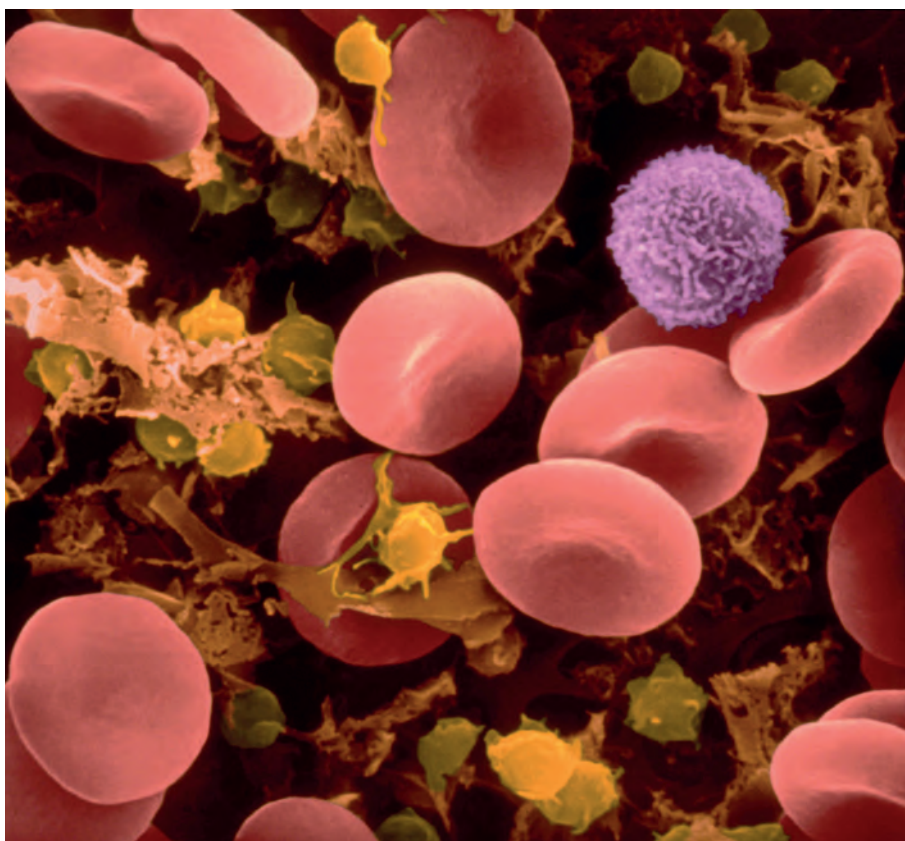


Miroslav Penka, Eva Tesařová a kolektiv

Hematologie a transfuzní lékařství I

Hematologie



Miroslav Penka, Eva Tesařová a kolektiv

Hematologie a transfuzní lékařství I

Hematologie

Upozornění pro čtenáře a uživatele této knihy

Všechna práva vyhrazena. Žádná část této tištěné či elektronické knihy nesmí být re-produkována a šířena v papírové, elektronické či jiné podobě bez předchozího písemného souhlasu nakladatele. Neoprávněné užití této knihy bude trestně stíháno.

Prof. MUDr. Miroslav Penka, CSc., MUDr. Eva Tesařová a kolektiv

HEMATOLOGIE A TRANSFUZNÍ LÉKAŘSTVÍ I

HEMATOLOGIE

Vedoucí autorského kolektivu:

Prof. MUDr. Miroslav Penka, CSc., oddělení klinické hematologie FN Brno

Autorský kolektiv:

MUDr. Jan Blatný, Ph.D., oddělení klinické hematologie FN Brno*

RNDr. Ludmila Bourková, oddělení klinické hematologie FN Brno

MUDr. Alena Buliková, Ph.D., oddělení klinické hematologie FN Brno

Mgr. Zbyněk Čech, oddělení klinické hematologie FN Brno

Mgr. Magdaléna Jelínková, oddělení klinické hematologie FN Brno*

MUDr. Jarmila Kissová, oddělení klinické hematologie FN Brno

MUDr. Zdeněk Kořístek, Ph.D., Interní hematookologická klinika LF MU a FN Brno

Mgr. Lucie Kovářová, Ph.D., oddělení klinické hematologie FN Brno

Doc. RNDr. Petr Kuglík, CSc., Ústav experimentální biologie PěF MU

MUDr. Miloslava Matýšková, CSc., oddělení klinické hematologie FN Brno

MUDr. Jan Novotný, Ph.D., oddělení klinické hematologie FN Brno

Prof. MUDr. Miroslav Penka, CSc., oddělení klinické hematologie FN Brno

Doc. RNDr. Šárka Pospíšilová, Ph.D., Centrum molekulární biologie a genové terapie,

Interní hematookologická klinika LF MU a FN Brno

Bc. Markéta Slánská, oddělení klinické hematologie FN Brno*

MUDr. Petr Smejkal, Ph.D., oddělení klinické hematologie FN Brno

Bc. Irena Trnavská, oddělení klinické hematologie FN Brno

MUDr. Ondřej Zapletal, oddělení klinické hematologie FN Brno*

RNDr. Jiřina Zavřelová, oddělení klinické hematologie FN Brno

* nyní oddělení dětské hematologie FN Brno

Recenze:

Doc. RNDr. Miroslav Pecka, CSc.

Prof. MUDr. Ladislav Chrobák, CSc.

Vydání odborné knihy schválila Vědecká redakce nakladatelství Grada Publishing, a.s.

© Grada Publishing, a.s., 2011

Obrázky dodali autoři.

Cover Photo © fotobanka allphoto, 2011

Vydala Grada Publishing, a.s., U Průhonu 22, Praha 7

jako svou 4577. publikaci

Odpovědná redaktorka PhDr. Alena Palčová

Sazba a zlom Jana Řeháková, DiS.

Počet stran 424 + 64 stran barevných příloh

1. vydání, Praha 2011

Vytiskly Tiskárny Havlíčkův Brod, a. s.

Názvy produktů, firm apod. použité v knize mohou být ochrannými známkami nebo registrovanými ochrannými známkami příslušných vlastníků, což není zvláštním způsobem vyznačeno.

Postupy a příklady v této knize, rovněž tak informace o lécích, jejich formách, dávkování a aplikaci jsou sestaveny s nejlepším vědomím autorů. Z jejich praktického uplatnění ale nevyplývají pro autory ani pro nakladatelství žádné právní důsledky.

ISBN 978-80-247-3459-0 (tištěná verze)

ISBN 978-80-247-7192-2 (elektronická verze ve formátu PDF)

ISBN 978-80-247-7193-9 (elektronická verze ve formátu EPUB)

Obsah

Předmluva	13
Poděkování	14
1 Fyziologie krvetvorby	15
1.1 Vznik a vývoj krvetvorby (<i>J. Novotný</i>)	15
1.2 Vývoj krevních buněk (<i>J. Novotný</i>)	15
1.3 Tvorba a vývoj červených krvinek (erytropoéza) (<i>J. Novotný, M. Jelínková</i>)	17
1.4 Hemoglobin (<i>J. Novotný</i>)	20
1.5 Tvorba a vývoj bílých krvinek (<i>J. Novotný</i>)	21
1.6 Tvorba a vývoj trombocytů (<i>J. Novotný, M. Penka</i>)	27
1.7 Hodnocení (<i>J. Novotný</i>)	29
1.8 Klinický význam (<i>J. Novotný</i>)	29
2 Fyziologie krevního srážení	31
2.1 Cévy, cévní systém (<i>J. Novotný</i>)	31
2.1.1 Cévní stěna	31
2.1.2 Endotel	32
2.2 Primární hemostáza (<i>M. Penka</i>)	33
2.3 Systém plazmatických faktorů (<i>M. Matýšková, J. Zavřelová</i>)	36
2.3.1 Systém koagulačních faktorů	38
2.3.1.1 Koagulační faktory	38
2.3.1.2 Vlastní proces koagulace	43
2.3.2 Systém přirozených inhibitorů (<i>M. Matýšková, J. Zavřelová</i>)	45
2.3.2.1 Serpiny	46
2.3.2.2 Systém proteinu C	49
2.3.2.3 Kuniny	50
2.3.2.4 Metaloproteinázy	50
2.3.2.5 Nespecifické inhibitory	50
2.3.3 Fibrinolytický systém (<i>J. Novotný, M. Matýšková</i>)	51
2.3.3.1 Plazminogen, plazmin	52
2.3.3.2 Aktivátory plazminogenu	52
2.3.3.3 Inhibitory v systému fibrinolýzy	52
2.3.3.4 Průběh fibrinolýzy	54
2.3.3.5 Funkce fibrinolytického systému	55
3 Laboratorní diagnostika v hematologii	61
3.1 Morfologická vyšetření (<i>L. Bourková, M. Jelínková, I. Trnavská, M. Slánská</i>)	61
3.1.1 Hematologické analyzátoři	61
3.1.1.1 Princip impedanční analýzy	61
3.1.1.2 Princip optické analýzy	61
3.1.1.3 Jiné analytické metody	62
3.1.2 Vyšetření na hematologických analyzátořích	62

3.1.2.1	Parametry krevního obrazu	62
3.1.2.2	Hodnocení krevního obrazu	62
3.1.2.3	Kontroly krevního obrazu	65
3.1.2.4	Stanovení počtu retikulocytů	66
3.1.3	Morfologická charakteristika hematopoetických buněk.....	67
3.1.3.1	Erytrocytární vývojová řada	67
3.1.3.2	Leukocytnární vývojová řada	68
3.1.3.3	Megakaryocytární vývojová řada	71
3.1.4	Nátěry periferní krve a kostní dřeně	72
3.1.4.1	Zhotovení nátěrů	72
3.1.4.2	Barvení nátěrů	72
3.1.4.3	Hodnocení nátěrů periferní krve	72
3.1.4.4	Hodnocení nátěrů kostní dřeně	81
3.1.4.5	Kontrola kvality barvení nátěrů	81
3.2	Základní vyšetření pro hemolytické anémie (<i>L. Bourková, M. Jelínková</i>) ...	81
3.2.1	Obecné testy	81
3.2.1.1	Osmotická rezistence erytrocytů.....	81
3.2.1.2	Hemosiderin v moči	82
3.2.1.3	Volný hemoglobin v plazmě/séru	82
3.2.1.4	Test autohemolýzy	82
3.2.2	Testy na průkaz abnormálních hemoglobinů	83
3.2.2.1	Stanovení fetálního hemoglobinu (HbF)	83
3.2.2.2	Stanovení hemoglobinu A ₂	83
3.2.2.3	Elektroforéza hemoglobinu	84
3.2.3	Testy na průkaz nedostatku enzymů	84
3.2.3.1	Barvení Heinzových tělísek	84
3.2.3.2	Glukóza-6-fosfát dehydrogenáza	85
3.2.3.3	Pyruvátkináza	85
3.3	Cytochemická vyšetření (<i>L. Bourková, M. Jelínková, I. Trnavská, M. Slánská</i>).....	85
3.3.1	Barvení zásobního železa	86
3.3.2	Barvení neutrofilní alkalické fosfatázy	86
3.3.3	Barvení peroxidázy	87
3.3.4	Barvení sudanovou černí B.....	88
3.3.5	Barvení chloracetátesterázy	88
3.3.6	Barvení nespecifických esteráz (s blokádou fluoridem).....	88
3.3.7	PAS (periodic acid – Schiff)	89
3.3.8	Barvení kyselých fosfatázy (s rezistencí na kyselinu L vinnou).....	90
3.4	Vyšetření metodou klonálních kultivací (<i>L. Bourková</i>).....	90
3.5	Hemokoagulační laboratorní vyšetření (<i>J. Zavřelová, M. Jelínková, M. Matýšková</i>).....	91
3.5.1	„Bed-side“ testy	93
3.5.1.1	Doba srážlivosti plné krve (Lee White)	93
3.5.1.2	Trombelastograf.....	93
3.5.2	Primární hemostáza	95
3.5.2.1	Počet a morfologie trombocytů	95
3.5.2.2	Doba krvácení	95

3.5.2.3	Rezistence kapilár (Rumpelův-Leedův test)	96
3.5.2.4	Test konzumpce protrombinu	96
3.5.2.5	Vyšetření PFA-100	96
3.5.2.6	Agregace trombocytů	96
3.5.2.7	Vyšetření retrakce	97
3.5.2.8	Mikropartikule	97
3.5.3	Systém plazmatických koagulačních faktorů	98
3.5.3.1	Test konzumpce protrombinu	98
3.5.3.2	Protrombinový test (PT) – tromboplastinový test podle Quicka	98
3.5.3.3	Aktivovaný parciální tromboplastinový test (APTT).....	99
3.5.3.4	Trombinový test (TČ, TT)	99
3.5.3.5	Reptilázový test (ReT)	100
3.5.3.6	Korekční testy	100
3.5.3.7	Trombin generační test (TGT, TGA)	100
3.5.3.8	Stanovení koncentrace fibrinogenu	100
3.5.3.9	Stanovení solubilních komplexů fibrinových monomerů (SFM)	101
3.5.3.10	Stanovení koagulačních faktorů	101
3.5.3.11	Stanovení faktoru XIII	102
3.5.4	Přirozené inhibitory	103
3.5.4.1	Vyšetření antitrombinu (AT).....	103
3.5.4.2	ProC® Global	103
3.5.4.3	Vyšetření APC rezistence (APC-R).....	104
3.5.4.4	Vyšetření proteinu C	105
3.5.4.5	Vyšetření proteinu S	105
3.5.5	Testy fibrinolytického systému	105
3.5.5.1	Euglobulinová fibrinolýza	105
3.5.5.2	Stanovení koncentrace fibrinogenu	106
3.5.5.3	Vyšetření FDP	106
3.5.5.4	Vyšetření D-dimerů	106
3.5.5.5	Stanovení solubilních komplexů fibrinových monomerů (SFM)	107
3.5.5.6	Stanovení α_2 -antiplazminu.....	107
3.5.5.7	Stanovení plazminogenu	107
3.5.5.8	Stanovení PAI-1	107
3.5.5.9	Stanovení tPA	107
3.5.5.10	Venookluzivní testy	108
3.5.6	Identifikace získaného inhibitoru	108
3.5.6.1	Korekční testy	108
3.5.6.2	Cirkulující antikoagulans	108
3.5.6.3	Kvantitativní průkaz specifického inhibitoru	108
3.5.6.4	Identifikace lupus antikoagulans	109
3.5.7	Molekulární markery	111
3.5.7.1	Markery aktivace endotelu	111
3.5.7.2	Markery aktivace trombocytů	111
3.5.7.3	Markery aktivace koagulace	111

3.5.7.4	Markery aktivace fibrinolýzy	111
3.5.8	Diagnostika von Willebrandovy choroby	111
3.5.8.1	Vyšetření koncentrace VWF (VWF:Ag)	112
3.5.8.2	Vyšetření funkční aktivity VWF	112
3.5.8.3	Diskriminační testy	112
3.5.8.4	Molekulární diagnostika	113
3.5.9	Diagnostika HIT	113
3.5.9.1	Funkční testy	113
3.5.9.2	Imunologické testy	113
3.5.10	Sledování léčby	114
3.5.10.1	Heparin	114
3.5.10.2	Pentasacharidy	114
3.5.10.3	Deriváty dikumarinu	114
3.5.10.4	Antitrombocytární léčba	114
3.5.10.5	Trombolýza	115
3.5.10.6	Substituční léčba	115
3.6	Flowcytometrické vyšetření (<i>L. Kovářová</i>).....	115
3.6.1	Princip metody	115
3.6.2	Hodnocení	116
3.6.3	Imunofenotypizace	116
3.6.4	Příklady uplatnění v hematologii	117
3.6.4.1	Neonkologické indikace	117
3.6.4.2	Hematoonkologické indikace	117
3.7	Cytogenetické a molekulárně genetické vyšetření (<i>Š. Pospíšilová, Z. Čech, P. Kuglík, L. Kovářová</i>)	118
3.7.1	Genetická informace buňky	118
3.7.2	Změny genetické informace	120
3.7.3	Cytogenetické vyšetření.....	121
3.7.3.1	Metody klasické cytogenetiky: G pruhování	121
3.7.3.2	Metody molekulární cytogenetiky	122
3.7.4	Molekulárně biologické metody	124
3.7.4.1	Separace buněk, izolace nukleových kyselin	124
3.7.4.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	126
3.7.4.3	Metody detekce mutací	142
3.7.4.4	Metody analýzy proteinů	146
3.7.4.5	Genomika a proteomika	148
4	Fyziologické hodnoty krevního obrazu a koagulačních testů	159
4.1	Referenční meze krevního obrazu, diferenciálního počtu leukocytů a koagulačních testů u dospělých (<i>J. Kissová</i>)	159
4.2	Referenční meze krevního obrazu a koagulačních testů u dětí (<i>J. Blatný</i>) ...	160
5	Neonkologická hematologie	163
5.1	Anémie (chudokrevnost) (<i>A. Buliková, pediatrický dodatek S. Köhlerová</i>)	163
5.1.1	Anémie z poruchy tvorby erytrocytů	164
5.1.1.1	Anémie z poruchy syntézy hemoglobinu	164

5.1.1.2.	Anémie z poruchy syntézy DNA – megaloblastové anémie	175
5.1.1.3	Anémie ze selhání hemopoetických buněk – aplastické anémie	179
5.1.1.4	Anémie spojené s poruchou vyzrávání krvinek – dysplastické (dyserytroetické) anémie	183
5.1.2	Anémie ze zvýšené ztráty erytrocytů	185
5.1.2.1	Korpuskulární hemolytické anémie	187
5.1.2.2	Extrakorpuskulární hemolytické anémie	203
5.1.3	Akutní posthemoragická anémie	207
5.2	Poruchy leukocytárního systému (<i>M. Penka</i>)	208
5.2.1	Kvantitativní poruchy leukocytárního systému	208
5.2.1.1	Změny počtu jednotlivých typů bílých krvinek	208
5.2.1.2	Choroby počtu leukocytárního makrofágového systému	214
5.2.2	Kvalitativní poruchy leukocytárního systému	219
5.2.2.1	Morfologické změny leukocytů	219
5.2.2.2	Funkční změny leukocytů	220
5.3	Poruchy primární hemostázy – poruchy krevního srážení z destičkových příčin (<i>M. Penka, M. Matýšková</i>)	222
5.3.1	Kvantitativní poruchy primární hemostázy	224
5.3.1.1	Trombocytopenie	224
5.3.1.2	Trombocytóza	232
5.3.2	Kvalitativní poruchy primární hemostázy – trombocytopatie	233
5.3.2.1	Vrozené trombocytopatie	234
5.3.2.2	Získané trombocytopatie	236
5.3.3	Substituční léčba krevními destičkami	239
5.3.4	Medikamentózní hemostyptická léčba	239
5.4	Vrozené krvácivé stavy (<i>P. Smejkal</i>)	241
5.4.1	Von Willebrandova choroba	241
5.4.2	Hemofilie	244
5.4.3	Vrozené defekty ostatních koagulačních faktorů	248
5.4.4	Kombinované defekty	250
5.4.5	Pediatrický dodatek (<i>J. Blatný</i>)	250
5.5	Trombofilie (<i>M. Matýšková</i>)	251
5.5.1	Pediatrický dodatek (<i>J. Blatný</i>)	255
5.6	Získané poruchy krevního srážení (<i>M. Matýšková, A. Buliková</i>)	256
5.6.1	Získané poruchy krevního srážení bez přítomnosti inhibitoru	257
5.6.1.1	Nedostatek vitamínu K	257
5.6.1.2	Jaterní postižení	258
5.6.1.3	Metabolický syndrom	258
5.6.1.4	Uremie	258
5.6.1.5	Nádorová onemocnění	259
5.6.1.6	Paraproteinemie	259
5.6.1.7	Trauma	260
5.6.1.8	Sepse	260
5.6.1.9	Virové infekce	261
5.6.1.10	Syndrom diseminované intravaskulární koagulace (DIC)	262
5.6.1.11	Biologické látky, např. hadí jedy	266

5.6.2	Získané poruchy krevního srážení z poruchy plazmatických faktorů vznikající na imunitním podkladě.....	266
5.6.2.1	Choroby provázené přítomností specifických autoprotilátek/inhibitorů	267
5.6.2.2	Nespecificky působící antikoagulancia	271
5.7	Sledování antitrombotické léčby (<i>M. Penka, J. Zavřelová</i>).....	275
5.7.1	Antikoagulační léčba	275
5.7.2	Antitrombotická léčba heparinem	276
5.7.3	Antikoagulační léčba perorálními preparáty	277
5.7.4	Antiagregační léčba	277
5.7.5	Trombolytická léčba	278
5.7.6	Substituční léčba	278
6	Onkologická hematologie	289
6.1	Akutní leukemie (<i>A. Bulíková</i>).....	291
6.1.1	Akutní myeloidní leukemie (AML).....	293
6.1.1.1	Akutní myeloidní leukemie s rekurentní genetickou abnormitou (nejčastěji s balancovanou translokací či inverzí)...	296
6.1.1.2	Akutní myeloidní leukemie spojená s dysplastickými změnami	301
6.1.1.3	Myeloidní neoplazie spojené s léčbou	302
6.1.1.4	Akutní myeloidní leukemie jinak neurčené	304
6.1.1.5	Myeloidní sarkomy	308
6.1.1.6	Myeloidní proliferace spojené s Downovým syndromem	308
6.1.1.7	Blastické neoplazie z plazmatických dendritických buněk	308
6.1.2	Akutní leukemie nejasného původu	310
6.1.3	Akutní lymfoblastické leukemie, respektive prekurzorové lymfoblastické neoplazie	311
6.1.3.1	B lymfoblastické leukemie/lymfomy jinak nespecifikované (B-ALL/LBL)	311
6.1.3.2	B lymfoblastické leukemie/lymfomy s rekurentní genetickou abnormitou	312
6.1.3.3	T lymfoblastické leukemie/lymfomy (T-ALL/LBL).....	313
6.2	Myelodysplastický syndrom (MDS) (<i>J. Kissová</i>).....	314
6.2.1	Refrakterní cytopenie s unilineární dysplazií (RCUD)	319
6.2.2	Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (RARS)	320
6.2.3	Refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií (RCMD)	321
6.2.4	Refrakterní anémie s excesem blastů (RAEB)	321
6.2.5	Myelodysplastický syndrom s izolovanou delecí 5q	322
6.2.6	Myelodysplastický syndrom, neklasifikovatelný (MDS-U).....	323
6.3	Myeloproliferativní neoplazie a myelodysplasticko/myeloproliferativní neoplazie (<i>J. Kissová, M. Penka</i>).....	323
6.3.1	Myeloproliferativní neoplazie (MPN).....	323
6.3.1.1	Chronická myelogenní leukemie, BCR-ABL1 pozitivní (CML)...	324
6.3.1.2	Chronická neutrofilní leukemie (CNL)	326
6.3.1.3	Pravá polycytemie (PV)	327
6.3.1.4	Primární myelofibróza (PMF)	329

6.3.1.5	Esenciální trombocytémie (ET)	331
6.3.1.6	Chronická eozinofilní leukemie blíže nespecifikovaná (CEL, NOS)	332
6.3.1.7	Mastocytóza	333
6.3.1.8	Myeloproliferativní neoplazie neklasifikovatelné (MPS-U)	333
6.3.2	Myeloidní a lymfoidní neoplazie s eozinofilií a abnormalitami PDGFRA (platelet derived growth factor receptor α), PDGFRB (platelet derived growth factor receptor β) nebo FGFR1 (fibroblast growth factor receptor-1)	334
6.3.2.1	Myeloidní a lymfoidní neoplazie s přestavbou genu PDGFRA ...	334
6.3.2.2	Myeloidní neoplazie s přestavbou genu PDGFRB	335
6.3.2.3	Myeloidní a lymfoidní neoplazie s abnormalitami FGFR1	335
6.3.3	Myelodysplasticko/myeloproliferativní neoplazie (MDS/MPN)	336
6.3.3.1	Chronická myelomonocytární leukemie (CMML)	336
6.3.3.2	Atypická chronická myeloidní leukemie, BCR-ABL1 negativní (aCML)	338
6.3.3.3	Juvenilní myelomonocytární leukemie (JMML)	338
6.3.3.4	Myelodysplasticko/myeloproliferativní neoplazie neklasifikovatelné (MDS/MPN-U)	339
6.3.3.5	Provizorní jednotka WHO 2008: refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty a trombocytózou (RARS-T)	340
6.4	Lymfoproliferativní onemocnění (<i>A. Buliková</i>)	340
6.4.1	Neoplazie ze zralých B buněk	341
6.4.1.1	Chronická lymfatická leukemie/lymfom z malých lymfocytů (CLL/SLL)	342
6.4.1.2	B prolymfocytární leukemie (B PLL)	344
6.4.1.3	Splenický lymfom z B buněk marginální zóny (SMZL)	344
6.4.1.4	Leukemie s vlasatými buňkami (HCL)	345
6.4.1.5	Lymfoplazmocytární lymfom/Waldenströmova makroglobulinemie	345
6.4.1.6	Malignity z plazmatických buněk	346
6.4.1.7	Folikulární lymfom (FL)	348
6.4.1.8	Lymfom z pláštových buněk (MCL)	349
6.4.1.9	Difuzní velkobuněčný B lymfom (DLBCL)	349
6.4.1.10	Burkittův lymfom (BL)	350
6.4.1.11	Ostatní lymfoproliferace ze zralých B lymfocytů	350
6.4.2	Malignity ze zralých T a NK buněk	351
6.4.2.1	Leukemie z velkých granulovaných lymfocytů (LGL-L)	352
6.4.2.2	Agresivní leukemie z NK buněk	352
6.4.2.3	T prolymfocytární leukemie (T-PLL)	353
6.4.2.4	Leukemie/lymfom z T buněk dospělých (HTLV pozitivní) (ATLL)	353
6.4.2.5	Mycosis fungoides (MF) a Sézaryho syndrom (SS)	354
6.4.2.6	Anaplastický velkobuněčný lymfom	354
6.4.2.7	Další zralé T/NK buněčné lymfoproliferace	355
6.4.3	Hodgkinovy lymfomy (HL)	355
6.4.3.1	Klasický Hodgkinův lymfom	356

6.4.3.2	Nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů ...	356
6.5	Hematologické malignity u dětí (<i>O. Zapletal</i>).....	357
6.5.1	Leukemie	358
6.5.2	Lymfomy.....	361
6.6	Onkologická hematologie: transplantace hematopoetických buněk (<i>Z. Kořístek</i>)	361
6.6.1	Principy a indikace transplantací krevetvorby	363
6.6.2	Vyhledání dárce	365
6.6.3	Odběr krevetvorných buněk	366
6.6.4	Podání krevetvorných buněk	368
6.6.5	Časné potransplantační období	369
6.6.6	Období po obnově krevetvorby	370
Zkratky	375
Věcný rejstřík	387
Souhrn	419
Summary	421

Předmluva

Publikace „Hematologie a transfuzní lékařství“ je knihou, která je specificky zaměřená na hematologickou a v hematologii používanou laboratorní diagnostiku. Je účelově zpracována především pro obec zdravotních laborantů. Publikace však může mít pochopitelně širší využití u všech odborníků, laiků, kteří mohou z textů čerpat nové nebo upřesňující poznatky potřebné pro svoji specializaci.

Původně mělo dílo zahrnovat čistě hematologickou problematiku, velmi rychle se ale rozrostlo o příbuzný (a vlastně společný atestační) obor transfuzního lékařství a následně i o problematiku, která s hematologií v laboratorní diagnostice souvisí nebo ji významně doplňuje (molekulární biologie, imunocytologie apod.).

Autorský kolektiv byl sestaven z odborníků vlastního hematologického pracoviště ve FN Brno, kteří se jednotlivými segmenty hematologického zaměření zabývají, a z důvodu co nejširšího pojetí zahrnuje lékaře, ale i další specialisty především z laboratorních oborů, včetně zdravotních laborantů.

Publikace je sestavena ze dvou dílů – samostatné hematologické a samostatné transfuziologické části, každá z nich se svou obrazovou přílohou, ale s jednotným uspořádáním, aby mohly vytvořit dvoudílný kompaktní celek.

Úvodem jsou v hematologické části zpracovány kapitoly se spíše teoretickým a obecným zaměřením, pak následují kapitoly speciální problematiky zaměřené na problémové okruhy jednotlivých systémů, jak bývají v hematologii běžně členěny, včetně tabulek normálních hodnot. Samostatnou přílohu tvoří obrázky významnějších nebo instruktivních nálezů, jejich seznam, seznam zkratk a rejstřík.

I když si jsme vědomi, že ve věku elektronického zpracování textů nemá již knižní podoba publikací svoje dominantní místo, zůstává stále pohotovým zdrojem informací. Je stále dost v oblibě u řady čtenářů, proto jsme se rozhodli ji napsat. Věříme, že své čtenáře nezklameme a přineseme jim to, co hledají a očekávají. Jsme si zároveň vědomi nutnosti inovace ve vcelku časném časovém horizontu a pokusíme se tento požadavek takového zpracování rovněž naplnit.

Čtenářům přejeme, aby jim naše práce – ať již jakkoliv – prospěla, a svým spoluautorům děkují za úsilí a snahu přispět čtenářům ke zmíněnému prospěchu.

Miroslav Penka

Poděkování

Za pomoc při zpracování obrazové dokumentace děkujeme zdravotním laborantkám OKH FN Brno – paní Jaroslavě Hoblové, Monice Antošové, Libuši Antošové.

Autoři kapitoly 3.7 děkují Mgr. Petru Dobešovi z centra molekulární biologie a genové terapie Interní hematoonkologické kliniky FN Brno za pomoc při technické realizaci obrázků 3.39, 3.40, 3.41, 3.42, 3.43, 3.44, 3.50, 3.51, 3.58, 3.62, 3.63, 3.64, 3.65.

Naše poděkování patří i recenzentům prof. MUDr. Ladislavu Chrobákovi, CSc., a doc. RNDr. Miroslavu Peckovi, CSc., za jejich pečlivou a precizní práci, kterou s prostudováním naší publikace měli, a za jejich kritickou shovívavost při zpracování recenze.

Poděkování patří také sponzorům, bez jejichž příspěvní a pomoci by publikace možná sice vznikla, ale byla by neprodejná.

Poděkování patří i všem spoluautorům, kteří se na publikaci podíleli.

1 Fyziologie krvetvorby

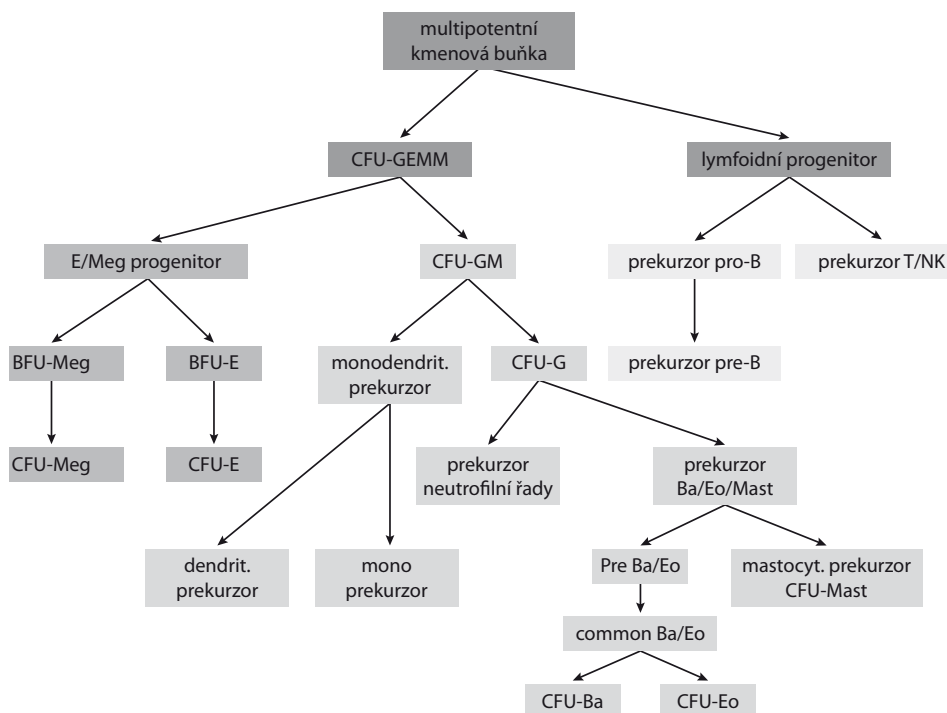
1.1 Vznik a vývoj krvetvorby

Krvetvorba (hemopoéza nebo hematopoéza) je v období **embryonálního vývoje** lokalizována nejprve do oblasti žloutkového vaku, posléze tento úkol přejímají játra a slezina a konečně pak kostní dřev. Za patologických stavů (hemolýzy, myeloproliferativní onemocnění apod.) může dojít k opětovné aktivaci hemopoézy v játrech a slezině a dokonce i v mízních uzlinách byla popsána nelymfoidní hemopoetická aktivita (zvláště u myeloproliferací). Hemopoéza vznikající v oblasti žloutkového vaku z embryonálních kmenových buněk diferencujících se v kmenové buňky krvetvorby představuje mezoblastové období, začínající asi 14.–20. den embryonálního vývoje. Vytvářejí se ostrůvky primitivních hemopoetických buněk, lemovaných endoteliemi (area vasculosa). Asi ve 4. týdnu života se primitivní cévy žloutkového vaku propojí s cévním systémem embrya. Mezoblastové období trvá asi do 10. týdne nitroděložního života, zároveň se po 6. týdnu vývoje objevuje krvetvorba v mezenchymu mezi hepatocyty a posléze i ve slezině (hepatolienální období). Od 20. týdne nitroděložního vývoje se krvetvorba přesunuje do kostní dřev. Hlavním **hemopoetickým orgánem je kostní dřev**, je zde přítomen „pool“ (anglicky zásoba, termín se v odborném tisku o kmenových buňkách běžně používá) **hemopoetických kmenových buněk** – pluripotentní kmenová buňka pro všechny řady nelymfoidní i lymfoidní, kmenová buňka pro lymfoidní řadu, multipotentní kmenová buňka pro všechny nelymfoidní řady CFU-GEMM (colony forming unit – granulocytes, erythrocytes, monocytes/macrophages, megakaryocytes), zralější kmenové buňky v podobě společných prekurzorů pro erytroidní a megakaryocytární linii a pro granulocytární/monocytární linii. Primitivní i vyzrálější kmenové buňky podléhají tzv. **asymetrickému dělení**, kdy jedna z dceřiných buněk je identická s mateřskou kmenovou buňkou (self renewal – samoobnovování kmenových buněk) a druhá se dále diferencuje.

1.2 Vývoj krevních buněk

Multipotentní (totipotentní) kmenová buňka jednak v kostní dřeví udržuje relativně stálý počet těchto prekurzorů (self renewal) a na druhé straně dává vzniknout zralším kmenovým buňkám, tzv. **committed cells**. Každá krvetvorná řada pak vychází z kmenových buněk pro jednotlivé linie. Eozinofilní a bazofilní řada a navíc i vývoj tkáňových bazofilů vychází ze specifických CFU (CFU-Eo, CFU-Ba a CFU-mast). Lymfoidní řada pak vychází ze společné kmenové buňky pro B a T řadu a NK cells (natural killer). Vývoj krvetvorby v časných fázích (nezralé kmenové buňky) zachycuje obrázek 1.1. Hemopoéza je pod kontrolu řady interleukinů (IL), CSF (colony-stimulating factors) a navíc zde hrají roli interakce kmenových buněk se stromatem hemopoetických orgánů – jde o tzv. hemopoetické indukční mikroprostředí (HIM). Buněčné elementy HIM tvoří monocyty/makrofágy, endotelie, retikulární buňky aj. umístěné v extracelulární matrix. Teprve souhrou všech těchto faktorů

je umožněna normální hemopoéza. Poruchy na úrovni kmenových buněk a/nebo HIM mohou vyústit v nejrůznější patologické stavy (dřeňové útlumy, myelofibrózy, myelodysplazie, akutní hemoblastózy apod.). Výzkum v oblasti kmenových buněk (a nejen hemopoetických) velmi pokročil a dotýká se jak otázek maligního bujení, tak možnosti náhrady tkání (v našem případě hematopoézy) vhodně manipulovanými kmenovými prekurzory.



Obr. 1.1 Časný vývoj krvetvorby

Na obrázku je znázorněna časná hematopoéza. Jednotlivé prekurzorové buňky nejsou identifikovatelné světelnou mikroskopií. Ze znázorněných prekurzorů se pak diferencují zralejší elementy v podobě proerytroblastů, promegakaryoblastů, myeloblastů a elementů T, B nebo nulových lymfocytů. Rovněž jsou znázorněna časná stadia diferenciac mastocytární a dendritické linie. Kmenové buňky se dělí asymetricky – v jednu identickou kmenovou buňku (self renewal) a v committed cell (buňku s další diferenciací). Tak je udržována zásoba (pool) kmenových buněk i diferenciac hematopoézy.

CFU – colony forming unit, BFU – burst forming unit, GEMM – granulocytární, erytroidní/megakaryocytární, monocytární, GM – granulocytární a monocytární, T/NK – T a NK lymfocyty, Meg – megakaryocytární

Kmenové buňky hematopoézy lze studovat řadou metod, nejpřínosnějšími jsou různé kulturační metody in vitro, kdy se využívá jednak různé komponovaných kulturačních médií, a pak i sledování odpovědi na nejrůznější růstové faktory a/nebo jejich kombinace. Každý růstový faktor se váže na specifické receptory, exprimované na povrchu různých hemopoetických prekurzorů, a tím je dána specifčnost jeho působení. Mezi **růstové faktory hemopoézy** patří interleukiny (IL) – IL-2, 3, 4, 5, 6,

7, 9, 11, 12, 15, dále erythropoetin (EPO), trombopoetin (TPO), GM-CSF (granulocytární a makrofágové kolonie stimulující faktor), G-CSF (granulocytární kolonie stimulující faktor) c-kit ligand neboli stem cell factor (SCF) a řada dalších. Některé z růstových faktorů se již vyrábějí rekombinantní technologií (vnesením genů kódujících tyto faktory, do vhodných buněk v tkáňových kulturách) a jsou užívány léčebně (např. EPO, TPO a jeho analoga, G-CSF).

Kmenové buňky, kultivované ve vhodných médiích, se mohou dále zkoumat na ultramikroskopické úrovni, průtokovou cytometrií s eventuálním cell-sortingem (přístrojovým sběrem zvolených elementů), transfekcí do vhodných linií pokusných zvířat, sledováním aktivace různých genů detekcí specifických mRNA (messenger ribonukleových kyselin), multi-array analýzou (sledováním aktivace mnoha genů najednou) apod. Jisté struktury na povrchu (v buněčné membráně) jednotlivých řad nám mohou pomoci v detekci diferenciaci těchto elementů. Jsou to nejčastěji tzv. **CD znaky** (clusters of differentiation). Například CD2 je znakem T lymfocytů, CD19 B lymfocytů, CD14 monocytů, CD15 granulocytů, CD16 NK buněk a glykoforin A erytroidní řady (CD235a). Pro kmenové buňky je charakteristickým znakem CD34. Více jak 99 % dřevných elementů je CD34 negativních, avšak jen určitá část CD34 pozitivních buněk představuje nezralé kmenové buňky. O CD znacích blíže viz kapitola o flow cytometrii.

Mechanismy vedoucí jednak k nutnému samoobnovování poolu multipotentních buněk a na druhé straně vedoucí k diferenciaci v „committed cells“ jsou jen částečně známy a jejich přesnějším poznáním by mohlo dojít k pokroku v diagnostice i léčbě např. v oblasti hemoblastóz nebo dřevných útlumů.

V současnosti zaznamenáváme výrazný posun v poznacích o hierarchii krvetvorby, např. se zdá, že kmenové buňky pro makrofágy a dendritické buňky lze detekovat v časných fázích lymfoidního (nemyeloidního) vývoje.

1.3 Tvorba a vývoj červených krvinek (erythropoéza)

Erythropoéza vychází ze společné linie (kmenové buňky) s megakaryopoézou a dále samostatně postupuje od BFU-E (burst forming unit-erythropoesis) přes CFU-E k již morfologicky diferencovatelným proerytroblastům. Další maturace pak probíhá přes bazofilní, polychromatofilní a oxyfilní erytroblasty k bezjaderným retikulo-cytům, které jsou vyplavovány z kostní dřevě do periferní krve. Jaderné erytroblasty se v periferní krvi objevují pouze za patologických stavů (vystupňovaná hemolýza, velké ztráty krve, akutní i chronické hemoblastózy, metastázy do kostní dřevě apod.). Celkově jsou erythropoéza a zralé erytrocyty označovány pojmem **erytron**. V erytronu je udržována dynamická rovnováha mezi zánikem a tvorbou červených krvinek. Hlavním regulačním proteinem erytronu je v ledvinách produkovaný **erythropoetin (EPO)**. Za patologických okolností může nerovnováha v tomto systému vést k anémii nebo erytrocytóze. Nejčasnější identifikovanou buňkou erytronu je tzv. **BFU-E (burst forming unit-erythroid)**. Tyto erytroidní prekurzory při kultivaci in vitro vytvářejí velké kolonie (proto burst = výbuch) dobře hemoglobinizovaných erytroblastů. Zpočátku je tento růst nezávislý na erythropoetinu, ale je zcela závislý na IL-3, později směsi cytokinů EPO, TPO, GM-CSF a stem cell faktoru. Detaily regulace proliferace a diferenciaci BFU-E nejsou přesně známy. Morfologicky

se jedná o velmi nezralé blasty, mnohdy s pseudopodickými výběžky, vysokým nukleo/cytoplazmatickým poměrem a výraznými nukleoly. BFU-E se postupně diferencují v **CFU-E (colony forming unit-erythroid)**. Jsou to poněkud zralejší blasty, jejichž proliferace je plně závislá na EPO, a nesou na svém povrchu četné receptory pro EPO. Při pokusech na zvířatech vedla anemizace k expanzi počtu CFU-E a naopak polytransfuze k výrazné redukci CFU-E paralelně s koncentrací EPO v krvi. **Proerytroblast** je první identifikovatelnou buňkou pomocí světelné mikroskopie. Proerytroblast má asi 14–20 μm v průměru, jádro s relativně hrubším chromatinem (oproti myeloblastům a lymfoblastům), v cytoplazmě jsou ultramikroskopicky prokazovány známky počínající syntézy hemoglobinu, četné ribozomy a počínající struktury Golgiho komplexu. V buňkách je přítomen **feritin** jak difuzně, tak i v podobě organel, nazývaných **siderozomy**. Cytoplazma proerytroblastu je sytě bazofilní, někdy vytváří pseudopodie, někdy s projasněním u jádra (Golgiho komplex) a jádro tvoří více než 80 % plochy buňky. **Bazofilní erytroblast** je poněkud menší než proerytroblast (cca 12–17 μm), vykazuje zmenšující se nukleo/cytoplazmatický poměr a hrubší strukturu jádra většinou bez nukleolů. Cytoplazma zůstává sytě bazofilní, i když tato bazofilie může již být méně nápadná. S pokračující diferenciací dochází k progresivnímu zmenšování a pyknotizaci jader erytroblastů a postupné změně barvy cytoplazmy od bazofilní (sytě modrá) přes polychromatofilní (špinavě šedivá) až po růžovou při barvení podle Maye-Gruenwalda-Giemsy. Změna barvy cytoplazmy souvisí s nárůstem hemoglobinu a redukcí ribozomálních komplexů ve zrajících erytroblastech. **Polychromatofilní erytroblasty** jsou posledním vývojovým stupněm erytropoézy schopným dělení. Jádro je již výrazně kondenzováno a cytoplazma špinavě šedá. Velikost této buňky se pohybuje v rozmezí 12–15 μm . **Ortochromní (také oxyfilní) erytroblasty** již nejsou schopny dělení, jádro je silně pyknotické, malé a již v něm neprobíhá syntéza deoxyribonukleových kyselin (DNA). Oxyfilní (ortochromní) erytroblasty jsou nejmenšími elementy erytropoézy (8–12 μm), jejich velikost se téměř blíží zralým erytrocytům. Ortochromní erytroblasty však nejsou plně hemoglobinizovány, a proto jejich oxyfilie nedosahuje intenzity, jakou vidíme u zralých erytrocytů. Extruzí jádra, což je aktivní proces za účasti aktinových filament, se oxyfilní erytroblast dále vyvíjí v retikulocyty. **Retikulocyty** jsou poněkud větší než normální erytrocyty (normocyty) a mají nepravidelný tvar, což je zvláště dobře detekovatelné ultramikroskopicky. Retikulocyty mají zachovanou jistou možnost aktivního pohybu, což se považuje za důležité při přechodu těchto buněk přes endoteliální póry dřeňových sinusoid do periferní krve. V retikulocytech ještě probíhá syntéza hemoglobinu a některé další metabolické pochody, které nejsou prokazatelné ve zralých erytrocytech zvaných normocyty. Některými supravitálními barveními (např. brilliant kresylovou modří – bližze viz příslušná kapitola) lze ve světelné mikroskopii zobrazit v retikulocyty přítomnou ribozomální RNA jako tzv. „substantia reticulofilamentosa“. V retikulocyty však postupně dochází k degradaci RNA ribonukleázami a jinými enzymy, které jsou například blokovány při otravě olovem. RNA bloky jsou pak viditelné při normálním barvení jako bazofilní tečkování (můžeme je však vidět i u řady jiných závažných poruch krve-tvorby). Normální retikulocyty vykazují asi o 20 % větší objem než normocyty. **Normocyty** jsou bikonkávní bezjaderné buňky, nemající vlastní proteosyntézu. Měří asi 7 μm v průměru a vykazují vysoký poměr povrch/objem, což je výhodné pro jejich hlavní funkci – přenášet do tkání kyslík. Pro normální erytropoézu jsou nezbytnou

nutností **aminokyseliny, železo, vitaminy B₁₂, B₆ a kyselina listová** a některé další stopové prvky. Při těžké podvýživě (hladovění, mentální anorexie, kachexie) tak rezultuje anémie z kombinovaného deficitu uvedených látek.

Železo je biogenní prvek, který se vyskytuje prakticky ve všech živých organizmech. Najdeme je v jednobuněčných organizmech (kvasinky, bakterie), v buňkách rostlin a v tělech bezobratlých i obratlovců až po savce. Je tomu tak proto, že atom železa je schopen velmi snadno vázat i uvolňovat elektron, a tak měnit své mocenství z dvojmocné feroformy na trojmocnou feriformu a naopak. Železo se ze všech biogenních kovů vyskytuje v organismu v nejvyšším množství, což obnáší asi 35 mg/kg u žen a 45 mg/kg u mužů. Největší podíl celkového množství železa v organismu je obsažen v hemoglobinu (60–70 %), asi 10 % je součástí myoglobinu, cytochromů a jiných enzymů, asi 20–30 % tvoří zásobní pool v podobě vazby na feritiny, méně než 1 % je obsaženo v cirkulujícím poolu v krvi. Vedle své nejnámější funkce transportu kyslíku plní železo i řadu dalších vitálních funkcí – je nutné pro syntézu nukleových kyselin (DNA i RNA), syntézu řady proteinů, účastní se řízení buněčné proliferace a diferenciaci a apoptózy, je nutné pro syntézu myelinu a formování dendritů neuronů, což se odráží v ovlivňování pochodů učení a paměti. Pozornost řady vědeckých týmů je upřena na úlohu železa v procesech stárnutí tkání, neurodegenerace, maligního bujení, aterosklerózy a role železa v imunitním systému. Železo je v krevním proudě vázáno na bílkoviny. Z největší části jde o transportní protein **transferin**. Molekula transferinu váže dva atomy trojmocného železa Fe⁺⁺⁺. Denně dochází k obrátu asi 25 mg železa v krvi. Za normálních okolností je transferin saturován pouze asi ze třetiny své vazebné kapacity. Při nedostatku železa saturace transferinu klesá, naopak při přetížení organismu železem stoupá. Při rozvoji anémií chronických onemocnění dochází nejčastěji k poklesu koncentrace sérového železa i transferinu (transferin je negativní reaktant akutní fáze), takže saturace transferinu může být normální nebo mírně snížená (záleží na vzájemném poměru poklesu železa i transferinu). Molekula transferinu obsahující železo má vysokou afinitu ke specializovaným receptorům, lokalizovaným na buněčných membránách s nejhustší expresí na buňkách hemopoézy. Byly již popsány 2 typy **transferinových receptorů (TfR)** – **TfR a TfR2**.

Zásobní železo je v buňkách uloženo ve formě **feritinu**. U většiny obratlovců je feritin tvořen dvěma typy podjednotek, označovaných jako L (light, liver) a H (heavy, heart) feritin. Tyto podjednotky se organizují do schránek, z nichž každá je složena ze čtyřadvaceti molekul L nebo H feritinu. Feritinové schránky jsou schopné každá pojmout několik tisíc atomů Fe⁺⁺⁺. Jednotlivé feritiny se od sebe liší zastoupením L a H podjednotek a jsou označovány jako **izoferitiny**. H feritin je feroxidáza a jeho aktivita usnadňuje rychlou inkorporaci atomu Fe do feritinových komplexů a na druhé straně je toto železo rychleji z feritinu uvolňováno. Izoferitiny, bohaté na L podjednotky, přijímají Fe pomaleji a déle jej skladují. Jednotlivé tkáně a orgány se liší zastoupením exprese a translace mRNA pro L a H podjednotky feritinu. **TfR a feritin představují dva hlavní proteiny regulace buněčné homeostázy železa**. Při **negativní bilanci železa** (poruchy vstřebávání, chronické krevní ztráty, gravidita apod.) se postupně rozvíjí karence tohoto prvku. Nejprve dochází k depleci železa v zásobách monocyto-makrofágového systému (MMS), pak klesá saturace transferinu pod 15 % jeho celkové vazebné kapacity a současně stoupá i koncentrace transferinu v krvi. Po vyčerpání zásob železa v MMS i snížení jeho obsahu

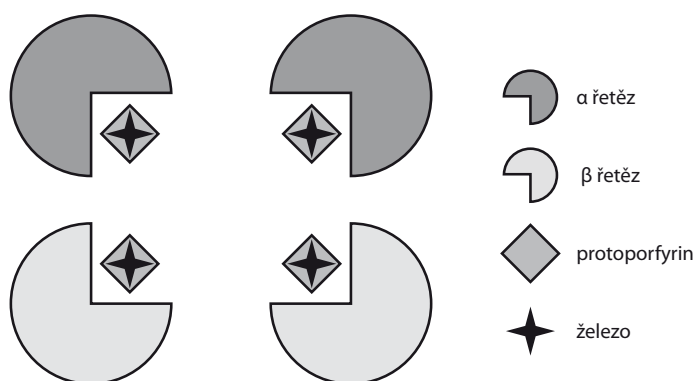
v krvi se rozvíjí hypochromní mikrocytární anémie, kterou je však nutno odlišit hlavně od anémií chronických onemocnění, hemoglobinopatií a myelodysplastických syndromů, což nebývá ve většině případů příliš obtížné, ale občas bývá diferenciální diagnostika svízelná. Při nedostatku pyridoxinu dochází k poruše syntézy hemu s obrazem mírné hypochromní anémie. Rovněž vzácný nedostatek mědi má také za následek vadnou syntézu hemu s hypochromií. Při nedostatku vitamínu B₁₂ a/nebo kyseliny listové vidáváme obraz makrocytární až megaloblastické anémie, v diferenciální diagnostice těchto stavů nutno především odlišit myelodysplastické syndromy. Makrocytární anémie u chronických onemocnění jater nemívá většinou patrnou výraznější ovalocytózu, která naopak přichází u MDS a perniciózní anémie (vše podrobněji v kapitole zabývající se chudokrevností).

1.4 Hemoglobin

Krevní barvivo hemoglobin tvoří více než 90 % váhy normocyty a aktivace globinových genů je pozorována již na úrovni časné BFU-E. Hemoglobin je utvářen dvěma páry globinových řetězců (tetramer), čtyřmi tetrapyrolovými prstenci v podobě protoporfyrinu IX a čtyřmi centrálně uloženými atomy dvojmocného železa. Atom železa je vázán ve středu každého tetrapyrolového kruhu (obr. 1.2). Protoporfyrin s centrálně umístěným atomem železa nazýváme hem. Globin je tvořen dvěma páry řetězců – asi 97 % představuje tetramer $\alpha_2\beta_2$ (HbA₁), maximálně 3,2 % představuje tetramer $\alpha_2\delta_2$ (HbA₂) a pouze stopy připadají na HbF ($\beta_2\gamma_2$) – fetální hemoglobin. Struktura hemoglobinu se mění během embryonálního, fetálního a postnatálního života. **Embryonální a fetální hemoglobiny** vykazují vyšší aktivitu ke kyslíku než adultní hemoglobiny (snadnější přebírání kyslíku z mateřské krve). Geny pro globinové řetězce jsou lokalizovány na chromozomech 16 (tzv. α -like cluster) a 11 (β -like cluster). Podrobnější popis překračuje rámeček této učebnice, lze jen shrnout, že v dospělosti jsou aktivní β , α a δ geny a že poruchy v aktivaci jednotlivých genů (poruchy struktury genů, poruchy transkripce a/nebo translace) vidáváme u talasemií a méně často u myeloproliferací a myelodysplazií. Talasemie se endemicky vyskytují v oblastech kolem Středozemního moře a v jihovýchodní Asii. U bílé rasy jde nejčastěji o **β talasemii** s poruchami syntézy β řetězců. V erythrocytech klesá koncentrace HbA₁ a zvyšuje se hladina HbA₂ a HbF. Podle stupně postižení hovoříme o talasemii minima, minor a maior. Společným znakem talasemií je pokles koncentrace hemoglobinu, hypochromie a nápadně snížený střední objem červených krvinek, v krevním nátěru lze nalézt různý počet **terčovitých erythrocytů (tzv. target cells)**. V diferenciální diagnóze je nutno vyloučit především anémie z nedostatku železa a v endemických oblastech i jiné hemoglobinopatie (HbS, HbE, HbC, HbD aj.). Striktně vzato nepatří talasemie mezi klasické hemoglobinopatie, jelikož jde většinou o kvantitativní (snížení syntézy) a ne kvalitativní poruchu (patologické hemoglobiny s odlišnou strukturou). Nejčastějšími **hemoglobinopatiemi v užším smyslu slova** jsou hemoglobiny S, C, D a E (blíže v kapitole věnované anémiím).

Syntéza tetrapyrolového kruhu začíná aktivací genu pro δ aminolevulonátsyntázu (ALAS). Z δ aminolevulonové kyseliny a porfobilinogenu je syntetizován uroporfyrinogen – izomery I a III – jde již o tetrapyrolový kruh. Přes koproporfyrinogen III a protoporfyrinogen III je syntetizován finální produkt – protoporfyrin IX.

Enzym hemsyntetáza pak inkorporuje do protoporfyrinu IX atom dvojmocného železa a vzniká tak hem. **Hem** se mimo své hlavní funkce přenašeče kyslíku v hemoglobinu vyskytuje např. i v cytochromech, peroxidázách a myoglobinu. Hem plní i regulační funkce – stimuluje syntézu globinových řetězců i jiných proteinů. Při poklesu lokální koncentrace hemu dochází k útlumu syntézy těchto bílkovin. Při vrozených a/nebo získaných poruchách funkce enzymů syntetizujících jednotlivé porfyriny vznikají tzv. **porfyrie**.



Obr. 1.2 Schéma molekuly hemoglobinu

Hemoglobin se skládá ze dvou párů globinových řetězců, čtyř cyklických protoporfyrinů IX a čtyř atomů dvojmocného železa, umístěných v centru každého protoporfyrinu. Více než 97,5 % hemoglobinu dospělých představuje hemoglobin HbA₁, skládající se ze dvou řetězců α a ze dvou řetězců β (α₂β₂). Za normálních okolností dosahuje minoritní hemoglobin A₂ (α₂δ₂) maximálně 3,3 % celkového cirkulujícího hemoglobinu. Při poruše syntézy β řetězců (β talasemie) se zvyšuje podíl HbA₂ a HbF (α₂γ₂) v cirkulaci.

1.5 Tvorba a vývoj bílých krvinek

Granulopoéza a monocytopoéza vycházejí ze **společné kmenové buňky CFU-GM**, ze které se pak diferencují kmenové buňky pro granulopoézu (CFU-G) a monodendritický prekurzor s další diferenciací v monocyto-makrofágovou linii (CFU-M) a dendritický prekurzor (obr. 1.1). Pomocí morfologických, cytochemických, ultrastrukturálních a imunologických metod můžeme odlišit myeloblasty od monoblastů. Myeloblasty se dále diferencují v promyelocyty, nezralé a zralé myelocyty, metamyelocyty, tyčky a segmentované neutrofile. Monoblasty se diferencují v promonocyty a zralé monocyty/makrofágy.

Morfologicky lze v kostní dřeni identifikovat prekurzorové buňky bílé řady až ve stadiu **myeloblastů**. Jedná se o cca 10–18 μm velké nezralé elementy s vysokým nukleo/cytoplazmatickým poměrem s jemným jaderným chromatinem s 2–5 prominujícími nukleoly. Jádro myeloblastu má zpravidla jemnější strukturu než jádro proerythroblastu a cytoplazma je méně bazofilní. Jádro se jeví síťovitě nebo vláknitě uspořádané, někdy má chromatin podobu jemných krupiček a je uloženo centrálně. V cytoplazmě myeloblastů mohou být detekována nečtetná primární (azurofilní) granula, která vykazují pozitivní reakci na myeloperoxidázu, někteří autoři však

blasty s nečetnými primárními granulami řadí již k promyelocytům. V případě leukemických myeloblastů většina autorit granula připouští (leukemické blasty I–III) (blíže v kapitole o leukemiích).

Dalším vývojovým stadiem myelopoézy jsou **promyelocyty**. Tyto buňky jsou nápadné svou velikostí (12–20 μm), mají zpravidla excentricky uložené jádro s hrubší strukturou chromatinu než myeloblasty s většinou dobře patrnými nukleoly. Jádro často vykazuje lehké vyhloubení jaderné membrány, ve kterém je patrné zřetelné projasnění cytoplazmy. Ultramikroskopicky je v této lokalizaci detekován tzv. Golgiho komplex (slouží ke třídění a „balení“ v buňce syntetizovaných makromolekul do granul). Cytoplazma promyelocytů si zachovává bazofilní barvení a jsou v ní patrná **četná primární granula**. Tato primární granula jsou syntetizována v promyelocytech a myelocyty je již netvoří, jsou však detekovatelná ve všech vývojových stádiích granulopoézy, včetně nejzralejších segmentů. Primární granula jsou velká asi 500 nm, jejich membrána nese četné antigenní struktury (CD63, CD66c, CD68) a obsahují myeloperoxidázu, lysozym, elastázu, defenziny a mnoho dalších látek, hrajících roli v obraně organismu proti infekci a v remodelaci tkání. Primární granula se již dále nevyvíjejí, jen perzistují. V promyelocytech nejsou přítomna sekundární granula.

Myelocyty se vyznačují poklesem nukleo/cytoplazmatického poměru, hrubší strukturou chromatinu a zvyšujícím se počtem sekundární granule (neutrofilní, eozinofilní a bazofilní – v závislosti na diferenciaci). Sekundární granula jsou menší než primární, mají průměr cca 200 nm a jsou negativní na myeloperoxidázu. Na povrchu nesou četné struktury jako CD15, CD66a, CD66b a mnoho dalších, obsahují kolagenázu, lysozym, histaminázu, heparinázu, vitamin B₁₂ vázající protein, aktivátor plazminogenu, laktoferin aj. Sekundární granula jsou na hranici viditelnosti světelným mikroskopem. Cytoplazma neutrofilních myelocytů pozbývá bazofilního zabarvení ve prospěch eozinofilního (růžového) odstínu. Ve zralejších elementech myeloidní řady se navíc popisují i terciální granula, rovněž obsahující různé proteiny, především želatinázu a lysozym.

Lze detekovat **nezralé a zralé myelocyty**. V nezralých myelocytech vidíme bazofilnější zabarvení cytoplazmy, jemnější strukturu jádra a vzácně mohou být patrné i nukleoly. Nukleoly jsou dobře patrné ultramikroskopicky. Myelocyty představují nejzralejší myeloidní elementy, které mají ještě schopnost buněčného dělení. Velikost těchto buněk se pohybuje mezi 12–18 μm .

Metamyelocyty jsou poněkud menší než myelocyty (10–18 μm), mají menší a hutnější jádro, které většinou vykazuje ledvinovitý tvar. Tyto buňky se za fyziologických okolností, stejně jako jejich dříve zmíněné prekurzory, vyskytují jen v kostní dřeni, nikoli v periferní krvi. Za normálních okolností se v periferní krvi vyskytují pouze tyče a segmenty. **Rozdíl mezi tyčemi a segmenty** se kupodivu v literatuře uvádí různě jako poměr tloušťky mezi nejtenčím a nejširším místem jádra – různí autoři hovoří o jedné třetině nebo polovině, jiní dokonce za segmenty považují až elementy s vláčenkovitým (jako nit tenkým) spojením mezi částmi jádra.

Zralé tyče a segmenty jsou uvolňovány do periferní krve. Přesný mechanismus regulace tohoto procesu není znám. Poločas zralých elementů v periferní krvi obnáší asi 6 hodin. Zralé neutrofilny jsou atrahovány do míst infekce a/nebo poškození tkání, kde dochází k interakci s endoteliemi s následným vycestováním do tkání na bázi chemotaxe.

Osud zralých neutrofilních leukocytů u zdravých lidí bez infekce nebo poranění není zcela jasný, zdá se, že část je eliminována přestupem sliznice gastrointestinálního traktu.

Eozinofilní řada, bazofilní řada a mastocyty vycházejí ze společného prekurzoru, pozitivního na CD34 znak a dosud nenesoucího specifické receptory pro IgE (Fc epsilon R). Tento prekurzor se pak diferencuje v již odlišené kmenové buňky pro **mastocyty (CFU-Mast)** a pro **Eo/Bazo řadu**. Kmenová buňka pro mastocytární řadu má na buněčné membráně na rozdíl od společné kmenové buňky pro eozinofilní/bazofilní řadu receptor pro SCF (stem cell factor) – **c-kit**. Společná kmenová buňka pro eozinofilní/bazofilní řady vyvrává přes stadia pre-Ba/Eo, common Ba/Eo v již oddělené prekurzory CFU-Eo a CFU-Bazo.

Eozinofilní řada pak již vychází ze specifické kmenové buňky CFU-Eo, dále se diferencující ve zralější blasty a dále v eozinofilní promyelocyty, metamyelocyty, tyče a segmenty. K této diferenciaci je zapotřebí IL-3, IL-5 a GM-CSF. Sekundární eozinofilní granula vykazují specifickou strukturu v elektronové mikroskopii a obsahují řadu prozánětlivých cytokinů, bazický protein, kationický protein, neurotoxin a eozinofilní myeloperoxidázu.

Bazofilní granulocyty se diferencují z kmenové buňky CFU-bazo v bazofilní myeloblasty, promyelocyty, metamyelocyty a zralé segmenty. Bazofily se liší od mastocytů v řadě parametrů. Ve světelné mikroskopii je nejnápadnějším rozdílem vzhled jádra a počet a velikost bazofilních granul. Jádro bazofilu je na rozdíl od mastocytu laločnaté, granula mastocytu jsou většinou větší, ale vždy velmi početná, zakrývající jádro. V elektronové mikroskopii jsou tyto rozdíly jasně patrné. Bazofily a mastocyty se liší i obsahem specifických granul a expresí znaků na buněčné membráně. Obě řady obsahují histamin, chondroitin sulfát a destičky aktivující faktor (PAF), mastocyty navíc i heparin a daleko více mediátorů zánětu. V řízení proliferace a diferenciaci mastocytů hraje hlavní roli SCF (stem cell factor nebo c-kit ligand), zatímco v bazofilní řadě IL-3, IL-5, GM-CSF a TGFβ (transforming growth factor β).

Monocyto-makrofágová řada se diferencuje ze společného prekurzoru s granulopoézou (CFU-GM). CFU-GM vyvrává v CFU-G a monodendritický prekurzor. CFU-G dává vzniknout granulopoéze a **monodendritický prekurzor** se dále diferencuje ve dvě větve: nezralé elementy dendritické řady a monoblasty. Monoblasty lze ve světelné i elektronové mikroskopii jen velmi obtížně odlišit od myeloblastů. Monoblasty mohou být různě výrazně pozitivní na nespecifickou esterázu se zřetelným blokem reakce natrium fluoridem (NaF), myeloperoxidázová reakce v nich bývá zpravidla negativní nebo jen lehce pozitivní. Téměř specifická pro myeloidní řadu je reakce na chloroacetátesterázu, naproti tomu pro monocytární řadu je téměř specifická reakce na butyrátesterázu s následným blokem NaF.

Zralější promonocyty již více připomínají monocytární elementy, mají většinou ledvinovité jádro s retikulárním chromatinem, kde ještě můžeme nacházet různé zřetelné nukleoly. Cytoplazma je bazofilní, ale již může pomalu nabývat typické kouřovité zabarvení. Zralé monocyty mají nepravidelné (většinou ledvinovité) jádro bez nukleolů a cytoplazma je kouřově šedá s jemnou (poprašek) azurofilní granulací. Monocyty vycestovávají do tkání, kde je označujeme jako makrofágy. **Makrofágy** jsou přítomny prakticky ve všech tkáních a orgánech, v některých mohou plnit specifické funkce (např. osteoklasty v kostní tkáni, mikroglie v mozku, Kupfferovy buňky v játrech, Langerhansovy buňky v kůži). Základními funkcemi monocyto-makrofágového systému

jsou fagocytóza mikroorganismů, eliminace a prezentace antigenů, výrazná účast na remodelaci tkání, destrukce starých nebo poškozených erytrocytů s nemalým podílem na ovlivnění metabolismu železa. S buňkami monocyto-makrofágového systému funkčně i vývojově spřízněné dendritické buňky detekujeme v primárních i sekundárních lymfatických orgánech (viz níže) a sliznicích, kde je nacházíme jako epiteliální, folikulární nebo interdigitující elementy. **Dendritické buňky** nesou na svém povrchu početné antigeny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC – main histocompatibility complex) a prezentují v tomto kontextu cílové antigeny T lymfocytům. T lymfocyty mohou být následkem této interakce aktivovány. Při těchto pochodech je rovněž uvolňována jak lymfocyty, tak i dendritickými buňkami řada mediátorů. Prezentace antigenů se účastní i buňky monocyto-makrofágového systému.

Lymfocytární řada prodělává vzhledem ke svým zásadním regulačním funkcím v imunitních pochodech dosti složitý vývoj. Po diferenciaci ze společné multi (toti)-potentní buňky pro nelymfoidní i lymfoidní řadu se lymfoidní kmenové buňky dále diferencují do T řady nebo B řady.

Lymfoblasty jsou zpravidla poněkud menší než myeloblasty s úzkým lemem cytoplazmy kolem kulatého jádra s hutnějším chromatinem a zpravidla obsahují jen 1–2 nukleoly. Lymfoblasty jsou peroxidáza negativní. V jádrech nezralých prekurzorů lymfatické řady lze detekovat enzym **terminální deoxynukleotidyl transferázu (TdT)**, který je pozitivní u cca 90 % akutních lymfoblastických leukemií a jen vzácně u akutních myeloidních leukemií. **Prolymfocyty** jsou menší než lymfoblasty s hutnějším jádrem a většinou dobře patrným centrálním nukleolem. **Zralé lymfocyty** se vyznačují velkou morfologickou i funkční variabilitou a plasticitou. Pro vývoj lymfocytů jsou zásadními primární a sekundární lymfatické orgány. **Primárními lymfatickými orgány** jsou kostní dřeň a thymus. Lymfocyty se zde diferencují v B a T lymfocyty. Diferenciace T lymfocytů probíhá v tymu. **Tymus** se skládá z lalůčků (lobulů), kde diferencující se lymfocyty přicházejí do kontaktu s epiteloidními a interdigitujícími dendritickými buňkami a makrofágy, které jak přímým kontaktem, tak produkcí řady cytokinů indukují vyžívání ve zralé T helper (CD4+) nebo T suppressor (CD8+) lymfocyty. T i B lymfocyty, které opouštějí primární lymfatické orgány a dosud se neseťkaly s cílovými antigeny, označujeme jako **naivní**. Po setkání s cílovými antigeny (může jít o infekční agens, tumory nebo i tělu vlastní nepatologické antigeny v případě autoimunitních onemocnění) se lymfocyty stávají „**paměťovými buňkami**“ – **memory cells** nebo **efektorovými lymfocyty** v podobě plazmatických buněk (B lymfocyty) nebo cytotoxických T lymfocytů. Memory cells při opětovném setkání s antigeny vytvářejí klony, které rychle reagují tvorbou protilátek (B lymfocyty) nebo buňkami zprostředkovanou imunitní reakcí (T lymfocyty). Tvorbou a uvolňováním řady stimulačních i inhibičních cytokinů je pak ovlivněna i reakce ostatních složek imunitní odpovědi (granulocytů, monocytů/makrofágů, žírných buněk, retikulárních buněk). Lymfocyty tak představují centrální buňky v procesech i regulaci imunitní odpovědi a hovoříme zde o **specifické celulární i humorální imunitě**, na rozdíl od nespecifické imunity, představované komplementem a ostatními nelymfoidními buňkami.

Sekundárními lymfatickými orgány jsou lymfatické uzliny a slezina. Lymfatické uzliny mají aferentní a eferentní lymfatické cévy, přes které protéká lymfa s lymfocyty. Uzliny obsahují lymfatické folikuly, tvořené převážně B lymfocyty. V centru folikulů proliferují morfologicky „nezralé“ centroblasty, diferencující se ve zralé centrocyty.

Centroblasty jsou různě velké, mají zpravidla „naštěpené“ jádro. Velikost, nukleo/cytoplazmatický poměr a bazofilie cytoplazmy závisí na antigenní stimulaci v regionální lymfatické uzlině. Ve folikulech je přítomna i jistá populace T lymfocytů, které se účastní modulační odpovědi i pochodů celulární imunity. T lymfocyty jsou přítomny hlavně v plášťové (mantle) zóně lymfatických folikulů. Výrazně proliferující morfologicky „nezralé“ lymfocyty jsou někdy označovány jako **imunoblasty (B i T)**. Tyto buňky jsou zvláště při virových infekcích (nejmarkantněji při infekční mononukleóze) vyplavovány do periferní krve, kde jsou detekovány jako morfologicky velmi heterogenní populace, souhrně některými autory označovaná jako „virocyty“ (také nepřesně jako lymfomonocyty, přesněji aktivované lymfocyty).

V regionálních lymfatických uzlinách a v lymfatických folikulech ve sliznicích makrofágy a dendritické buňky prezentují cílové antigeny naivním i paměťovým lymfocytům, které pak recirkulují a znovu se mohou usazovat v místech antigenní stimulace (homing). Lymfatické folikuly ve sliznicích gastrointestinálního traktu nazýváme Peyerovy plaky. Postavení sleziny v řízení diferenciaci lymfatické řady a v řízení specifické imunitní odpovědi není zcela jasné, představuje vzhledem ke své velikosti a struktuře značný rezervoár T i B lymfocytů. U splenektomovaných (zvláště pro úraz a ne pro hematologická onemocnění) však nejsou výše uvedené procesy proliferace a diferenciaci lymfocytů výrazněji narušeny.

Proliferaci a diferenciaci B lymfocytů lze rozdělit na antigenu nezávislé a závislé období. Prvé období probíhá v kostní dřeni, kdy ze z kmenových buněk postupně diferenciuje nezralý pro-B element, CD34+ a CD19+. Další fází je pre-B buňka, která se dále diferenciuje ve zralý naivní B lymfocyt. Nevelká populace těchto lymfocytů nese společné znaky pro T (CD5) a B řadu (CD19). U typické chronické lymfatické leukemie je většina leukemických lymfocytů CD5+CD19+. Naivní lymfocyty po setkání s cílovými antigeny buď podléhají apoptóze (negativní selekce, eliminují se tak zvláště autoreaktivní klony), nebo se diferenciují v plazmocyt, tvořící protilátky proti cílovému antigenu. Další možností je diferenciaci v paměťové buňky, které recirkulují. Při dalším setkání s příslušnými antigeny jsou rychleji produkovány klony plazmocytů produkující protilátky. V této řadě lze rozlišit plazmablast, proplazmocyt a zralý plazmocyt.

Velmi zajímavou a důležitou kapitolou je postupná **aktivace genů pro imunoglobuliny v B prekurzorech**. Široký repertoár specifických imunoglobulinů je syntetizován jednotlivými klony B lymfocytů. Každý klon je zodpovědný za tvorbu protilátky, zaměřené pouze proti určitému antigenu nebo antigenní determinantě. Protilátky jsou tvořeny dvěma páry těžkých a dvěma páry lehkých řetězců, podle struktury těžkého řetězce pak rozeznáváme **5 tříd imunoglobulinů**: IgM, IgG, IgD, IgE a IgA. Specifita a jedinečnost každé protilátky je zajištěna specifickou strukturou (**hyper**) **variabilní části** molekuly, která pak rozeznává antigen na principu jedinečnosti klíče a zámku. Variabilní části molekul imunoglobulinů jsou kódovány variabilními úseky genů, které vykazují (hyper)mutace. V časném stadiu vývoje B lymfocytu lze molekulárně biologickými metodami detekovat nejprve aktivaci – **přestavbu (gene rearrangement)** genu pro těžké řetězce μ , následovanou přestavbou genů pro lehké řetězce κ a λ . Posléze dochází i k aktivaci genů pro těžké řetězce δ , α , ϵ a γ . Prvními molekulami v cytoplazmě B buněk jsou tak imunoglobuliny IgM, které jsou pak exprimovány na cytoplazmatické membráně jako receptory pro antigeny. IgM jsou na povrchu B buněk postupně vystřídány molekulami IgD. V jednotlivých klonech

B lymfocytů jsou v závislosti na aktivaci příslušného genu pro těžké řetězce syntetizovány imunoglobuliny IgG, IgM, IgA, IgE a IgD. V úsecích genů, které kódují hypervariabilní oblasti protilátek (úseky, rozeznávající antigeny), dochází k „hypermutacím“. Vzniká tak široký rejstřík buněčných receptorů a protilátek. Klony těchto B buněk (již zmíněné centroblasty) se diferencují v centrocyty, které podléhají apoptóze (negativní selekce autoreaktivních klonů), nebo se diferencují v plazmocytů nebo paměťové buňky. Jak již bylo řečeno, tyto procesy jsou ovlivňovány antigen prezentujícími dendritickými buňkami a T lymfocyty.

Vývoj zralých T lymfocytů probíhá (viz výše) v tymu. Podobně jako u imunoglobulinů je struktura buněčných **receptorů T lymfocytů (TCR – T-cell receptor)** polymorfní a jedinečná pro každý vyvíjející se T klon. Rozeznáváme dva typy TCR: TCR z řetězců α a β a TCR z řetězců γ a δ . Nezralé tymocyty exprimují na svém povrchu CD34, postupně pak CD2, CD5, CD7 a v cytoplazmě CD3. Z hlediska funkce tymocytů jsou důležité antigeny CD4 a CD8. Nejméně zralé buňky jsou CD4⁻ CD8⁻, pak následují lymfocyty CD4⁺ CD8⁺ (double positive) a konečně CD4⁺ nebo CD8⁺.

Přestavba s následnou aktivací genů pro **TCR (gene rearrangement)** začíná v genu pro β řetězec TCR. Následně se diferencují již zmíněné CD4⁺ CD8⁺ buňky. Dalším krokem je rearrangement v genu pro α řetězec s kompletizací TCR α/β . Menšina tymocytů aktivuje geny γ a δ a kompletuje tak TCR γ/δ . Tyto lymfocyty jsou morfologicky patrné jako velké granulózní lymfocyty a tvoří tak část populace LGL (large granular lymphocytes). Naivní zralé T lymfocyty pak ve spolupráci s dendritickými buňkami podléhají negativní a pozitivní selekci, kdy autoreaktivní a nereaktivní lymfocyty jsou eliminovány indukci apoptózy (programovaná buněčná smrt) a na cizí antigeny přiměřeně reagující klony jsou uvolňovány z tymu do cirkulace. **Zralé T lymfocyty** jsou cca 5–8 μm velké buňky s malým lemem cytoplazmy kolem hutně vyhlížejícího jádra s malým počtem organel v světle modré cytoplazmě.

CD4⁺ a TCR α/β nesoucí T lymfocyty jsou induktory a regulátory specifické imunitní odpovědi (T helper cells). Diferencují se v **Th1 a Th2 buňky**, lišící se spektrem produkce cytokinů. Th1 lymfocyty indukují reakce cytotoxických T a NK lymfocytů a zvyšují potenci monocyto-makrofágového systému, zatímco Th2 buňky aktivují protilátky produkující B lymfocyty.

CD8⁺ a TCR α/β buňky představují primárně cytotoxické T lymfocyty. Tyto buňky po stimulaci antigenem (prezentace dendritickými buňkami – první signál) exprimují receptor pro IL-2. Jako druhý signál k proliferaci cytotoxického T klonu slouží navázání IL-2 na tento receptor. IL-2 je sekretován aktivovanými Th1 lymfocyty. Aktivované cytotoxické CD8⁺ lymfocyty potom indukují apoptózu cílové antigeny nesoucích buněk poškozením membrány i jádra těchto elementů.

Nulové lymfocyty (null-cells) se vyvíjejí nejspíše ze společných kmenových buněk s klasickými T lymfocyty (T/NK prekurzory), nenesou však na svém povrchu většinu znaků pro B a T řadu. Jde o funkčně i fenotypicky heterologní populaci lymfocytů, které ve světelném mikroskopu označujeme jako velké granulózní lymfocyty (LGL – large granular lymphocytes). Jedná se o velké buňky (10–12 μm) s vysokým podílem bledě modré cytoplazmy s azurofilními granulami, které jsou peroxidáza negativní. LGL mohou být zastoupeny v periferní krvi asi v 10–15 % z lymfocytární řady. Část LGL je pozitivní na CD56 a negativní pro CD8 a TCR. Tyto elementy jsou skutečnými **přirozenými zabíječi (NK cells, nature killer)**, které mohou být cytoto-

xické bez předchozí aktivace antigenem. Populace CD56-CD57+CD8+TCR α/β + se označuje jako NK-like cells. Nulové buňky jsou angažovány v regulaci hematopoézy, obraně proti infekcím a imunitním dozoru proti nádorům. Část populace LGL tvoří TCR γ/δ pozitivní lymfocyty (viz výše).

Pomocí molekulárně genetických metod, detekujících přestavbu genů pro imunoglobuliny v B lymfocytech (a analogicky genů pro T buněčné receptory v T lymfocytech) lze lépe diagnostikovat časné prekurzory jednotlivých řad u **akutních lymfoblastických leukemií**.

1.6 Tvorba a vývoj trombocytů

Megakaryocytární linie se vyvíjí z kmenové buňky BFU-Meg (BFU-MK) v CFU-Meg, která se pak diferencuje v promegakaryoblasty, megakaryoblasty, promegakaryocyty a nezralé a zralé megakaryocyty. Trombocyty vznikají odštěpováním cytoplazmy zralých megakaryocytů, které se již dále nedělí, pouze dochází k mnohonásobnému zmnóžení genomu (2N-4N-8N...) v jádře, tzv. **endomitóza**. V oblasti cytoplazmy zralých megakaryocytů lze detekovat vznik demarkačních membrán lemujících úseky, které se někdy označují jako **prototrombocyty**. Prototrombocyty jsou fragmentací uvolňovány do kapilárního systému v kostní dřeni. Terminologie jednotlivých vývojových stádií vývoje megakaryocytární linie není zcela ujednocena – klasickou morfologií neidentifikovatelné stadium tohoto vývoje je nejčastěji označováno jako **promegakaryoblast**. V těchto blastech však již může být ultrastrukturně pozitivní reakce na pro trombocyty specifický GP IIb (glykoprotein IIb), dále pak von Willebrandův faktor a peroxidázu. Promegakaryoblasty tvoří cca 5–20 % celého megakaryocytárního poolu. Morfologicky jde o malé „lymfoidně“ vyhlížející blasty s vysokým nukleo/cytoplazmatickým poměrem, výrazně bazofilní cytoplazmou bez granul, flowcytometricky je již ve většině promegakaryoblastů prokazována endomitóza (duplikace genomu bez dělení jádra).

Dalším diferenciačním stadiem je **megakaryoblast**, někdy je označován za nezralý megakaryocyt I, který představuje asi 20 % megakaryocytární populace. Ve světelné mikroskopii se jedná o asi 6–20 μm velkou buňku s intenzivně bazofilní cytoplazmou, jádro je velké, kulaté nebo lobulizované, nukleo/cytoplazmatický poměr je vysoký, jádro obsahuje několik prominujících nukleolů. Elektronová mikroskopie odkryje několik pro megakaryocyty typických α granul a ojedinelé struktury vznikajícího demarkačního membránového systému. Cytoplazma megakaryoblastů může někdy vytvářet výběžky a občas vidáme adheenci zralých trombocytů na tyto prekurzory, což může pomoci v morfologické diagnostice. Tyto nálezy však bohužel nejsou jednoznačně spolehlivé.

Megakaryoblasty se dále diferencují v **promegakaryocyty**, místy označované jako zrající megakaryocyt II. Jde o buňky velikosti 15–20 μm se snižujícím se nukleo/cytoplazmatickým poměrem a vyhasínajícím bazofilním cytoplazmou, která má již narůžovělé tóny. Jádro je již výrazně lobulizované s násobkem genomu mezi 8N a 64N, hrubší struktury a většinou bez výrazných nukleolů. Ultramikroskopicky již nacházíme četnější α granula a struktury demarkačního membránového systému. Promegakaryocyty (megakaryocyty II) jsou v megakaryocytární populaci zastoupeny v asi 25 %.

Zrající a vyzrálé **megakaryocyty** (megakaryocyty III) se vyznačují postupnou výraznou ztrátou bazofilie cytoplazmy, nápadnou polarizací jádra na okraj cytoplazmy, výraznou lobulizací (ne segmentací) hutného chromatinu bez nukleolů. U zcela zralých megakaryocytů je zřejmé zřetelné „políčkování“ cytoplazmy s následnou fragmentací v podobě uvolňování destiček. V cytoplazmě zralých megakaryocytů lze detekovat redukci endoplazmatického retikula a Golgiho komplexů, naopak dochází k výraznému vývoji demarkačního membránového systému, expresi destičkových glykoproteinů GP IIb/IIIa, komplexu GP I/V/I a zmnožení a granul, hutných tělísek (dense bodies) apod. Zralé megakaryocyty jsou rovněž největší z celé této vývojové řady (cca 40–60 μm v průměru), nejfrekventnější (cca 60 % megakaryocytární řady) a vykazují rovněž nejnižší nukleo/cytoplazmatický poměr. Vývoj zralého megakaryocytu trvá asi 5–10 dní.

Trombocytopoéza není dosud do všech detailů prozkoumána. Nejčastěji se uvádí teorie o extenzi výběžků cytoplazmatických membrán (tzv. pseudopodií) megakaryocytů do kapilárního systému sinusoid v kostní dřeni s následným uvolňováním preformovaných útržků cytoplazmy megakaryocytů v podobě trombocytů do cirkulace. Odhaduje se, že jeden megakaryocyt je schopen vyprodukovat 1000–5000 destiček. Kontakt mezi megakaryocyty a sinusoidami ve dřeni je velmi důležitý jak z hlediska modulace megakaryo/trombocytopoézy přímým intercelulárním kontaktem (cell to cell), tak i pro produkci řady interleukinů a cytokinů, které ovlivňují vyztváření megakaryocytů i produkci destiček (hematologické induktivní mikroprostředí – HIM), včetně interakce všech zúčastněných složek s tzv. extracelulární matrix.

Počet destiček v periferní krvi je citlivě regulován a ukazuje se, že hlavním proteinem řídícím procesy megakaryo/trombocytopoézy je **trombopoetin (TPO)**. TPO vykazuje asi 20% homologii s erythropoetinem (EPO) a usuzuje se, že geny pro oba proteiny se vyvinuly ze společného základního genu. Do této mozaiky dobře zapadá i existence společného prekursoru pro erythropoézu a trombocytopoézu. V pokusech na zvířatech bylo zjištěno, že markantní umělé snížení počtu trombocytů vede ke stimulaci megakaryopoézy a trombocytopoézy následkem zvýšené hladiny TPO v krvi. Naopak po mnohočetných trombocytárních transfuzích koncentrace TPO klesá a dochází i k redukci megakaryo/trombocytopoézy. TPO se váže na specifické receptory (označované jako c-MPL), které jsou umístěny na kmenových buňkách, megakaryocytech a trombocytech. Vazba TPO na c-MPL na trombocytech pravděpodobně částečně zabraňuje interakci TPO s c-MPL na kmenových buňkách a zralejších prekurzorech megakaryopoézy. Částečně je tak vysvětlen inverzní vztah mezi počtem krevních destiček a koncentrací TPO v krvi. Lze shrnout, že TPO po vazbě na c-MPL zvyšuje počet i diferenciaci buněk megakaryocytární linie včetně zvýšené tvorby destiček a že koncentrace TPO je v inverzní relaci s počtem trombocytů, přesněji s celkovou trombocytárním masou v periferní krvi.

Na vývoji megakaryocytární řady se v určitých stádiích diferenciacie megakaryopoézy podílejí i některé další regulační proteiny (IL-3, IL-6, IL-11 a G-CSF), avšak řídící funkci TPO nenahrazují, jenom ji doplňují. Z celkové trombocytární masy je asi třetina lokalizována ve **slezině**, u splenektomovaných nemocných se může objevit trombocytóza. Regulační funkce sleziny není zcela jasná, nebyla prokázána produkce stimulačních a/nebo inhibičních faktorů ve slezině. Zdá se, že slezina je hlavním místem zániku „starých“ destiček, destiček poškozených nebo destiček

s navázanými autoprotilátkami (ITP – idiopatická nebo imunitní trombocytopenická purpura). U pacientů se splenomegalií často vídáváme trombocytopenii různého stupně. Dalšími místy destrukce starších trombocytů jsou játra a kostní dřeň, slezina zde však hraje hlavní roli. Denně se vyprodukuje a u zdravého člověka zanikne asi $1,2\text{--}1,5 \times 10^{11}$ trombocytů.

Vztah mezi **bilancí železa a trombocytopoézou** je diskutován v důsledku pozorování trombocytózy u některých pacientů se sideropenií. Železo má jako kofaktor řady enzymů vliv na syntézu nukleových kyselin, bílkovin, dále na regulaci procesů proliferace, diference a apoptózy různých buněčných linií. U těžkého deficitu železa byly zaznamenány i trombocytopenie. Můžeme říci, že vliv železa na produkci trombocytů není jasný – pacienti mohou mít normální, zvýšený nebo snížený počet destiček v periferní krvi a dosud nebyla realizována žádná klinická studie v tomto směru, jde jen o publikované kazuistiky. S ohledem na významnou podobnost molekuly TPO a EPO je však pravděpodobné, že vede-li sideropenie k anémii a tím i zvýšení EPO, mohou vysoké hladiny EPO stimulovat kromě erythropoézy i trombocytopoézu a vést tak k reaktivní trombocytóze. Po upravení hladiny Hb se zpravidla normalizují i počty trombocytů.

Na závěr kapitoly o krvetvorbě lze uvést, že hematopoéza má u zdravého člověka **velkou rezervu** – podle potřeby může mnohonásobně (až 10×) zvýšit produkci jednotlivých krevních elementů. Za patologických stavů (útlumy kostní dřeně, inefektivní hematopoéza, metastázy do dřeně) je tato rezerva snížena až vyčerpána.

1.7 Hodnocení

Stav hematopoézy v praxi nejčastěji hodnotíme korelací nálezů v periferní krvi s nálezy v kostní dřeni. Izolované nebo různě kombinované cytopenie mohou vykazovat útlum (hypoplazie až aplazie) krvetvorby v kostní dřeni, inefektivní hematopoézu (apoptózu zralejších elementů ve dřeni), myelofibrózu, akutní hemoblastózy, metastázy maligních tumorů apod. U obrazů zvýšené proliferace nutno rozlišit primární a sekundární procesy (např. reaktivní leukocytózu od chronické granulocytární leukemie). Kromě klasických metod hodnocení hematopoézy máme k dispozici řadu moderních postupů, např. ultramikroskopii, průtokovou cytometrii, cytogenetiku a molekulární biologii, kultivační metody aj.

1.8 Klinický význam

Nerovnováha v produkci a zániku jednotlivých krevních elementů může mít za následek proliferační a/nebo cytopenické poruchy s různými klinickými obrazy (únava a dušnost u anemických stavů, krvácivé projevy u trombocytopenií, zvýšená náklonnost k infekcím u granulocytopenií nebo u poruch lymfatické složky apod.). Je zřejmé, že přesná diagnostika poruch krvetvorby je jedním ze základních faktorů podporujících náležitě léčebné postupy u konkrétního pacienta. Výzkum v oblasti kmenových buněk otvírá nové možnosti léčby nejen v klinické hematologii, ale i např. v kardiologii, neurologii aj.