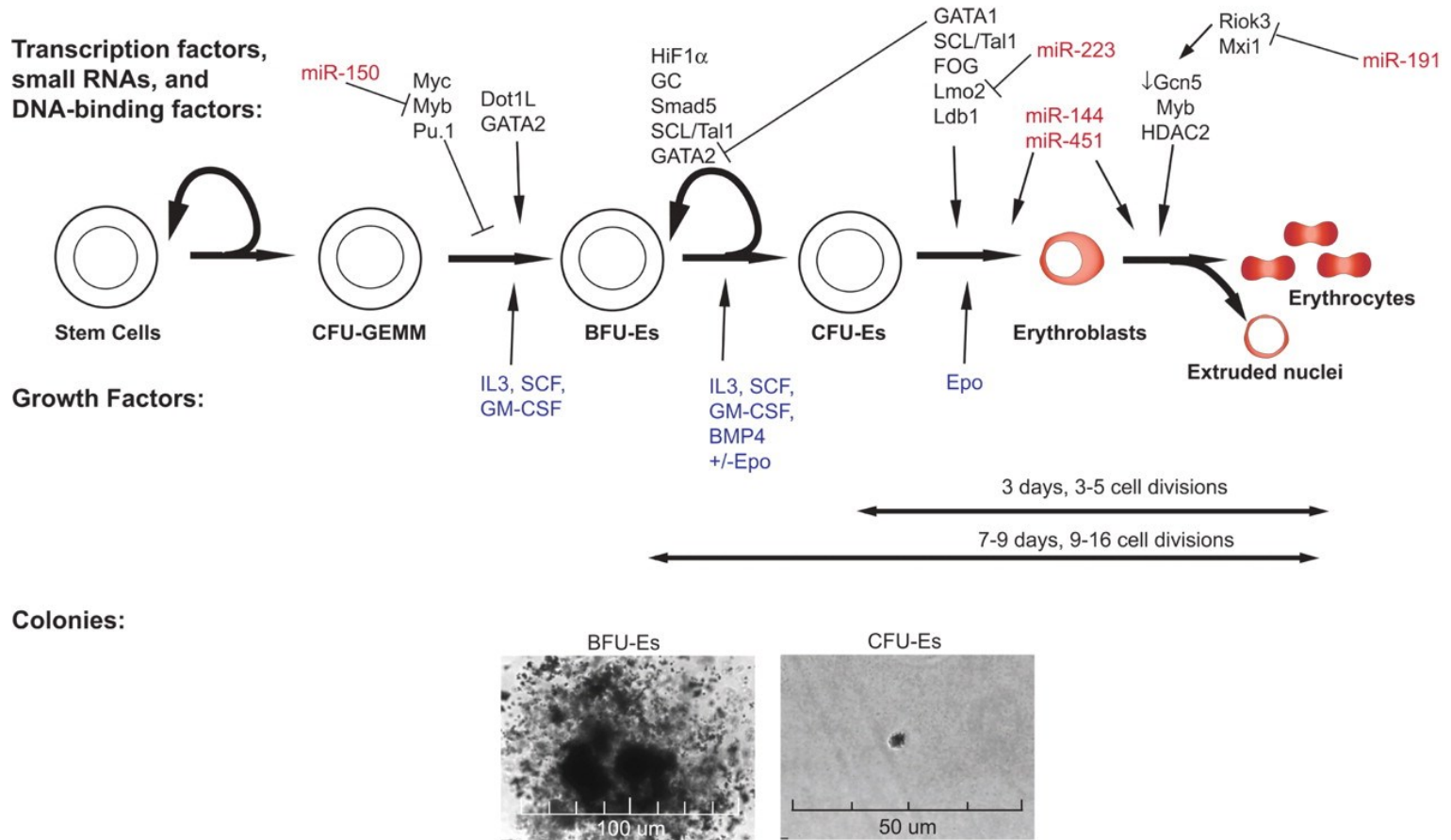
zralý erytrocyt



Regulace erythropoézy

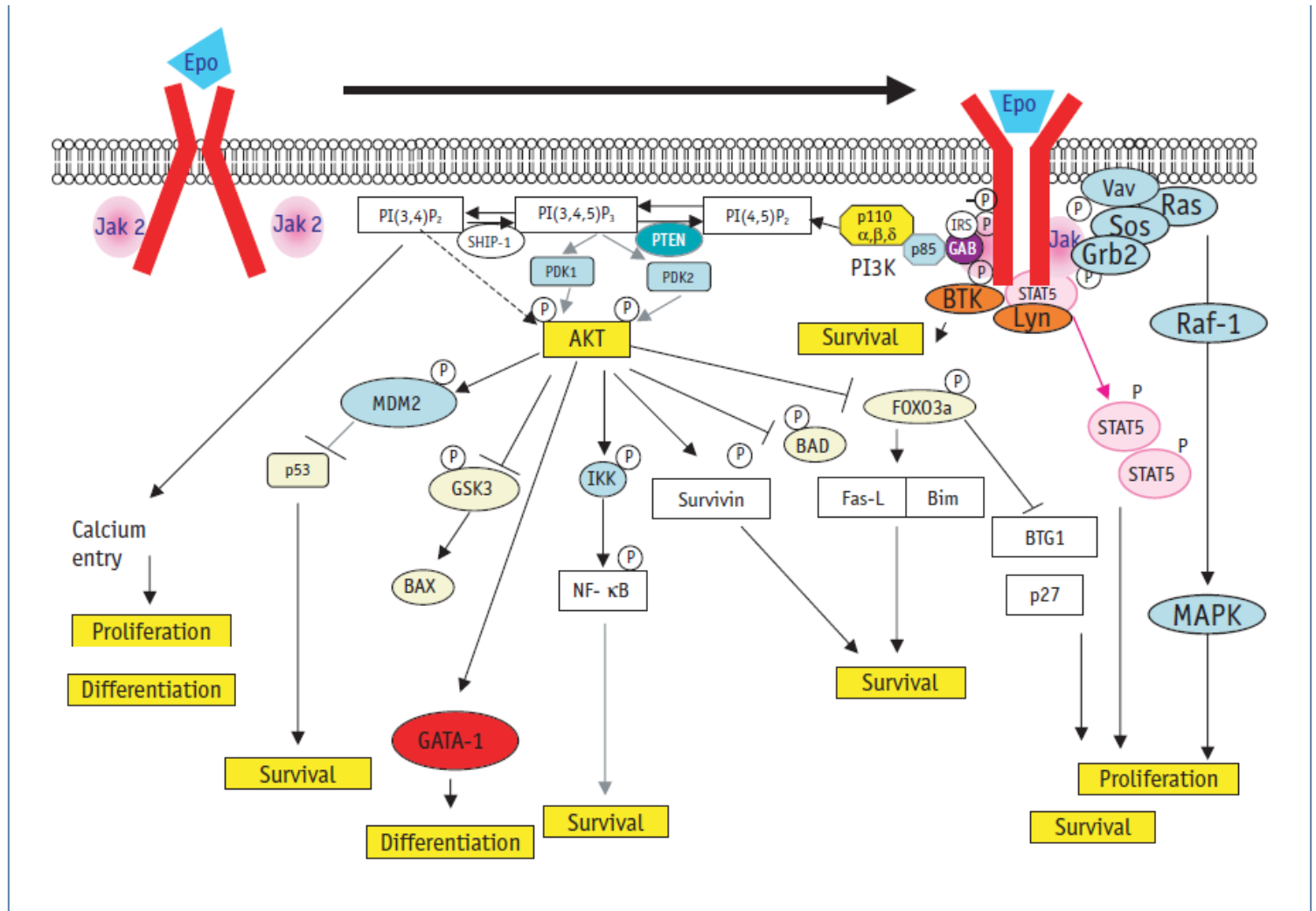
- **Obecné faktory**
 - hypoxie → erythropoietin (embryogeneze - játra, po narození v peritubulárních buňkách kortexu ledvin)
 - růstové faktory, hormony (testosteron vs. estrogeny)
 - vitamíny
- **Maturační faktory**
 - Vitamin B 12
 - Folic acid
- **Faktory nezbytné pro produkci hemoglobinu**
 - Vitamin C – napomáhá absorpci 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

Erytropoéza a EpoR



Cyklistická legenda

Vinen! Armstrong přišel o tituly z Tour, do smrti nesmí závodit





22.10.2012 13:20 Aktualizováno 09.10. 19:32

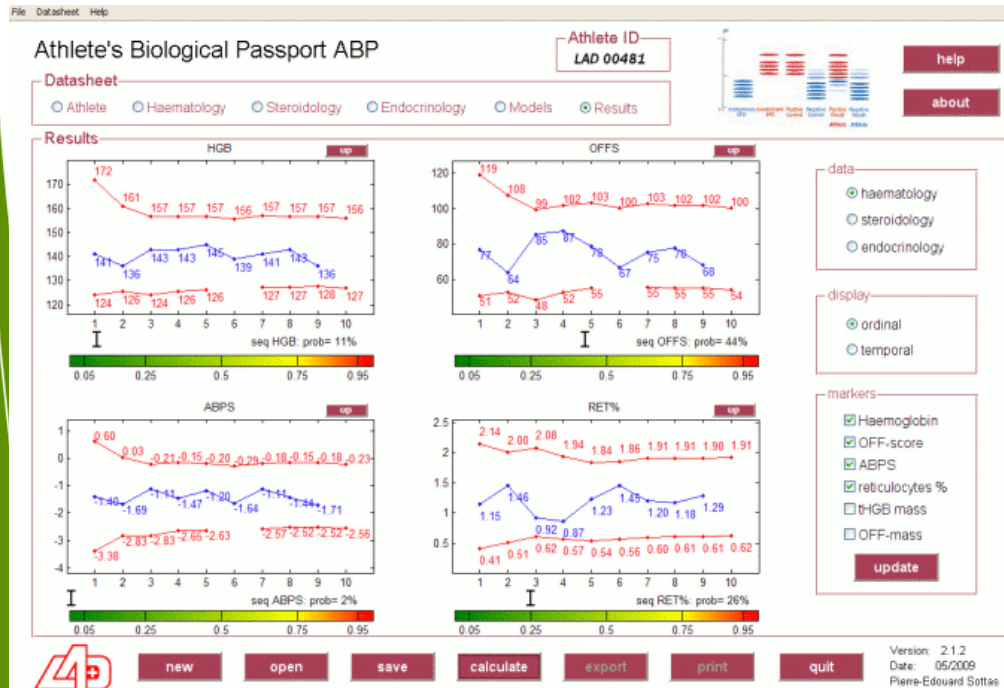
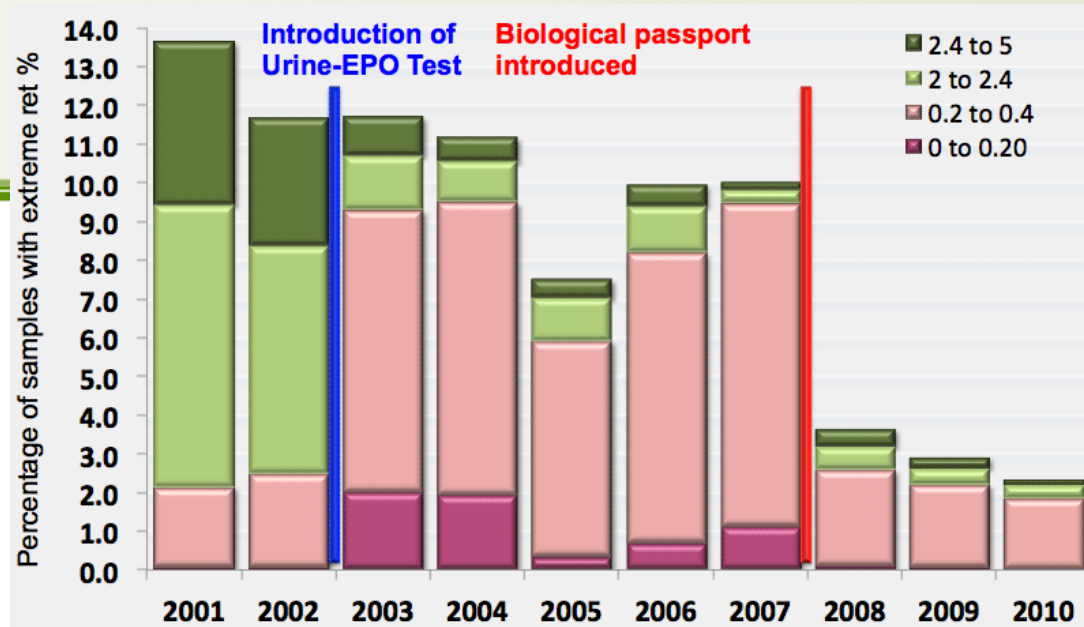
SDÍLEJTE:



Mezinárodní cyklistická unie potvrdila, že Američan Lance Armstrong přišel kvůli dopingu o sedm titulů z Tour de France a má doživotní zákaz startu. Její zástupci v pondělí na tiskové konferenci oznámili, že souhlasí se sankcemi, které bývalému závodníkovi udělila Americká antidopingová agentura.

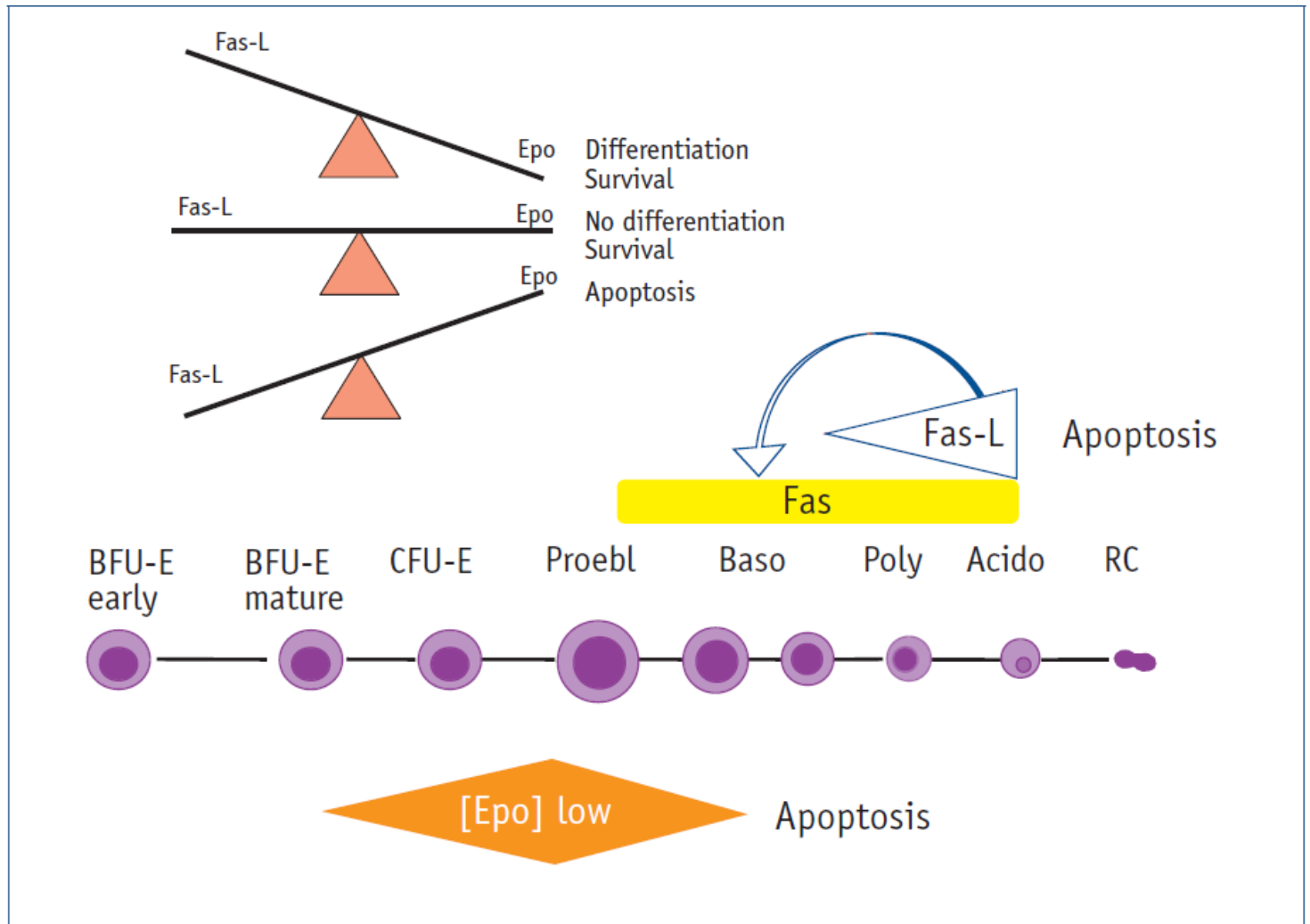
	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
1st	 Bjarne Riis	 Jan Ullrich	 Marco Pantani	 Lance Armstrong	 Lance Armstrong	 Lance Armstrong	 Lance Armstrong	 Lance Armstrong	 Lance Armstrong	 Lance Armstrong	 Floyd Landis	 Alberto Contador	 Carlos Sastre	 Alberto Contador	 Alberto Contador	 Cadel Evans	 Bradley Wiggins
2nd	 Jan Ullrich	 Richard Virenque	 Jan Ullrich	 Alex Zülle	 Jan Ullrich	 Jan Ullrich	 Joseba Beloki	 Jan Ullrich	 Andreas Klöden	 Ivan Basso	 Oscar Pereiro	 Cadel Evans	 Cadel Evans	 Andy Schleck	 Andy Schleck	 Andy Schleck	 Christopher Froome
3rd	 Richard Virenque	 Marco Pantani	 Bobby Julich	 Fernando Escartin	 Joseba Beloki	 Joseba Beloki	 Raimondas Rumsas	 Alexandre Vinokourov	 Ivan Basso	 Jan Ullrich	 Andreas Klöden	 Levi Leipheimer	 Bernhard Kohl	 Lance Armstrong	 Denis Menchov	 Frank Schleck	 Vincenzo Nibali

 Riders penalised for doping  Clean riders

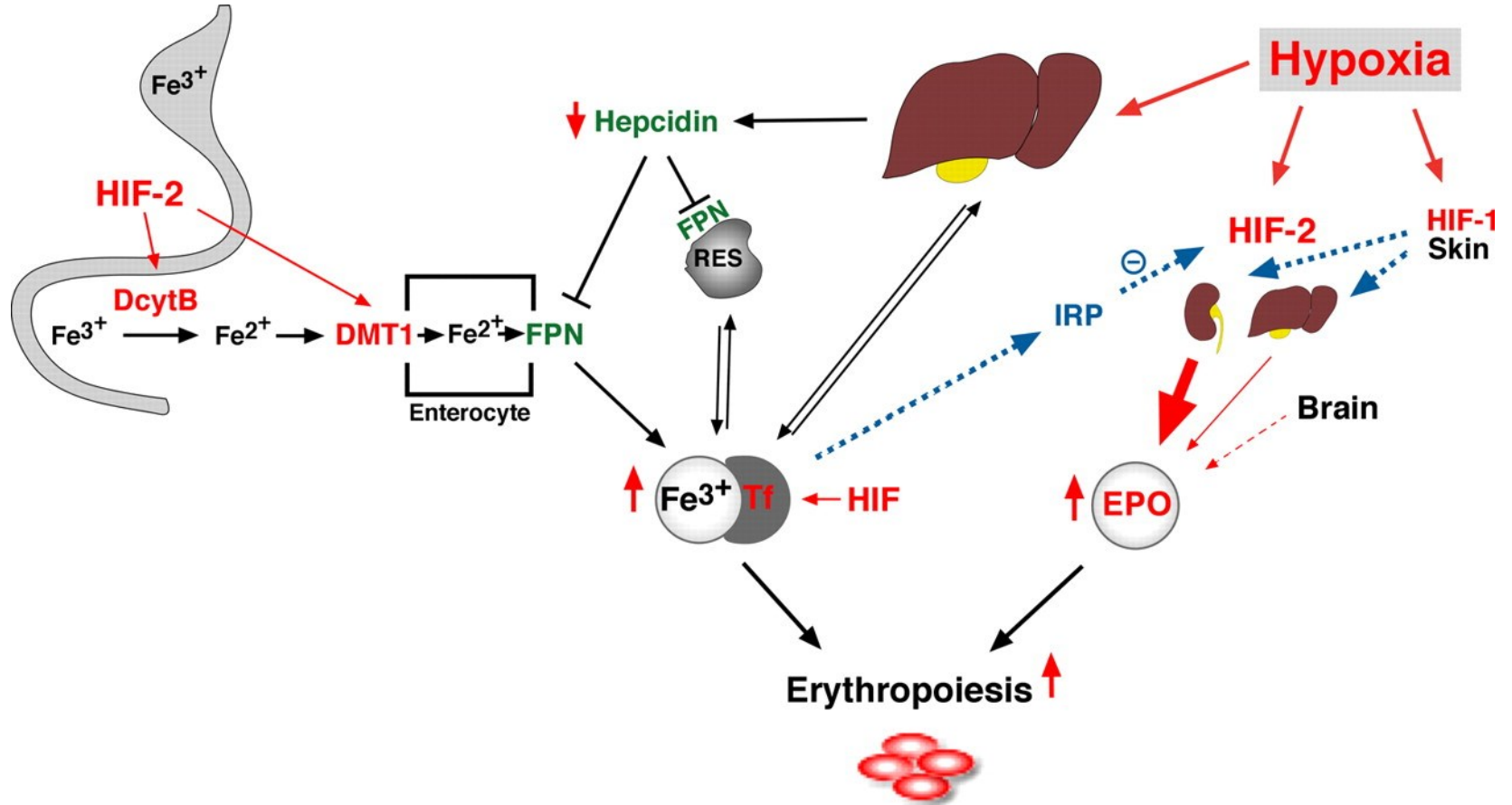


<https://sportsscientists.com/2011/03/evidence-that-the-biological-passport-is-effective-summary-version/>

Regulace erytropoézy



Hypoxie koordinuje syntézu EPO s metabolismem železa



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

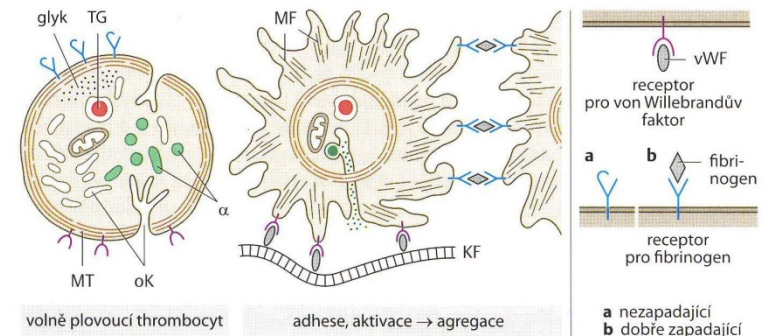
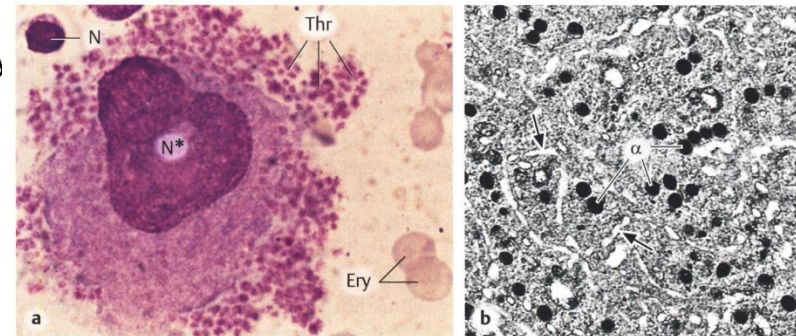
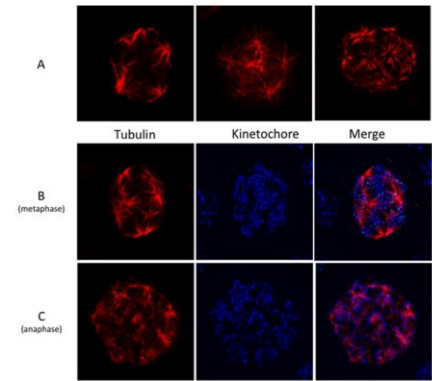
Trombocyty

- ◆ Krevní destičky, 250 tis./ul
- ◆ Klíčová role při srážení krve
- ◆ Bejzaderné fragmenty megakaryocytů
- ◆ postupné zvětšování buňky jako výsledek tzv. endomitózy (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

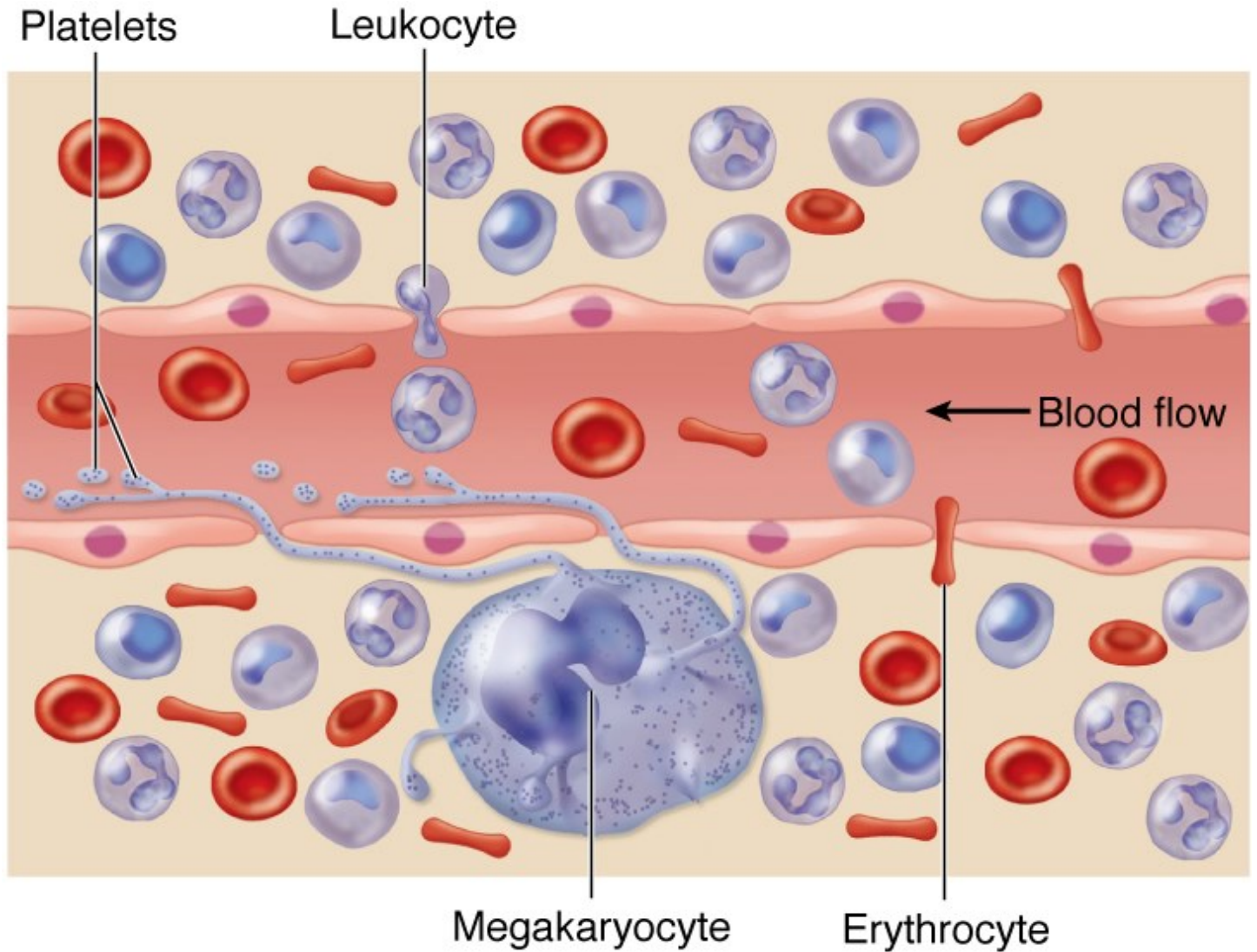
- ◆ V cirkulaci cca 10 dní, likvidace makrofágy sleziny

- ◆ 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

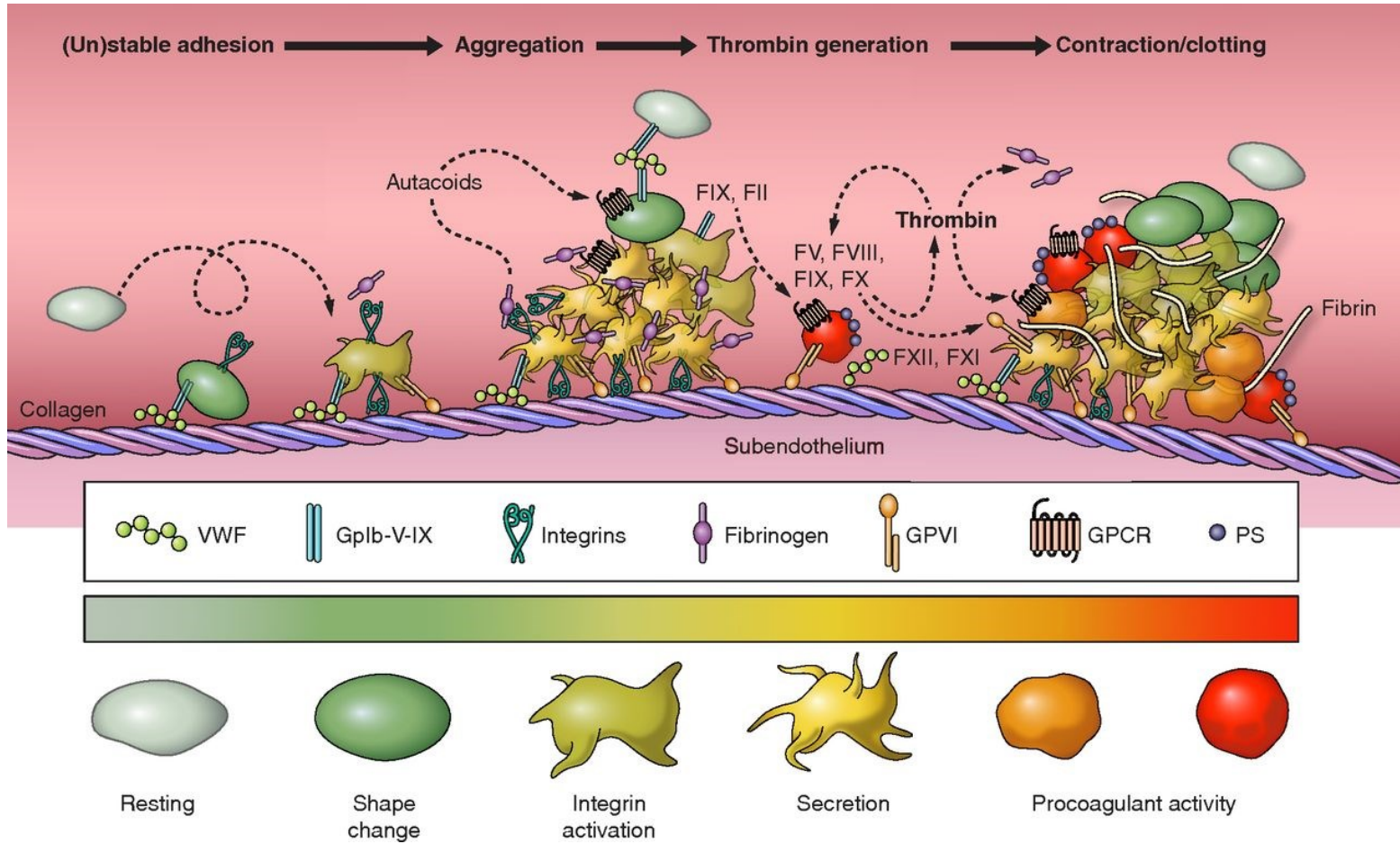
S. Mazzi et al. / Experimental Hematology 2018;57:1-13



Trombocyty



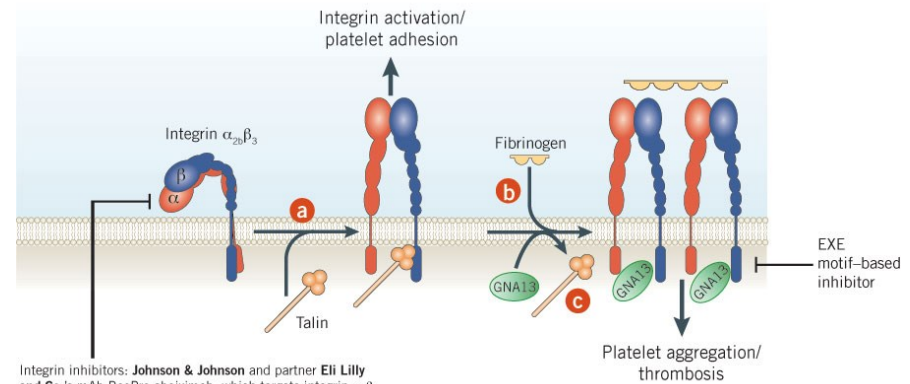
Aktivace a adheze trombocytů



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

Trombolýza

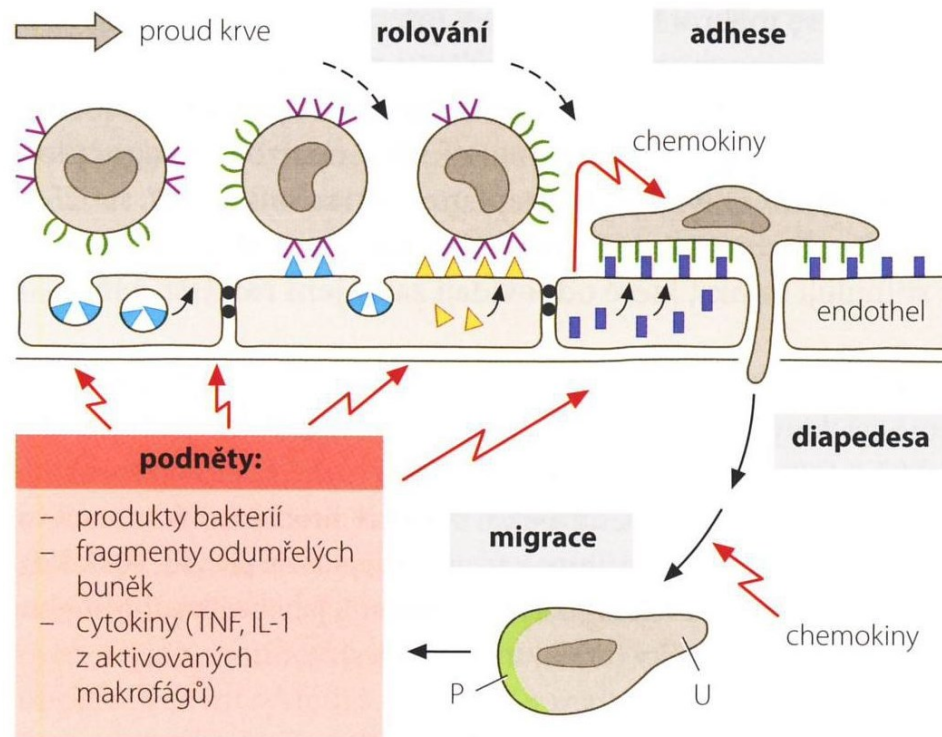
- léčebný proces, který má za cíl rozpuštění krevní sraženiny vzniklé v některé cévě (trombus), nebo zanesené do místa uzávěru krevním tokem z jiného místa (embolus)
- Aplikace látek která rozpouští krevní sraženiny, např. rekombinantních aktivátorů plazminogenu
- používá v akutních stavech, kdy je nutné 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 $\alpha_2\beta_1$ (CD49e/CD61) and integrin $\alpha_3\beta_1$, is marketed to treat angioplasty and to accompany percutaneous coronary interventions and is in Phase II to treat stroke. **Merck & Co. Inc.** markets Integrilin eptifibatid, 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 $\alpha_2\beta_3$.

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



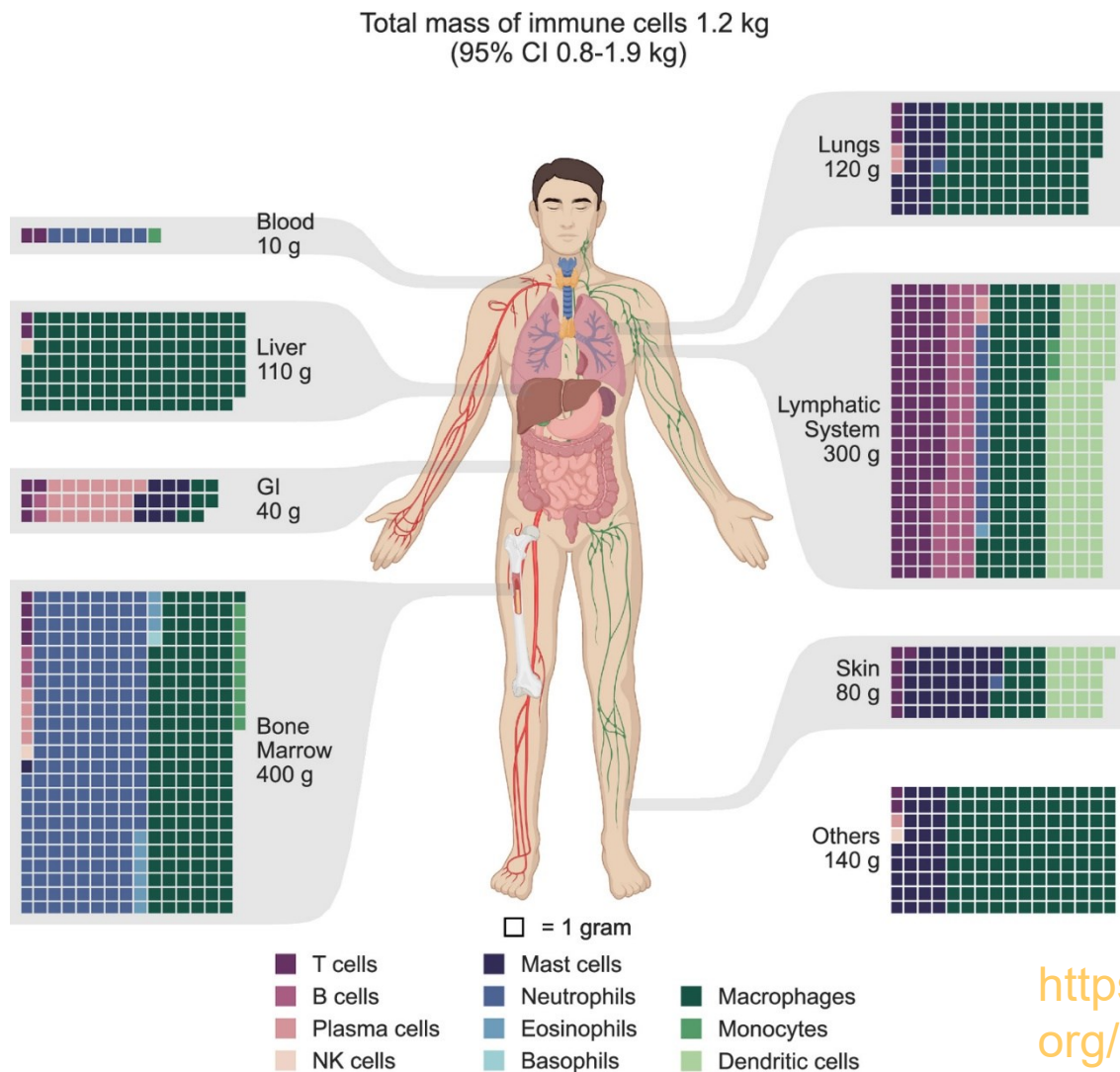
endothel:

- ▲ P-selektin exponovaný exocytosou
- ▲ nově syntetizovaný E-selektin
- adhezí molekuly produkované aktivovaným endothelem

leukocyt:

- ▲ ligand (glykoprotein) pro selektin
- () integrin špatně zapadající
- || integrin dobře zapadající

Distribuce imunitní buněčné hmoty v lidském těle.

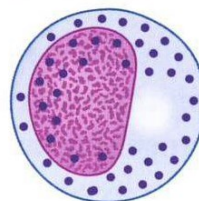


<https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2308511120>

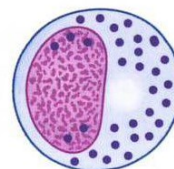
Granulopoéza

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

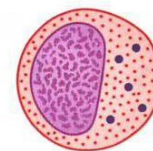
	CFU-G	→	MyBl	→	PMy	→	My, nezralý	→	My, zralý	→	MMy	→	tyčka	→	Segm
procesy vývoje	proliferace (cca 4 mitozy) + diferenciaci						diferenciaci			krev	inter- sticiu				
trvání	cca 5 d						cca 3 d			< 1 d	2–3 d				



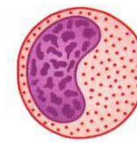
PMy



My, nezralý



My, zralý



MMy



tyčka

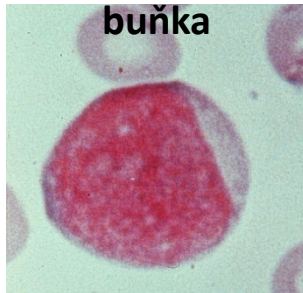


Segm

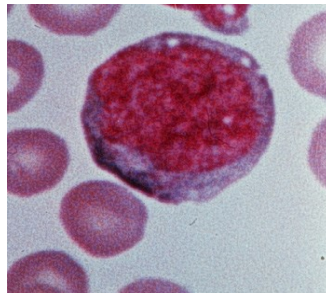
Monocytopoéza

- 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

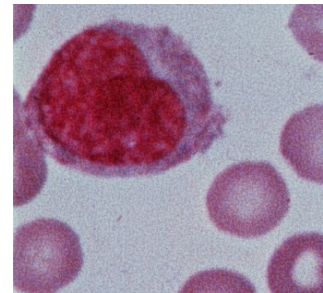
kmenová
buňka



myeloblast



promonocyt

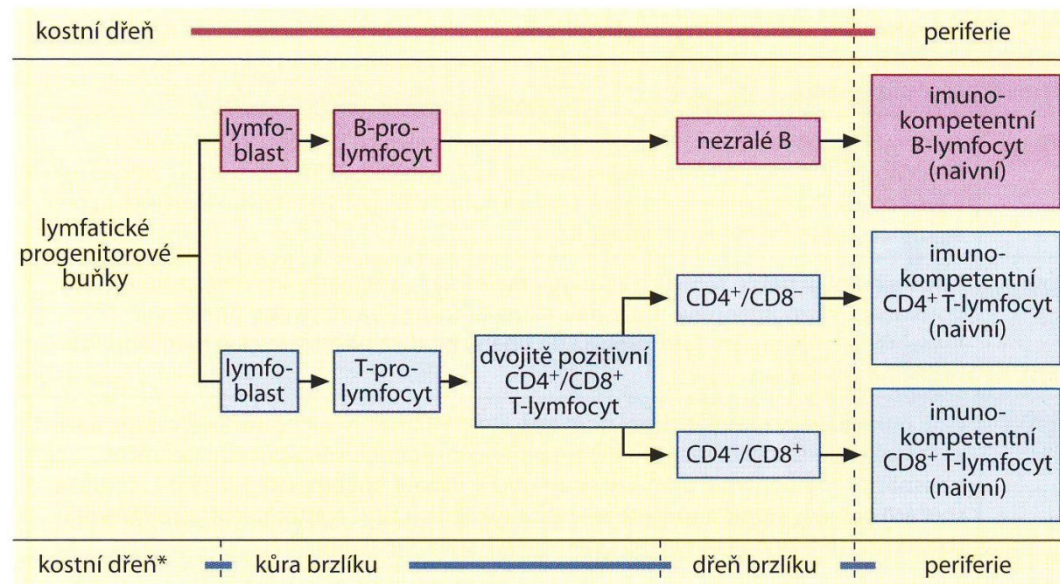


monocyt



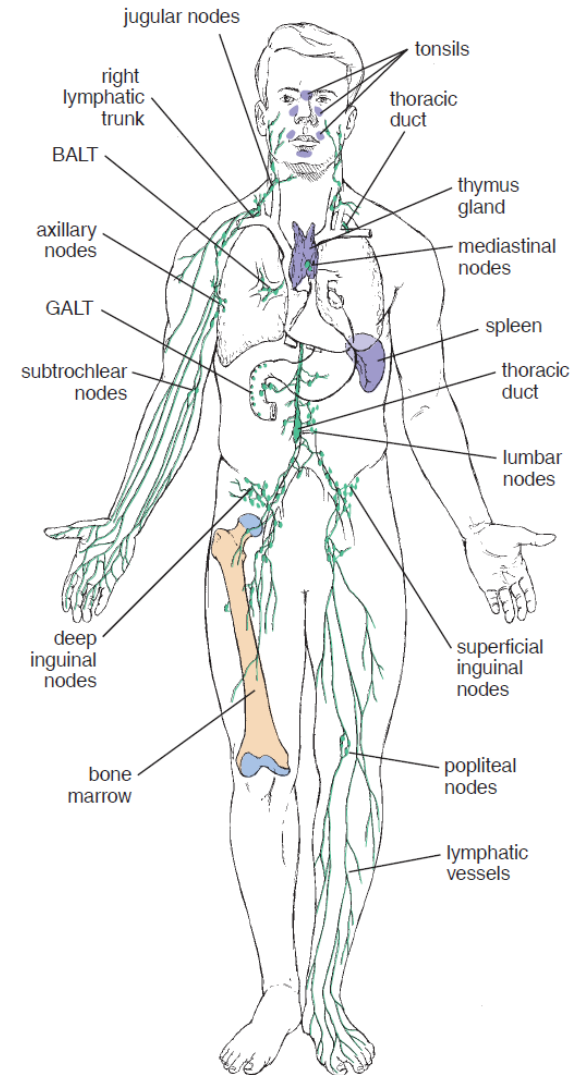
Lymfocytopoéza

- 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



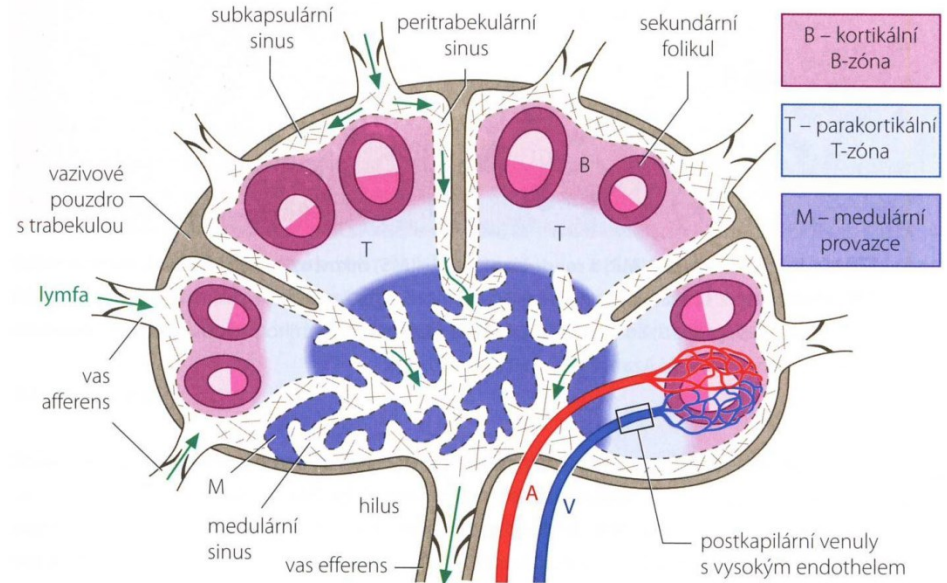
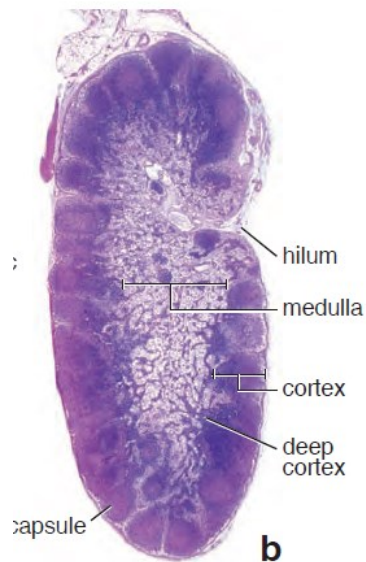
Lymfatické orgány

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



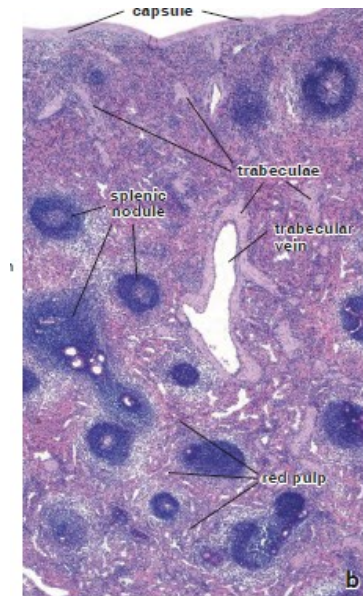
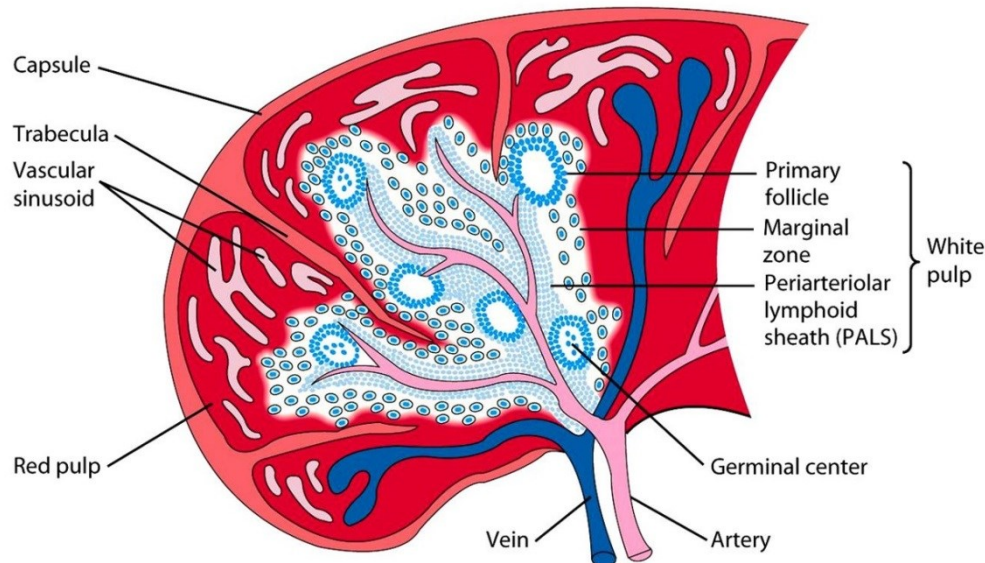
Lymfatické uzliny

- ◆ Řetězec filtračních jednotek v systému lymfatických cév
 - ◆ vklešina = 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

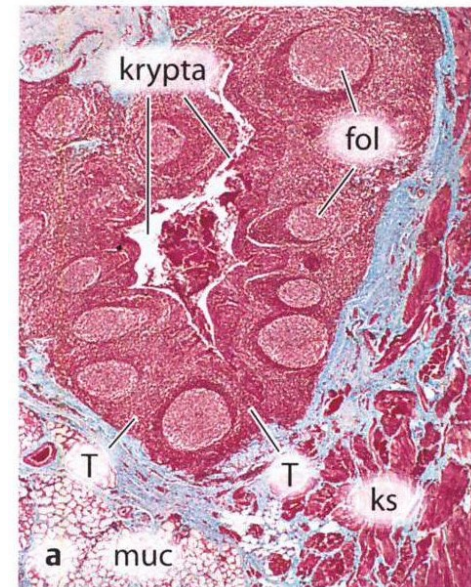
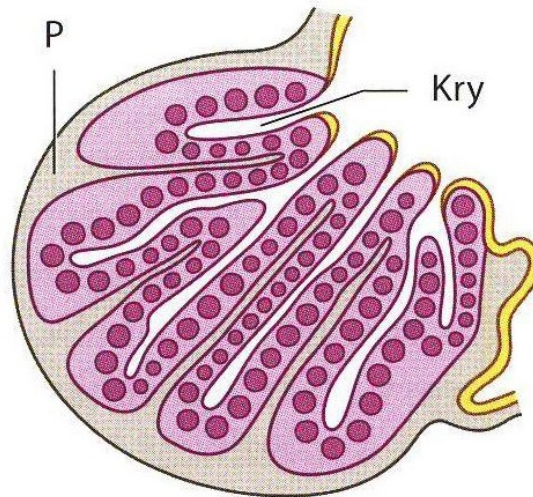
- ◆ Filtrační a imunitní orgán v krevním oběhu
- ◆ Funkce
 - ◆ Odstranění zestárých a poškozených erytrocytů
 - ◆ Červená pulpa (vazivové retikulum protkané venózními sinusy)
 - ◆ Makrofágy pohlcují fagocytované erytrocyty – recyklace
 - ◆ Hemové železo navázáno na ferritin, transport pomocí transferinu do erythropoetických 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

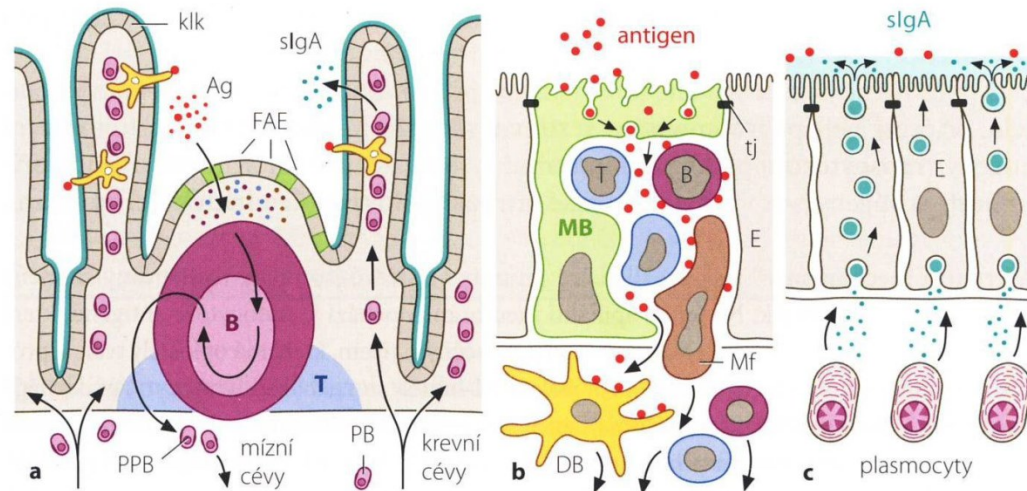
▶ Patrová mandle

- ▶ 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



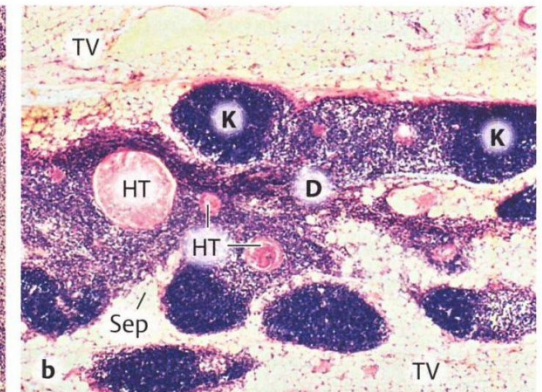
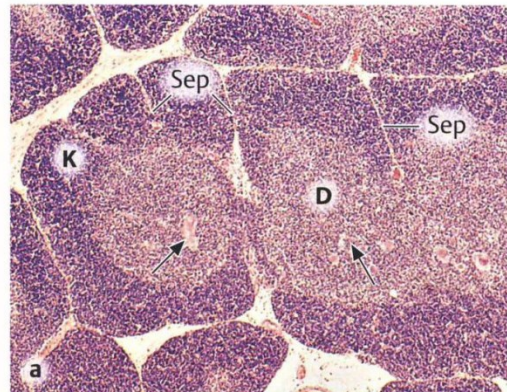
Slizniční lymfatická tkáň

- 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
 - Povrch epitelu nad folikulem (FAE) neobsahuje mucinózní vrstvu (nebo jen tenkou), chybí klky a pohárkové buňky
 - M-buňky bez mikrokلكů, dochází na nich k endocytóze antigenů
 - Enterocyty transportují protilátky transcytózou
 - Protilátky IgA jsou tvořeny subepitelenými plasmatickými buňkami
 - IgA spolu se sekretem exokrinních žláz vážou antigeny a mikroorganismy – shlukování a opsonizace
 - IgA i v mateřském mléce – pasivní imunizace trávicího a dýchacího traktu kojení



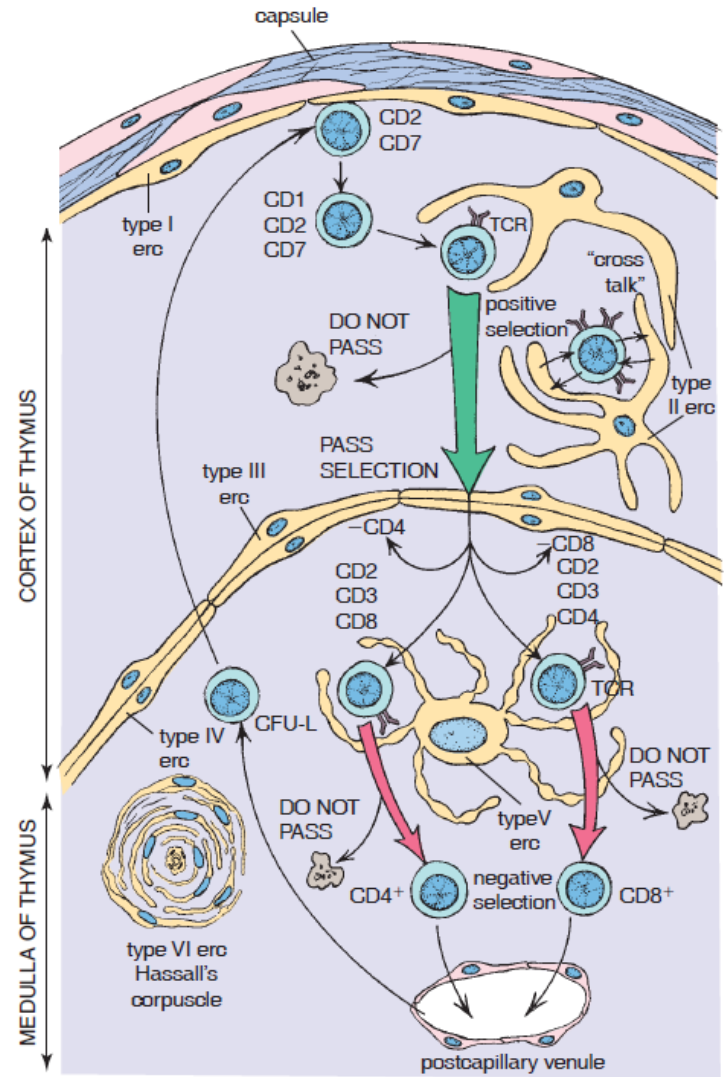
Thymus, brzlík

- ▶ Umístěn v mezihrudí, za sternem před perikardiem
- ▶ Maxima rozvoje dosahuje v dětství (cca 20-30g)
- ▶ S koncem puberty rychlá involuce, zůstávají 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 prekursorsy T-lymfocytární linie – thymocyty
- ▶ Vyžívání imunokompetentních T-lymfocytů pod vlivem diferenciačních faktorů a kontaktu s retikulárním epitelu thymu, autotolerance



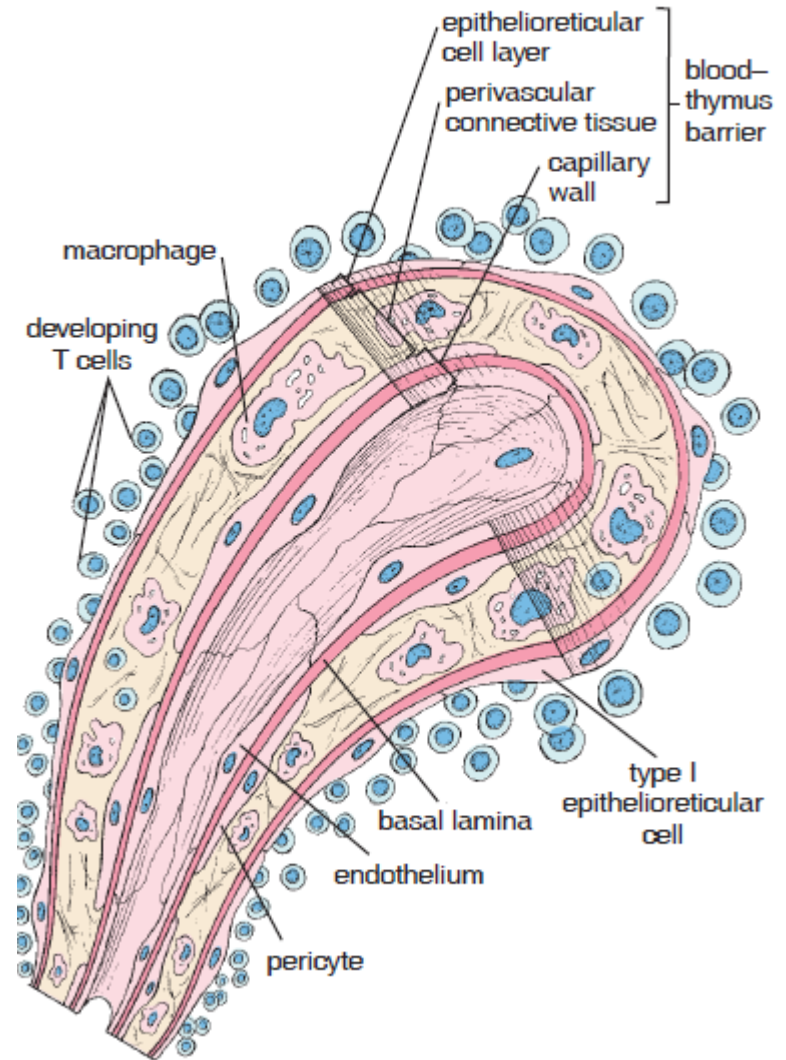
Thymus, brzlík

- Retikulární epitelové buňky – obsahují CK vlákna, jsou spojeny desmosomy,
- Vrstva u kortexu – obaluje thymocyty – ‚pečovateľské‘ 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)

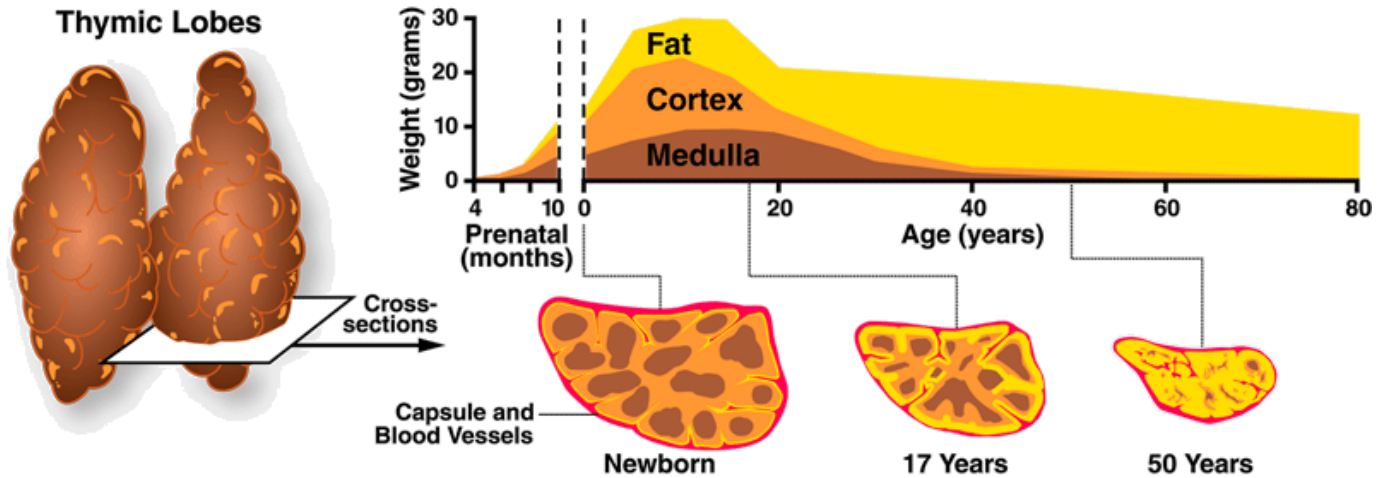
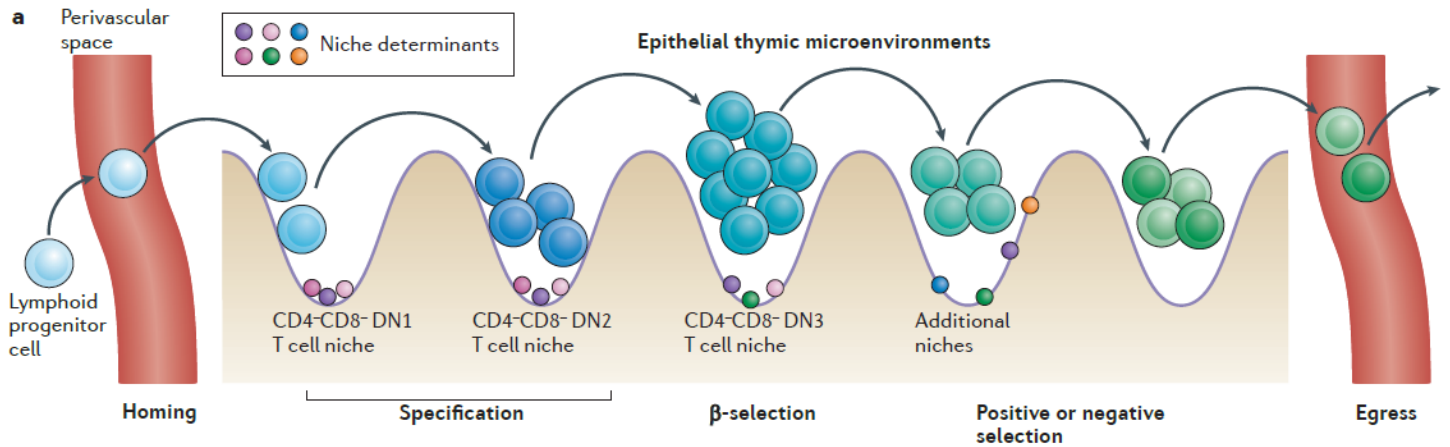


Hemothymová bariéra

- 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



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 níže 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